



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**CÉLULAS NG2: PROPIEDADES INTRÍNSECAS DE MEMBRANA Y ACTIVIDAD  
SINÁPTICA GABAÉRGICA**

**PALOMA PILAR MALDONADO ROJAS**

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Director de memoria

Dra. María Cecilia Angulo Jaramillo

Inserm U603. CNRS UMR 8154

Université Paris Descartes

Profesor patrocinante

Dra. Jenny Fiedler Temer

Departamento de Bioquímica y

Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas

y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago – Chile

2009

## AGRADECIMIENTOS

María Cecilia Angulo

Mateo Vélez-Fort

Etienne Audinat

Jenny Fiedler

Nilo Maldonado

Paulina Rojas

Valentina Maldonado

Ana Luisa Neira

Gonzalo Carrasco

Vicente Carrasco

Javiera Carrasco

Joaquín Carrasco

Orlando Neira

Mercedes Urzúa

Constanza Carrillo

Montserrat Zerega

Carla Miqueles

## FINANCIAMIENTO

Agence Nationale pour la Recherche. Proyecto ANR N°R07039KK

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
FINANCIAMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Reseña general	1
1.2 Características de las células NG2	2
1.2.1. Marcadores celulares y origen	2
1.2.2 Morfología	3
1.3 Función	4
1.3.1 Generación de múltiples tipos celulares	4
1.3.2 Rol de la proteína NG2 en el crecimiento axónico	5
1.4 Propiedades electrofisiológicas de membrana	5
1.4.1 Canales de potasio de salida	6
1.4.2 Canales de sodio	7
1.5 Comunicación sináptica entre células NG2 y neuronas	8
1.5.1 Posibles roles de la sinapsis	8
1.5.2 Sinapsis GABAérgica en la neocorteza	9
1.6 Hipótesis	11
1.7 Objetivo general	11
1.8 Objetivos específicos	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Materiales	13
2.1.1 Electrofisiología	13

2.1.2 Inmunohistoquímica	13
2.2 Métodos	14
2.2.1 Preparación de rebanadas de cerebro	14
2.2.2 Electrofisiología	15
2.2.3 Adquisición de datos y análisis	16
2.2.4 Inmunohistoquímica	17
2.2.5 Microscopía confocal	18
3. RESULTADOS	19
3.1 Propiedades intrínsecas de las células NG2 durante el desarrollo postnatal	19
3.1.1 Propiedades de pasivas	20
3.1.2 Corrientes de potasio ( $I_{K^+}$ )	23
3.1.3 Corrientes de sodio ( $I_{Na^+}$ )	25
3.2 Actividad sináptica GABAérgica de células NG2 durante el desarrollo postnatal	28
3.2.1 Actividad GABAérgica espontánea y miniatura	28
3.2.2 Morfología de las células NG2	29
3.2.3 Receptores GABA <sub>A</sub>	30
4. DISCUSIÓN	32
4.1 Combinación de propiedades hacen de las células NG2 una población de glías únicas	32
4.2 Canales de potasio y sodio, conductancias determinantes en la excitabilidad de las células NG2	33
4.3 Sinapsis GABAérgica en células NG2 neocorticales, una señalización de destino celular	35
4.4 Cambio en las sinapsis interneurona-células NG2 modula la actividad GABAérgica	35
4.5 Morfología y expresión de receptores GABA <sub>A</sub> , parámetros constantes durante el desarrollo PN de las células NG2	36

5. CONCLUSIONES	38
6. REFERENCIAS	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de las células NG2 y marcadores bioquímicos	3
Figura 2. Cortes de cerebro de ratón	14
Figura 3. Identificación de las células NG2	19
Figura 4. Corrientes de potasio de células NG2 durante el desarrollo PN	24
Figura 5. Corrientes de sodio de células NG2 durante el desarrollo PN	27
Figura 6. Actividad sináptica entre interneuronas GABAérgicas y células NG2	30
Figura 7. Receptores GABA <sub>A</sub> de células NG2	31

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1

22



## ABREVIATURAS

AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
DsRed	Proteína fluorescente roja de <i>Discosoma sp.</i>
DIC	<i>Differential interfase contrast</i>
G $\Omega$	Gigaohm
GABA	Ácido gama-amino butírico
IR-DIC	<i>Infra red-differential interfase contrast</i>
kHz	Kilohertz
kDa	KiloDalton
M $\Omega$	Megaohm
mV	Milivolt
NMDA	N-metil-d-aspartato
NG2	Neurona-glía 2
pA	Picoamper
s.e.m	Error estándar del promedio
THIP	4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridin-3-ol
$\Delta$ SD	Delta desviación estándar

## RESUMEN

Las células NG2, consideradas una de las cuatro principales células gliales en el cerebro postnatal, reciben contactos funcionales desde neuronas GABAérgicas y Glutamatérgicas. En el presente trabajo, las células NG2 fueron registradas con la técnica de Patch-Clamp con el fin de analizar sus propiedades intrínsecas de membrana y su actividad sináptica durante el desarrollo postnatal en rebanadas de corteza somatosensorial de ratón transgénico NG2-DsRed.

Demostramos que tanto las propiedades intrínsecas de membrana incluyendo las corrientes de potasio y sodio son modificadas durante el desarrollo. En la segunda semana postnatal (PN), las células NG2 se caracterizaron en cuanto a sus propiedades pasivas observándose una resistencia de membrana de  $107.2 \text{ M}\Omega$  y un potencial de reposo de membrana hiperpolarizado ( $-80.4 \text{ mV}$ ). Las conductancias de potasio mostraron una relación I-V con una rectificación en la corriente de salida. Las corrientes de sodio fueron de gran amplitud y en la mayoría de los casos dieron origen a un pequeño e inmaduro potencial de acción. Sin embargo, a la cuarta semana PN, las células NG2 sufrieron importantes cambios: un aumento en el potencial de membrana de reposo; una disminución tanto en la resistencia de membrana como en la amplitud de las corrientes de sodio; un aumento en el componente persistente de las corrientes de potasio de salida y una relación lineal en su curva I-V.

Por otro lado, se ha sugerido que las células NG2 corticales parecen estar principalmente conectadas por sinapsis provenientes de interneuronas GABAérgicas. De este modo, estudiamos la transmisión GABAérgica de las células NG2 durante el desarrollo. Encontramos que la actividad sináptica disminuyó durante la cuarta semana PN, probablemente por una reducción en el número de sinapsis. De hecho, en presencia

del potente secretagogo rojo de rutenio, las corrientes postsinápticas miniatura fueron raramente observadas en la cuarta semana PN. Por otro lado, la morfología del cuerpo celular y procesos de estas células fue analizada con biocitina, en donde esta no parece cambiar durante el desarrollo postnatal. Finalmente, a nivel postsináptico, las células NG2 expresaron el mismo número de receptores GABA<sub>A</sub> funcionales durante el desarrollo PN, lo cual sugiere que la activación de estos receptores, en el estado de desarrollo de cuatro semanas PN, depende de GABA que difunde desde sinapsis neuronales distantes.

Nuestros resultados sugieren que el rol de las células NG2 en etapas tardías de desarrollo no es el mismo que el desempeñado en etapas tempranas, sin embargo queda por esclarecer cual es su real función dentro del circuito neuronal.

## SUMMARY

“NG2 cells: Intrinsic membrane properties and GABAergic synaptic activity”

NG2 cells, considered as a fourth major type of glia in the postnatal brain, receive functional glutamatergic and GABAergic synaptic contacts from neurons. In the present work, by using patch-clamp recordings we analysed both the membrane intrinsic properties and synaptic activity of NG2 cells in acute slices of the barrel cortex of NG2-DsRed transgenic mice during postnatal development.

We demonstrated that the membrane intrinsic properties including the expression of sodium and outward potassium currents of NG2 cells are modified during development. At the second postnatal (PN) week, NG2 cells showed a membrane resistance of 107.2 M $\Omega$  and a highly hyperpolarized membrane resting potential (-80.4 mV). The potassium conductances showed an outward rectifying I-V relationship. The sodium currents were large and in most of the cases, give rise to a small immature action potential. However, at the fourth postnatal week, NG2 cells underwent important changes: an increase in the membrane resting potential; a decrease in the membrane resistance as well as the sodium current amplitude; an increase in the sustained outward potassium current and a linear shape of the I-V curves.

Besides, neocortical NG2 cells seem to be mainly connected by synapses from GABAergic interneurons. We thus studied the GABAergic synaptic transmission of NG2 cells during development. We found that synaptic activity decreases at the fourth PN week, probably by a reduction in the number of synapses contacting these cells. Indeed, very few miniature postsynaptic currents were observed in the presence of the potent secretagogue ruthenium red, compared to those of NG2 cells at the second PN week. Also, the morphology of the cellular body and processes of these cells was

analyzed with biocytin and does not seem to change during postnatal development. Finally, in a postsynaptic level, NG2 cells express the same number of functional GABA<sub>A</sub> receptors during postnatal development, suggesting that the activation of these receptors, at the fourth PN week it is depending on GABA liberated from distant neuronal synapses.

Our results suggest that the role played by NG2 cells in later stages of development are not the same of that played in younger stages, but it remains unclear their real function in neuronal circuits.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Reseña general

Neuronas y células gliales constituyen los dos grupos de células mayoritarios del sistema nervioso central (SNC). A pesar de que existen varios tipos de células gliales en el SNC postnatal de mamíferos, sólo tres tipos han sido considerados los más importantes: astrocitos, oligodendrocitos y microglías. Sin embargo, a comienzos de los años 80, otro tipo de células gliales denominadas células NG2, se han posicionado como la cuarta glía del SNC. En un comienzo la distinción entre estas células y astrocitos no era un tema zanjado completamente, pero una creciente evidencia las mostraron como células progenitoras capaces de generar oligodendrocitos mielinizantes, astrocitos e incluso neuronas (Nishiyama et al., 2009). La disyuntiva quedó esclarecida gracias a los avances en biología molecular que permitieron el desarrollo de animales transgénicos, realizándose una gran variedad de experimentos para mapear el linaje de estas células, de modo que hoy es ampliamente aceptado que las células NG2 constituyen un nuevo y diferente tipo de célula glial con características de células progenitoras multipotenciales (Nishiyama et al., 2009).

Tal vez una de las particularidades más relevantes de estas células es que han roto el paradigma que remite la transmisión sináptica a una comunicación exclusivamente entre neuronas. Las células NG2, además de extender sus procesos a los nodos de Ranvier y sinapsis, reciben contactos sinápticos directos de las neuronas (Butt et al., 1999). De modo que la integración de estas células a la red neuronal confiere un nuevo espectro de posibles funciones atribuibles a estas células, donde ya no sólo quedan remitidas a la formación de células mielinizantes. Es por esto, que el estudio de

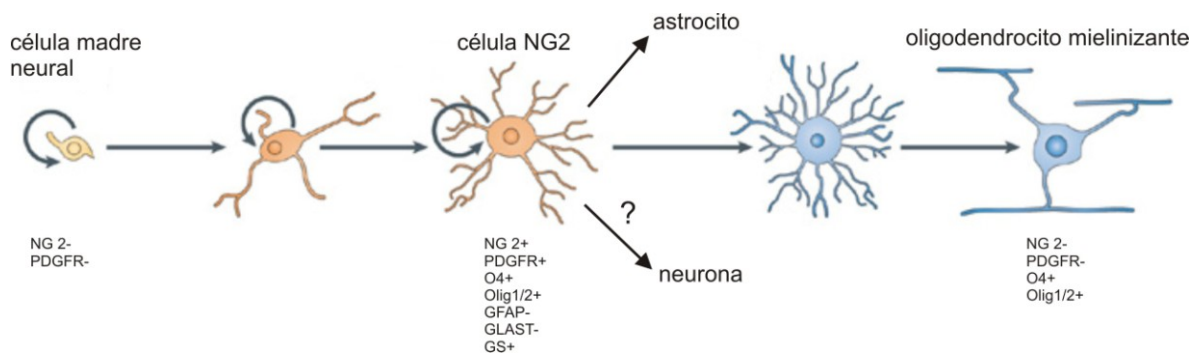
las características y/o propiedades electrofisiológicas de las células NG2 podría ser una estrategia útil para esclarecer la finalidad de la interacción neurona-célula NG2.

## 1.2 Características de las células NG2

### 1.2.1. Marcadores celulares y origen

Estas células se han identificado principalmente por la expresión de dos marcadores celulares: el proteoglicán condroitín sulfato NG2 y el receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ) (Nishiyama et al., 1996). La molécula NG2, que posee un centro glicoproteico de 300 kDa, está formada por una pequeña cola citoplasmática, un dominio transmembrana simple y un gran dominio extracelular. El dominio extracelular contiene una región rica en serina y glicina por el cual las cadenas de condroitín sulfato están unidas (Nishiyama et al., 1991). Esta proteína de superficie celular permitió a Stallcup y colegas, aislar una población de células precursoras no completamente diferenciadas, las denominadas células NG2, que exhibían propiedades tanto de neuronas (N) como de glías (G) (Stallcup et al., 2002). Las células NG2, consideradas como pertenecientes al linaje de los oligodendrocitos, comparten marcadores con estos últimos como por ejemplo los factores de transcripción Olig1 y Olig2 (Lu et al., 2002; Zhou y Anderson, 2002); Sox10 (Kitada y Rowitch, 2006); y O4 (Reynolds y Hardy, 1997). Por otro lado, las células NG2 son antigénicamente distintas de astrositos, ya que no expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ni el transportador glial de glutamato-aspartato (GLAST) (Bignami et al., 1972; Furuta et al., 1997). Sin embargo, presentan niveles bajos de expresión de la enzima glutamina sintetasa (GS), descrita como una enzima típicamente astrocitaria (Polito y Reynolds, 2005).

Las células NG2 derivan de células neuronales madres, las cuales no expresan NG2 ni PDGFR $\alpha$  (Nishiyama et al., 2009). Son originadas principalmente de fuentes ventrales (eminencia ganglionar medial y la región entopeduncular anterior), donde luego se distribuyen gradualmente por todo el telencéfalo. Un segundo grupo deriva de las áreas ganglionares lateral y/o caudal y finalmente, una tercera ola surge de la corteza postnatal (Kessaris et al., 2006).



**Fig. 1. Desarrollo de las células NG2 y marcadores bioquímicos.** Adaptado de Nishiyama et al., 2009. Nature Reviews Neuroscience

### 1.2.2 Morfología

Por medio de marcajes con anticuerpo anti-NG2 se ha podido estudiar la morfología de las células NG2 (Nishiyama et al., 2005). Estas se caracterizan por presentar un pequeño cuerpo celular del cual se extienden diversos procesos (ramificaciones) largos y delgados, los que a su vez, se bifurcan una o dos veces, formando un campo de procesos simétricos. Asimismo, un estudio reciente describe que durante la mitosis, las células NG2 de ratón adulto de la neocorteza, mantienen sus características morfológicas, tales como sus múltiples y complejos procesos (Ge et al., 2009).



## 1.3 Función

### 1.3.1 Generación de múltiples tipos celulares

Las células NG2 están ampliamente distribuidas tanto en la sustancia blanca como en la gris; en donde el principal rol que se les atribuye es el de generar oligodendrocitos mielinizantes, lo cual ha sido demostrado, en una primera instancia por experimentos de pulso y caza con bromo-deoxiuridina (BrdU) (Horner et al., 2000), y luego por el empleo del sistema de recombinación Cre-Lox, en donde ratones NG2-Cre<sup>tg</sup> cruzados con líneas de ratones Cre-reportero, permitieron seguir el destino de las células NG2 *in vivo*, superándose el problema que generaba la pérdida de la expresión de NG2 antes de la completa diferenciación de los oligodendrocitos (Zhu et al., 2008). Con esta misma estrategia, se ha demostrado que las células NG2 si bien tienen como principal destino la generación de oligodendrocitos, también son capaces de diferenciarse a un subgrupo de astrocitos protoplásmicos en la sustancia gris (Zhu et al., 2008). El devenir de estas células a neuronas es controversial. La mayoría de las evidencias sugieren que las células NG2 de la zona subvetricular, región en donde se generan las neuronas, no son la mayor fuente de neuronas, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que exista otra región capaz de generar neuronas (Rivers et al., 2008).

A la par de las evidencias que señalan a las células NG2 como células multipotenciales, existen unas cuantas otras que muestran que estas células persisten en gran número después de que los oligodendrocitos son generados durante el desarrollo, sugiriendo una participación en la formación de oligodendrocitos remielinizantes, tal como lo indican los trabajos, en donde las células NG2 proliferan y se diferencian a oligodendrocitos en respuesta a lesiones experimentales desmielinizantes (Watanabe et al., 2002; Reynolds et al., 2002). Además, se ha observado que estas células responden

rápidamente frente a daños en el SNC, sugiriendo que su compleja y ramificada morfología podría estar especializada en monitorear cambios en la integridad del SNC, como ha sido descrito para astrocitos (Butt et al., 2002). Concretamente, extienden sus procesos a los nodos de Ranvier en la sustancia blanca, donde están estratégicamente localizadas para detectar señales desde los axones, las cuales podrían codificar para su diferenciación (Butt, et al., 1999).

### 1.3.2 Rol de la proteína NG2 en el crecimiento axónico

Los primeros estudios mostraron que la molécula NG2 aislada puede inhibir el crecimiento axónico y del cono, provocando su colapso (Chen et al., 2002). Sin embargo, se ha observado que los ratones knock-out para NG2 no muestran un cambio significativo en la extensión del axón en comparación al ratón wild-type (de Castro et al., 2005). Además, cuando la molécula está en la superficie de células NG2 en cultivo, esta promueve la regeneración axonal (Yang et al., 2006). Estos resultados contradictorios no permiten establecer con certeza el rol de la proteína NG2, aunque una relación entre la expresión de la proteína y el crecimiento axonal pareciera existir.

## 1.4 Propiedades electrofisiológicas de membrana

Por mucho tiempo, las células NG2 fueron clasificadas como una subpoblación de astrocitos que carecían de la proteína GFAP y fueron llamadas células complejas por su complejo perfil en la curva que relaciona la corriente (I) y el potencial (V). Sin embargo, gracias a la utilización de la electrofisiología en combinación con inmunohistoquímica se ha podido caracterizar estas células y describir su perfil como una glía única.

Las células NG2 presentan una alta resistencia de membrana y un potencial de membrana hiperpolarizado, entre -70 y -90 mV (Lin y Bergles et al., 2002). También se

caracterizan por la presencia de grandes conductancias de potasio dependientes de voltaje, compuestas por una corriente de tipo A ( $I_A$ ) y por una corriente rectificadora retardada ( $I_{KDR}$ ). Además, expresan corrientes de potasio de entrada, resultado de la expresión de los canales de potasio rectificadores de entrada ( $K_{IR}$ ) y canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ). En conjunto a las conductancias de potasio, las células NG2 expresan pequeñas corrientes de sodio ( $I_{Na}$ ) (Lin y Bergles et al., 2002). Por otro lado, canales de calcio sensibles a voltajes también han sido descritos en las denominadas células complejas en hipocampo de ratón (Akopian et al., 1996). Además de la expresión de diversos canales, las células NG2 se caracterizan por no estar acopladas vía uniones en hendidura como los astrocitos, y por no hacer descargas sostenidas de potenciales de acción como las neuronas (Lin y Bergles et al., 2002). Sin embargo, un potencial de acción inmaduro puede aparecer durante una despolarización de la membrana (Chittajalu et al., 2004).

#### 1.4.1 Canales de potasio de salida

La identificación de los canales de potasio presentes en las células NG2 ha sido realizada principalmente en las denominadas células precursoras de oligodendrocitos (OPC), la versión en cultivo de las células NG2. Se ha observado que las OPC expresan canales de potasio dependientes de voltaje  $Kv1$ , siendo las subunidades  $Kv1.4$ ,  $Kv1.5$  y  $Kv1.6$  las más abundantes (Schmidt et al., 1999). En un intento por relacionar la expresión de los canales de potasio con su(s) posible(s) función(es) fisiológica(s), se ha observado que una atenuación de las corrientes de potasio de salida produce una inhibición de la proliferación de las OPC (Gallo et al, 1996). Asimismo, corrientes de potasio rectificadoras de salida son expresadas en mayor cantidad en las OPC proliferativas que en OPC no proliferativas, debido a una sobreexpresión de las subunidades  $Kv1.3$  y  $Kv1.5$  en la fase  $G_1$  del ciclo celular (Chittajallu et al., 2002). Por

otro lado, también se ha asociado la expresión de estas corrientes al desarrollo postnatal tanto en las denominadas células complejas y las células NG2, reportándose una disminución de las corrientes de potasio de salida y un aumento en las corrientes de potasio rectificadoras de entrada (Kressin et al., 1995; Zhou et al., 2006). Finalmente, en relación a la diferenciación de las células NG2, se ha descrito que existe una disminución en la  $I_{KDR}$  cuando las células NG2 se convierten en pre-oligodendrocitos (Chittajallu et al., 2004).

#### 1.4.2 Canales de sodio

Las células NG2 expresan corrientes de entrada de sodio rápidas y transitorias que son dependientes de voltaje y sensibles a tetrodoxina (TTX), sin embargo la amplitud de estas corrientes es 10 veces menor que aquellas presentes en neuronas (Lin y Bergles et al., 2002). Estas conductancias han sido también observadas en células oligodendrocito-astrocito tipo 2 (O-2A) (Barres et al., 1990b) y en las denominadas células complejas (Kresin et al., 1995). La expresión de la  $I_{Na}$  está correlacionada con un potencial de membrana de reposo ( $E_m$ )  $\sim 25$  mV más despolarizado en comparación a células que no expresan la  $I_{Na}$ , lo cual implica que estas corrientes contribuyen con el despolarizado  $E_m$  presente en las células NG2 (Xie et al., 2007). En un intento por relacionar las  $I_{Na}$  con una función fisiológica, recientemente se ha descrito que la expresión de un componente persistente de la  $I_{Na}$ , sensible a QX314, inhibidor de canales de sodio intracelular, estaría relacionado con la respuesta mediada por la activación de receptores  $GABA_A$  e influjo de  $Ca^{+2}$ , la cual tendría un rol en la migración de las células NG2 (Tong et al., 2009).

## 1.5 Comunicación sináptica entre células NG2 y neuronas

Además de su capacidad progenitora, las células NG2 participan en la señalización sináptica y plasticidad en el cerebro. En rebanadas de cerebro, se ha descrito que estas células expresan receptores funcionales ionotrópicos glutamatérgicos (NMDA y AMPA), nicotínicos y GABAérgicos ( $GABA_A$ R), algunos de los cuales son activados por liberación de neurotransmisores en estructuras tipo sinápticas formadas con neuronas (Bergles et al., 2000; Lin and Bergles, 2004; Jabs et al., 2005; Lin et al., 2005; Káradóttir et al., 2005, Ziskin et al. 2007; Kukley et al., 2007; Velez-Fort et al., 2009). Se han descrito sinapsis funcionales entre neuronas y células NG2 en hipocampo, cerebelo, corteza, cuerpo caloso y el nervio óptico (Bergles et al., 2000; Lin and Bergles, 2004; Jabs et al., 2005; Lin et al., 2005; Ziskin et al. 2007; Kukley et al., 2007; Káradóttir et al., 2008; Tanaka et al., 2009). Además, se ha descrito que las sinapsis entre neuronas hipocampales y células NG2 sufren una forma de potenciación a largo plazo, dependiente de receptores AMPA permeables a  $Ca^{2+}$  (Ge et al., 2006).

### 1.5.1 Posibles roles de la sinapsis

Desde los primeros reportes sobre los contactos sinápticos excitatorios e inhibitorios de las células NG2, se ha tratado de atribuir una significación funcional a las sinapsis entre neuronas y las células NG2. Se ha especulado sobre el posible rol de las sinapsis en la migración, proliferación y diferenciación de las células NG2, pero nada definitivo ha sido demostrado por el momento (Gallo et al., 2008). Las células NG2 podrían migrar mientras reciben contactos sinápticos, tal como ha sido descrito para las interneuronas en la capa molecular del giro dentado (Chittajallu et al., 2007). Asimismo, se ha descrito que glutamato promueve la migración de las OPC vía un complejo proteico proteolipídico  $\alpha_v$  integrina/mielina (Gudz et al., 2006), lo cual podría

indicar que la liberación sináptica de neurotransmisores actúa como un señal clave del proceso de migración.

Las células NG2 representan la población celular más proliferativa del cerebro postnatal. Cerca del 50% de las células se dividen activamente cada 3 días (Kukley et al., 2008), en donde, según las últimas evidencias, inervaciones sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas promueven la proliferación de estas células. Aún más, las células NG2 proliferantes mantienen sus sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas durante la división celular y las transfieren a su progenie (Kukley et al., 2008; Ge et al., 2009). Sin embargo, no existen antecedentes en relación a la oligodendrogénesis y las sinapsis presentes en las células NG2, sólo se ha descrito que la activación de receptores AMPA prevendría la diferenciación de las OPC (Gallo et al., 1996).

#### 1.5.2 Sinapsis GABAérgica en la neocorteza

La neocorteza de los mamíferos es una estructura generada a partir de células proliferantes ventriculares que progresivamente se dividen y forman áreas funcionales específicas como las áreas somatosensorial y motor primaria, comprometidas con el procesamiento de la información sensorial y la transmisión de comandos motores (Inan y Crair, 2007). Anatómicamente está organizada en cuatro lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital. La corteza somatosensorial, que es el objeto de estudio del presente trabajo, se divide en seis capas celulares diferentes: capa I o capa molecular, capa II o capa granular externa, capa III o capa piramidal externa, capa IV o capa granular interna, capa V o capa piramidal interna y capa VI o capa multiforme. Las neuronas con somas piramidales están localizadas principalmente en las capas II, III, V y VI y son principalmente glutamatérgicas. En la capa IV las principales células excitadoras son las neuronas estrelladas glutamatérgicas distribuidas en forma muy

compacta. Por otro lado, las interneuronas que utilizan GABA como neurotransmisor, están distribuidas en todas las capas y constituyen un grupo celular muy heterogéneo en cuanto a sus propiedades electrofisiológicas, morfológicas y bioquímicas (Cauli et al., 1997). La corteza somatosensorial recibe aferencias desde el tálamo, el cual como centro de relevo, actúa de nexo entre los receptores sensoriales (propioceptores, mecano receptores y receptores de la temperatura y dolor) y la corteza. Las neuronas ubicadas en la corteza somatosensorial que reciben un determinado estímulo sensorial (calor, dolor, etc.) están organizadas somatotópicamente: el cuerpo completo está representado en un arreglo ordenado de inputs somatosensoriales. De esta forma se ha acuñado el término homúnculo cortical para describir el espacio sensorial relativo que nuestras partes corporales representan en la corteza. En roedores también existe una organización particular, las neuronas de la capa IV de la corteza somatosensorial están organizadas en un patrón de unidades citoarquitectónicas multicelular llamado barriles, en donde cada barril está relacionado de manera uno a uno con un bigote contralateral de la cara del animal (Woolsey et al., 1975)

La inervación sináptica de las células NG2 de la neocorteza encontrada por Chittajallu et al. (2004) describe unas pocas corrientes espontáneas mediadas por receptores AMPA en una proporción de células muy reducida. Por otro lado, recientemente, Tanaka et al. (2009) describieron que células Nestina<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup>, también en la neocorteza, presentaban mayoritariamente actividad sináptica GABAérgica y demostraron la existencia de contactos sinápticos putativos con interneuronas positivas a parvalbúmina, una proteína que une calcio. En este estudio, la frecuencia de las corrientes espontáneas GABAérgicas fue de 0.1 a 0.2 eventos/min en animales de más de ocho semanas postnatales. Estos resultados obtenidos en ratones adultos son diferentes a los datos preliminares encontrados en nuestro laboratorio, en donde se

observó una fuerte actividad sináptica GABAérgica durante las dos primeras semanas postnatales (30 eventos/min, Velez-Fort et al., datos no publicados).

Los resultados descritos anteriormente sobre las características electrofisiológicas de las células NG2, sugieren fuertemente que la regulación de las conductancias de potasio y sodio, y su actividad sináptica GABAérgica tiene importantes consecuencias en su destino. En el presente trabajo, se estudió las propiedades intrínsecas de membrana (propiedades pasivas y las conductancias de potasio y sodio) y la actividad sináptica GABAérgica durante el desarrollo postnatal de la corteza somatosensorial de ratón.

#### 1.6 Hipótesis

Las corrientes sinápticas GABAérgicas de las células NG2 cambian en concomitancia con sus propiedades intrínsecas de membrana durante el desarrollo postnatal de la corteza somatosensorial de ratón.

#### 1.7 Objetivo general

Caracterizar electrofisiológicamente las células NG2 de la corteza somatosensorial de ratón durante la segunda y cuarta semana PN para establecer posibles cambios en sus propiedades electrofisiológicas durante el desarrollo PN.

#### 1.8 Objetivos específicos

- 1) Comparar las propiedades intrínsecas de membrana con énfasis en las propiedades pasivas (propiedades inherentes a la célula), las corrientes de potasio y de sodio de las células NG2 neocorticales durante la segunda y cuarta semana postnatal.



- 2) Comparar las corrientes sinápticas espontáneas y miniaturas de las células NG2 neocorticales durante la segunda y cuarta semana postnatal.
- 3) Comparar la morfología de las células NG2 neocorticales durante la segunda y cuarta semana postnatal.
- 4) Comparar la respuesta de los receptores GABA<sub>A</sub> de las células NG2 neocorticales a aplicaciones exógenas de muscimol, un agonista de estos receptores, durante la segunda y cuarta semana postnatal.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Electrofisiología

- Todas las sales se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, USA)
- 4-aminopiridina (4AP) Sigma-Aldrich (St-Louis, USA)
- cloruro de tetrametilamonio (TEA-Cl) Sigma-Aldrich (St-Louis, USA)
- tetrodoxina (TTX) Latoxan (Valence, France)
- 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoiil-benzo[F]quinoxalina (NBQX) Ascent Scientific (Weston-super-Mare, UK)
- ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico (D-AP5) Ascent Scientific (Weston-super-Mare, UK)
- Rojo de rutenio Tocris Cookson (Bristol, UK)
- piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato (PPADS) Tocris Cookson (Bristol, UK)
- LY341495 Tocris Cookson (Bristol, UK)
- CPG55845 Tocris Cookson (Bristol, UK)
- Muscimol Tocris Cookson (Bristol, UK)

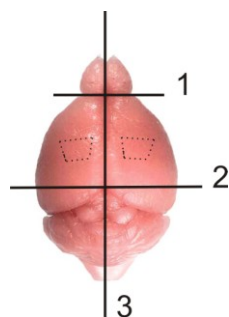
#### 2.1.2 Inmunohistoquímica

- Alexa488 Molecular Probes (Eugene, USA)

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Preparación de rebanadas de cerebro

Todos los experimentos realizados siguieron las normas institucionales y de la Unión Europea respecto al cuidado y uso de animales de laboratorio (Consejo directivo 86/609EEC). Los animales (C57/Black6), ratones transgénicos NG2-DsRed (Ziskin et al., fueron mantenidos en un bioterio con períodos de luz y oscuridad de 12 hrs cada uno. Debido a la dificultad de distinguir el sexo en ratones de dos semanas PN, este no fue determinado, por lo que no constituyó una variable de estudio. Las rebanadas de la corteza somatosensorial, de un espesor de 300  $\mu\text{m}$ , fueron obtenidas de ratones transgénicos NG2-DsRed a la segunda y cuarta semana postnatal. Para preservar las conexiones sinápticas neuronales intracorticales, fueron realizados cortes parasagitales con un ángulo de  $10^\circ$  (fig. 2). Las rodajas fueron preparadas en un solución de hielo fría que contenía (en mM): sacarosa 215, KCl 2.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{NaHCO}_3$  26, glucosa 20, piruvato 5,  $\text{CaCl}_2$  1 y  $\text{MgCl}_2$  7, saturado con 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  a  $4^\circ\text{C}$ , y luego fueron incubadas por 20 minutos a  $33^\circ\text{C}$  en una solución que contenía NaCl 126 mM en reemplazo de sacarosa. Finalmente, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro perfundida con esta última solución a 2-3 ml/min a  $30^\circ\text{C}$ .



**Fig. 2. Cortes de cerebro de ratón.** Corteza somatosensorial (área punteada). 1 y 2, cortes para eliminar el bulbo olfatorio y cerebelo, respectivamente. 3, corte para separar los hemisferios. Luego de la separación de los hemisferios cada fragmento de cerebro es dispuesto sobre la plataforma de disección del vibrátomo la cual posee un ángulo de inclinación de  $10^\circ$ .

### 2.2.2 Electrofisiología

Las células gliales de la capa V de la corteza somatosensorial, fueron identificadas por medio de la fluorescencia de la proteína DsRed expresada por las células NG2 del ratón transgénico NG2-DsRed, cuya longitud de onda de excitación y emisión fueron obtenidas usando filtros de 560 nm y 620 nm, respectivamente. Las células fueron visualizadas usando un sistema de video microscopía IR-DIC con un objetivo de 40X con inmersión. La imagen fue detectada con una cámara CCD (sensible a IR) y proyectada en un monitor. Las pipetas de patch-clamp utilizadas alcanzaron una resistencia entre 2.8-3.2 M $\Omega$ .

Para estudiar el potencial de membrana de reposo ( $E_m$ ), resistencia de membrana ( $R_m$ ), las  $I_{K^+}$  y las variaciones de potencial (modo current-clamp); las pipetas fueron llenadas con una solución intracelular que contenía (en mM): KCl 130, EGTA 5, CaCl<sub>2</sub> 0.5, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, Na<sub>2</sub>ATP 2, Na-GTP 0.2, Na<sub>2</sub>-fosfocreatina 10 (pH $\approx$ 7.3). EGTA fue añadido para mantener las concentraciones de calcio fisiológicas de la célula (100 nM). Para estudiar la  $R_m$ , resistencia en serie ( $R_s$ ), capacitancia ( $C_m$ ),  $I_{Na^+}$  (modo voltage-clamp), actividad sináptica espontánea, actividad sináptica miniatura, y los receptores GABA<sub>A</sub>, se utilizó una solución intracelular en la cual KCl fue reemplazado por CsCl 130 mM, 4AP 10 mM y TEA-Cl 5 mM los cuales bloquean en gran parte las conductancias de K<sup>+</sup> de las células NG2. Además, fue aplicado en el baño Ba<sup>2+</sup> 1 mM, otro bloqueador de conductancias de potasio. Los experimentos hechos en presencia de Ba<sup>2+</sup> 1 mM están indicados en las leyendas de las figuras respectivas. Asimismo, para estudiar las corrientes sinápticas miniaturas, además se aplicó en el baño, TTX 0.5  $\mu$ M para bloquear los canales sodio dependientes de voltaje, NBQX 10  $\mu$ M (antagonista de receptores AMPA), D-AP5 50  $\mu$ M (antagonista de receptores NMDA) y rojo de rutenio 75  $\mu$ M, un potente secretagogo que promueve la

liberación vesicular de neurotransmisores. Por último, para estudiar las corrientes mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>, se aplicó en el baño muscimol 50 μM (agonista de receptores GABA<sub>A</sub>), TTX 0.5 μM, D-AP5 50 μM, NBQX 10 μM, PPADS 30 μM (antagonista de receptores purinérgicos), LY341495 50 μM (antagonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos y CPG55845 5 μM (antagonista de los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>)

Se obtuvieron sellos de alta resistencia (>1 GΩ) antes de entrar en configuración célula entera. Los registros fueron realizados sin compensar las R<sub>s</sub>, sin embargo, estas fueron monitoreadas durante el registro y las células en las cuales la resistencia en serie variaba más de un 30% fueron descartadas.

### 2.2.3 Adquisición de datos y análisis

Los registros en configuración célula entera fueron obtenidos usando Multiclamp 700B, filtrados a 5 kHz y digitalizados a 20 kHz, de modo de eliminar señales que no son de la célula y potenciar las corrientes sinápticas. Los datos digitalizados fueron analizados *off-line* usando el programa pClamp 10.1. Sólo fueron consideradas aquellas células con una R<sub>s</sub> menor a 30 MΩ. El E<sub>m</sub> fue determinado cuando I=0 pA en respuesta a pulsos de potencial de -100 mV a +40 mV y un potencial mantenido de -90 mV. El R<sub>m</sub>, R<sub>s</sub> y C<sub>m</sub> fueron calculados a partir de las corrientes generadas por pulsos de -5 mV o -10 mV. La R<sub>m</sub> fue obtenida con la ecuación:  $R_m = \Delta V / I$ , donde I es la corriente continua del pulso. La R<sub>s</sub>, correspondiente a la resistencia de la pipeta durante el registro, fue calculada con la ecuación:  $R_s = \Delta V / I$ , donde I es el pico de la corriente transitoria calculada fijando la caída de corriente ( $\tau$ ) a una ecuación exponencial de grado 1. La C<sub>m</sub> fue obtenida de la ecuación  $C_m = \tau / R_s$ . Tanto para la I<sub>k+</sub> como para la I<sub>Na+</sub>, las células fueron sostenidas a un potencial de -90

mV y luego fueron medidas sus corrientes al comienzo (pico) o final (continua) en respuesta a pulsos de 400 mseg desde -100 mV a +40 mV. Las células registradas en modo current-clamp se les compensó la resistencia de la pipeta y fueron registradas durante inyecciones de corrientes de 200 pA a partir de un potencial sostenido de -70 mV.

Las corrientes sinápticas tanto espontáneas como miniaturas fueron analizadas con un umbral de detección de  $4 \times \Delta SD$ , siendo  $\Delta SD$  la variación de la desviación estándar y una estimación del ruido de la traza. Las corrientes inducidas por muscimol (agonista de receptores GABA<sub>A</sub>) fueron obtenidas manteniendo el potencial de la célula registrada a -90 mV. Las densidades de corrientes ( $I_D$ ) fueron calculadas a partir de la ecuación  $I_D = I/C_m$ , donde  $I$  corresponde a la amplitud máxima de la corriente medida.

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  s.e.m., donde s.e.m es el error estándar del promedio. La significancia estadística fue determinada usando el test no paramétrico Mann–Whitney, con el programa GraphPad InStat. En cada experimento se utilizaron al menos 3 animales, en donde por cada animal se utilizaron un promedio de 6 rebanadas, y por cada rebanada un promedio de 5 a 6 células, siendo  $n$  el número de células.

#### 2.2.4 Inmunohistoquímica

La morfología de las células NG2 fue determinada añadiendo biocitina 5 mM a la pipeta de patch. La biocitina ( $\epsilon$ -biotinil-L-lisina) es una pequeña molécula utilizada como trazador neuroanatómico. Una vez en configuración célula entera, la biocitina difunde desde la pipeta al citoplasma de la célula registrada. Luego de 15 minutos de registro, las rebanadas fueron fijadas en paraformaldehído 4% en PBS a 4°C por toda la noche, lavadas 3 veces con PBS por 10 minutos e incubadas con estreptavidina

conjugada con Alexa488 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en PBS Tritón 0.3% por 4 horas. Finalmente, las rebanadas fueron lavadas con PBS y montadas con Vectashield, un medio de montaje para fluorescencia. La medición del diámetro del soma, la distancia de ramificación de los procesos y su área de cobertura fue realizado con el programa ImageJ 1.37v (Wayne Rasand, National Institutes of Health, USA).

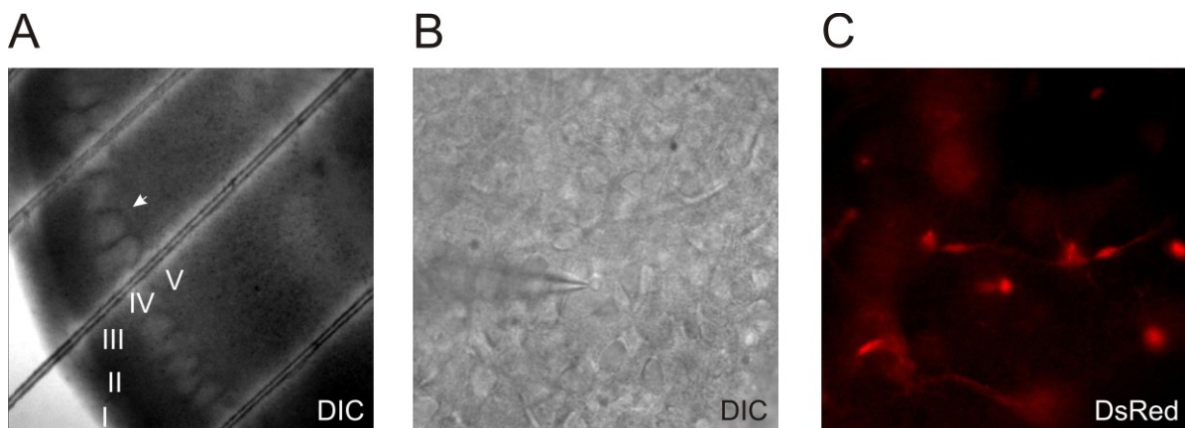
#### 2.2.5 Microscopía confocal

Todas las rebanadas fueron visualizadas con un microscopio confocal LSM 510 (Oberkochen, Germany). Las secciones ópticas (1  $\mu\text{m}$ ) de las imágenes confocales fueron secuencialmente adquiridas usando un objetivo 63X (aceite) con el programa LSM-510 (Oberkochen, Germany). Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ 1.37v (Wayne Rasand, National Institutes of Health, USA).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Propiedades intrínsecas de membrana de las células NG2 durante el desarrollo postnatal

Las células NG2 fueron caracterizadas electrofisiológicamente estudiando sus propiedades pasivas, las corrientes de potasio de salida y las corrientes de sodio entre la segunda y cuarta semana PN, ya que a estos estados de desarrollo PN se observó la máxima y mínima actividad sináptica GABAérgica, respectivamente (Vélez-Fort, datos no publicados; Tanaka et al., 2009). Con el fin de lograr este objetivo, las células NG2 de la capa V de la corteza somatosensorial (Fig. 1A y 1B) fueron registradas en configuración célula entera utilizando la técnica de patch-clamp, en los modos voltage-clamp o current-clamp. Para la identificación de las células se utilizó el ratón transgénico NG2-DsRed, que expresa la proteína fluorescente DsRed en las células NG2 (fig. 1C).



**Fig. 3. Identificación de las células NG2.** A, en número romano las capas y barriles (flecha) de la corteza somatosensorial de ratón, aumento de 10X. B, capa V, aumento de 40X. C, fluorescencia de la proteína DsRed de células NG2.



### 3.1.1 Propiedades pasivas

Se analizaron las propiedades de membrana de las células NG2 en distintas condiciones de registro las cuales están resumidas en la Tabla 1. Las células NG2 registradas en una solución intracelular de KCl mostraron un potencial de membrana de reposo altamente hiperpolarizado, más aún en ratones de cuatro semanas (test Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). En la misma solución intracelular, las células NG2 de ratón de cuatro semanas exhibieron una pequeña resistencia de membrana ( $R_m$ ) probablemente debido a un aumento en las corrientes de potasio de entrada ( $I_{KIR}$ ; Zhou et al., 2006; Tabla 1). De modo de aumentar la  $R_m$ , mejorar el clamp de las células y así las condiciones de registro, se probó una solución intracelular con CsCl, que contenía 4AP y TEA-Cl, los cuales bloquean una gran proporción de las conductancias de potasio desde el interior de la célula. Las razones por las cuales es necesario aumentar la  $R_m$ , son las siguientes:

Una corriente medida en configuración célula entera a través de una pipeta de patch-clamp corresponde a la corriente de la membrana de la célula registrada cuando la resistencia de membrana de la célula es considerablemente mayor que la resistencia en serie (resistencia dada por la pipeta). Según la siguiente ecuación:

$$I = V_h / (R_s + R_m)$$

donde  $I$  es la corriente medida,  $V_h$ , el potencial al cual está mantenida la célula,  $R_s$ , la resistencia en serie y  $R_m$  la resistencia de membrana. Si  $R_s$  y  $R_m$  tienen la misma magnitud, el aislamiento eléctrico de la célula respecto al espacio extracelular puede que no se alcance.

Tal cual lo esperado, se aumentó significativamente la  $R_m$  en ambos estados postnatales, alcanzando valores similares a los de neuronas en la cuarta semana PN (Tabla 1). Con el objetivo de optimizar aún más las condiciones de registro aumentando

la  $R_m$ , se aplicó  $Ba^{2+}$  1 mM en el baño, otro bloqueador de conductancias de potasio. En esta condición, la  $R_m$  de las células NG2 de los animales de dos y cuatro semanas PN se incrementó significativamente, alcanzado valores promedio de 1897  $M\Omega$  y 470  $M\Omega$ , respectivamente. Finalmente, se comparó la capacitancia de las células entre la segunda y cuarta semana PN en presencia de  $Ba^{2+}$  extracelular. No se observaron cambios significativos durante el desarrollo, lo cual sugiere que la morfología de las células podría no cambiar con la edad, ya que el valor de la capacitancia depende, en parte, del tamaño del soma y de la extensión y ramificación de los procesos de una célula.

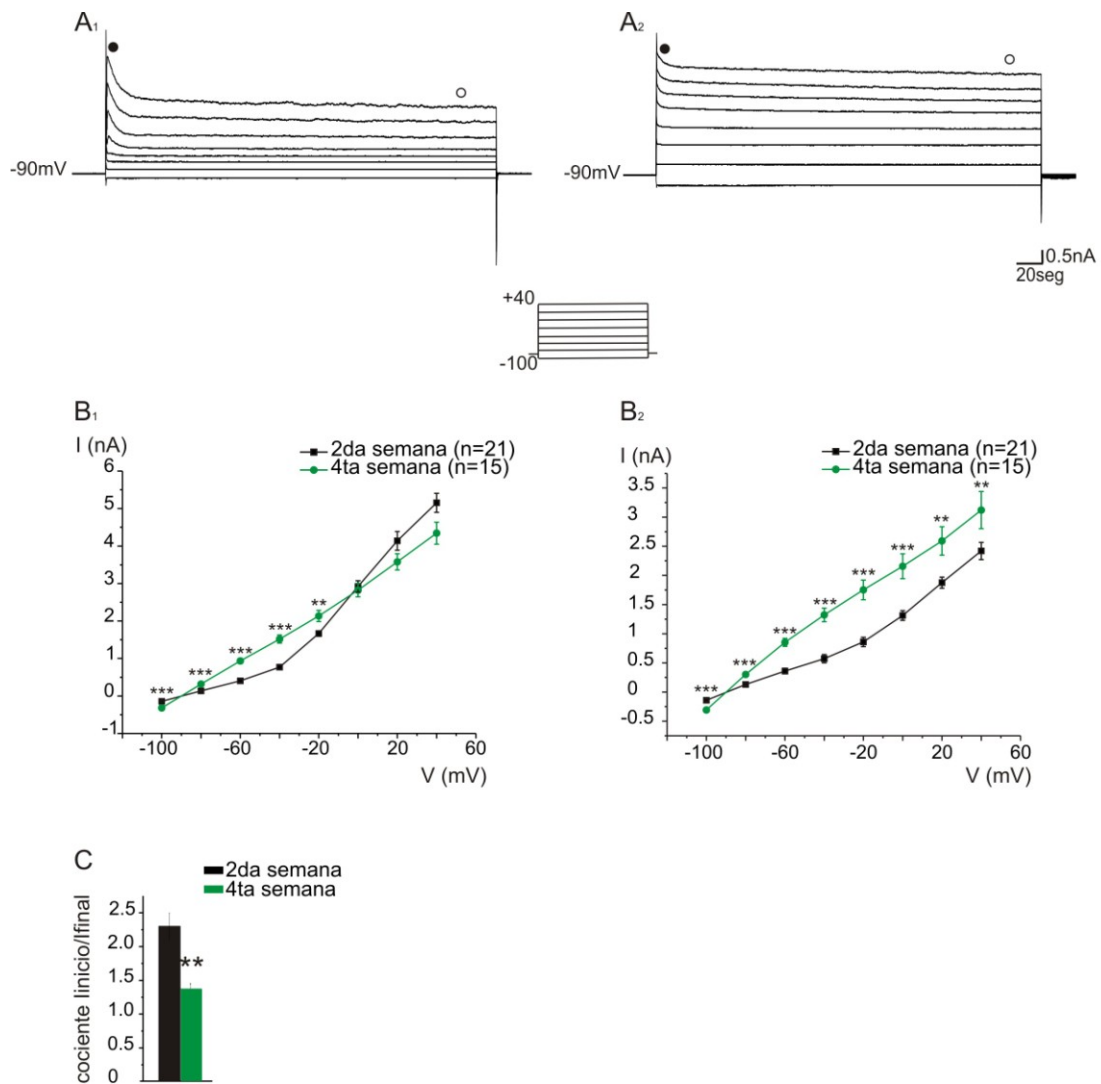
TABLA 1

	2 <sup>da</sup> semana	4 <sup>ta</sup> semana
Potencial de membrana de reposo (mV); solución intracelular: KCl 130 mM	-80.4±2.3 [-60.2 – -95.7]	-87.8±1.9* [-77.5 – -100.0]
Resistencia de membrana (MΩ); solución intracelular: KCl 130 mM	107.2±21.0 [14.4 – 383.0]	34.9±2.6** [24.4 – 57.5]
Resistencia de membrana (MΩ); solución intracelular: CsCl 130 mM, 4AP 10 mM, TEA-Cl 5 mM	855.1±230.9 [68.0 – 2168.8]	129.3±48.2** [23.7 – 522.6]
Resistencia de membrana (MΩ); solución intracelular: CsCl 130 mM, 4AP 10 mM, TEA-Cl 5 mM; solución extracelular: Ba <sup>2+</sup> 1 mM.	1896.9±500.5 [314.8 – 4792.7]	469.7±62.3** [254.7 – 832.9]
Capacitancia (pF); solución intracelular: CsCl 130 mM, 4AP 10 mM, TEA-Cl 5 mM; solución extracelular: Ba <sup>2+</sup> 1mM	39.5±2.4 [22.4 – 60.6]	38.7±3.5 [8.1 – 68.2]

Los valores en corchete indican el mínimo y máximo valor obtenido en cada medición. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 3.1.2 Corrientes de potasio ( $I_{K^+}$ )

De modo de caracterizar las  $I_{K^+}$ , se estudió las corrientes de potasio de salida, debido a que su expresión ha sido relacionada con la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Chittajallu et al., 2002 y 2005). Las células NG2 registradas con una solución intracelular de KCl fueron mantenidas a un potencial de -90 mV y fueron caracterizadas en respuesta a pulsos despolarizantes de 400 mseg. Las figuras 4A<sub>1</sub> y 4A<sub>2</sub> ilustran la típica respuesta de dos células NG2 a la segunda (4A<sub>1</sub>) y cuarta (4A<sub>2</sub>) semana PN, respectivamente. En los potenciales más despolarizantes, las células NG2 de la segunda semana PN exhibieron una corriente de salida con una fase transitoria rápida seguida de una fase sostenida (fig. 4A<sub>1</sub>). A la cuarta semana PN, sin embargo, la corriente presentó una única fase continua en 13 de 15 casos (fig. 4A<sub>2</sub>). La fase sostenida de la corriente aumentó significativamente en el ratón de cuatro semanas PN lo que indica un aumento en la expresión de las corrientes de potasio de salida (fig. 4B<sub>2</sub>). Como consecuencia, el cociente entre la corriente medida al inicio del pulso (círculo negro) y la corriente medida al final (círculo blanco) es menor en los animales en estado de desarrollo más avanzado (fig. 4C). La diferencia de expresión de las corrientes de potasio se observa claramente comparando las curvas I-V de la segunda y cuarta semana PN (fig. 4B<sub>1</sub> y 4B<sub>2</sub>). Las curvas I-V presentaron una fuerte rectificación de salida a la segunda semana PN (fig. 4B<sub>1</sub> y 4B<sub>2</sub>, curva negra), mientras que se tornaron lineales a la cuarta semana PN (fig. 4B<sub>1</sub> y 4B<sub>2</sub>, curva verde).



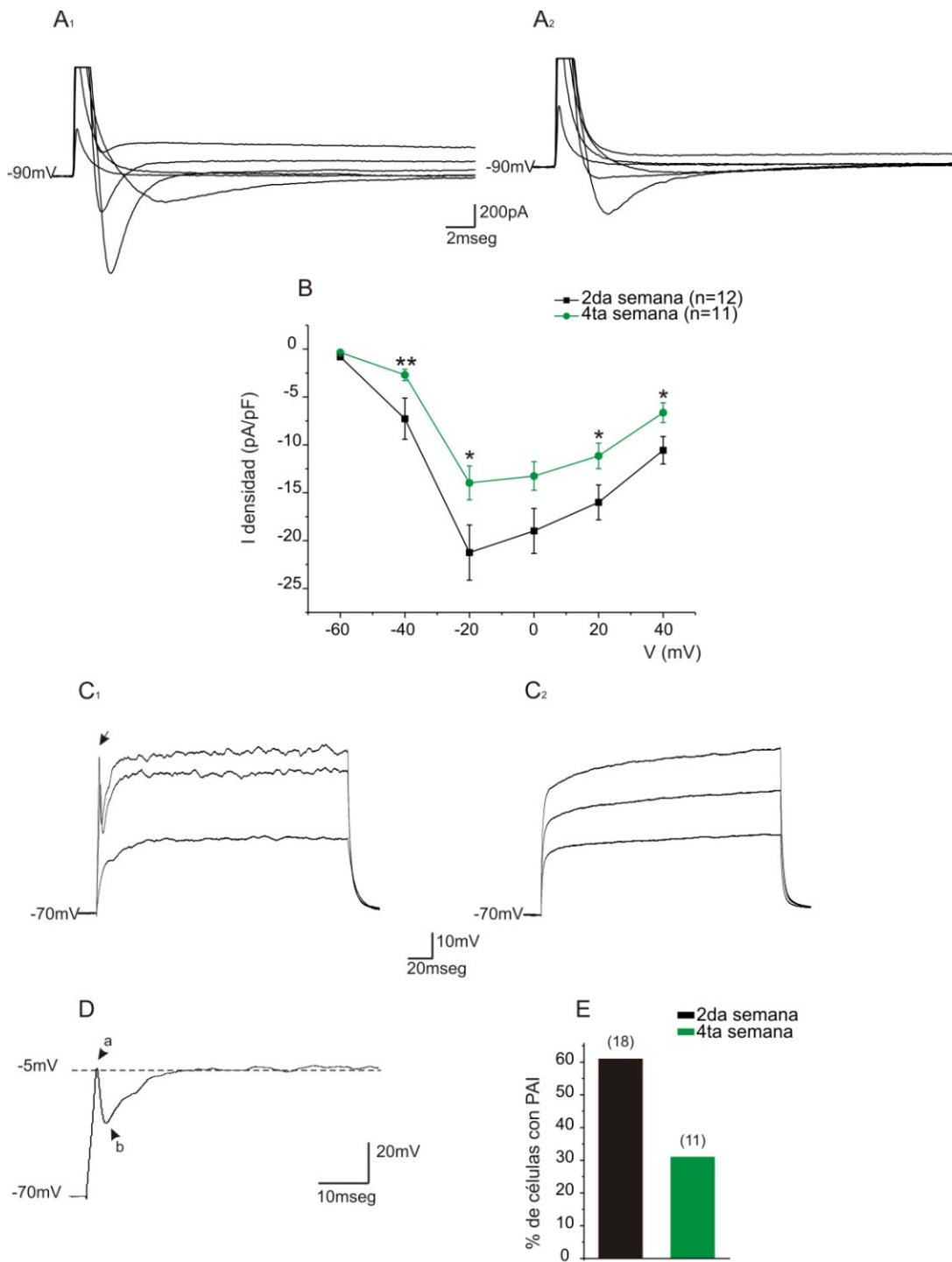
**Fig. 4. Corrientes de potasio de células NG2 durante el desarrollo PN.** A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, corrientes de células NG2 de ratón de PN9 (A<sub>1</sub>) y PN26 (A<sub>2</sub>), sostenidas a -90 mV, pulsos desde -100 a +40 mV, con incrementos de 20 mV. B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, relación I-V de las corrientes promedio medidas al inicio (círculo negro, 35 seg) (B<sub>1</sub>) y final (círculo blanco, 400 seg). C, histograma de la amplitud de las corrientes expresada como el cociente inicio/lfinal medidas a un pulso de 0 mV. n= número de células registradas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

### 3.1.3 Corrientes de sodio ( $I_{Na^+}$ )

Las células NG2 expresan canales de sodio dependiente de voltaje, tal como las neuronas (Lin y Bergles, 2002; fig. 5A<sub>1</sub> y 5A<sub>2</sub>). De modo de aislar la  $I_{Na^+}$  de la  $I_{K^+}$ , se utilizó una solución intracelular de CsCl, que además contenía 4AP y TEA-Cl, y  $Ba^{2+}$  en la solución extracelular. La  $I_{Na^+}$  se observó en 22 de 23 células NG2 registradas y alcanzó su máxima amplitud a -20 mV, tanto a las dos como a las cuatro semanas PN (fig. 5A<sub>1</sub>, 5A<sub>2</sub> y 5B). Sin embargo, la amplitud de la corriente disminuyó significativamente con la edad (fig. 5B). Las  $I_{Na^+}$  fueron expresadas como densidad de corriente, en la cual se considera el tamaño de las células (capacitancia), una célula grande (más membrana) presentará más canales iónicos que una pequeña, por lo tanto más corriente. Para las  $I_{K^+}$ , esto no fue posible y las corrientes se expresaron como tal, debido a que no era posible realizar un ajuste de la traza para calcular la capacitancia, en los registros con KCl en los animales más viejos, ya que en estos, tanto a potenciales negativos como positivos, hay corrientes sostenidas muy grandes que impiden realizar el cálculo correctamente.

Considerando que Chittajallu et al., (2004) demostraron que una subpoblación de células NG2 de la neocorteza exhibían un potencial de acción inmaduro (PAI) (fig. 5C<sub>1</sub> flecha) sensibles a TTX, se registraron las células NG2 en modo current-clamp con una solución intracelular de KCl (fig. 5C<sub>1</sub> y 5C<sub>2</sub>). Se observó que un 61% de las células NG2 a la segunda semana PN, presentaron un PAI en respuesta a la inyección de una corriente despolarizante (fig. 5E). Los PAI (fig. 5D) estuvieron compuestas de dos fases: una fase de despolarización y una pequeña repolarización. La diversidad en la forma de los PAI estuvo dada solamente por la amplitud del pico. No obstante, sólo un 31% de las células mostraron PAI a las cuatro semanas PN (fig. 5E). Cabe anotar que para generar un potencial de acción la permeabilidad del ión sodio debe superar

ampliamente a la del ión potasio. Por lo tanto, la reducción en el número de células NG2 que presentan PAI es probablemente debido a la disminución en la amplitud de la  $I_{Na^+}$  y el incremento en el componente sostenido de la  $I_{K^+}$  observado a las cuatro semanas PN (fig. 5B y 4B<sub>2</sub>).



**Fig. 5. Corrientes de sodio de células NG2 durante el desarrollo PN.** A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, corrientes de células NG2 de ratón de PN9 (A<sub>1</sub>) y PN25 (A<sub>2</sub>), sostenidas a un potencial de -90 mV, pulsos desde -100 a +40 mV, con incrementos de 20 mV. Las células NG2 fueron registradas con una solución intracelular de CsCl y Ba<sup>2+</sup> extracelular. B, relación I-V de la densidad de corriente promedio medida al inicio. Para cada potencial se restó las conductancias pasivas correspondientes. C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, células NG2 de ratón de PN9 (C<sub>1</sub>) y P24 (C<sub>2</sub>) en respuesta a la inyección de corriente (pulsos de 200 pA), sostenidas a -70 mV. Nótese la presencia de un potencial de acción inmaduro (PAI) (flecha) en el ratón de dos semanas PN, ausente en el de cuatro semanas PN. D, magnificación de un PAI de célula NG2 (PN9), compuesta de al menos dos fases: una fase de despolarización (a) y repolarización (b). E, histograma del porcentaje de células NG2 que presentaron un potencial de acción inmaduro. n= número de células registradas. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01



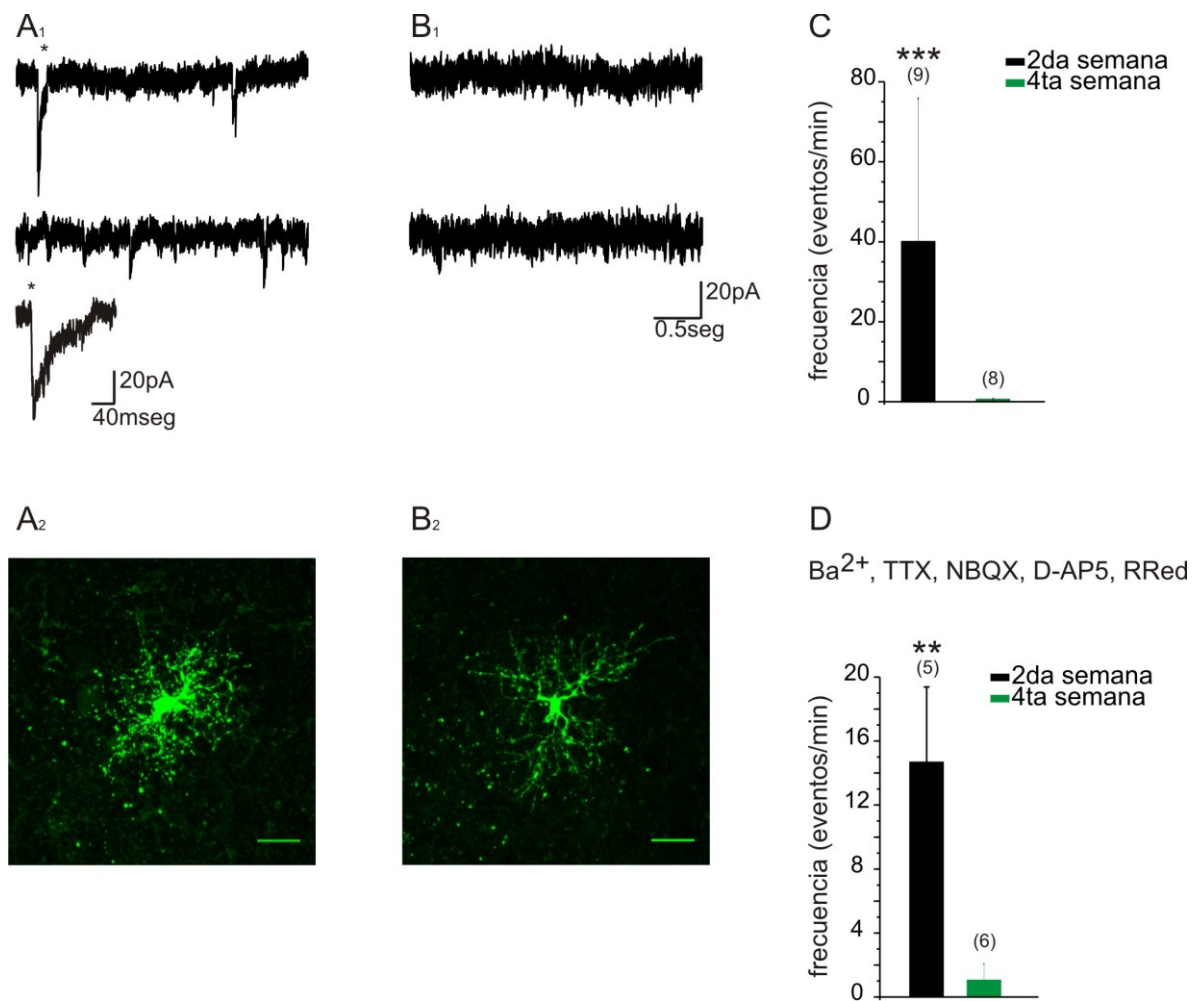
## 3.2 Actividad sináptica GABAérgica de células NG2 durante el desarrollo postnatal

### 3.2.1 Actividad GABAérgica espontánea y miniatura

Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que un 90% de la actividad sináptica de las células NG2 es GABAérgica en ratones de dos semanas PN (Vélez-Fort et al., datos no publicados). De modo de evaluar si existe un cambio o no en la frecuencia de estas corrientes, se registraron las células NG2 con una solución intracelular de CsCl, que además contenía 4AP y TEA-Cl. Como se muestra en la figura 6A<sub>1</sub> y 6B<sub>1</sub>, las corrientes sinápticas espontáneas GABAérgicas, fueron detectadas en células NG2 en la segunda, pero no a la cuarta semana PN (fig. 6C). De manera de determinar si la disminución en la actividad sináptica es causada por una disminución en el número de sinapsis o por un cambio en las propiedades sinápticas (por ejemplo, una disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisores), se estudió las corrientes sinápticas miniaturas en presencia del potente secretagogo rojo de rutenio que facilita la liberación vesicular independiente de calcio (Trudeau et al., 1996) y del bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje TTX. Además, se agregó en la solución NBQX, antagonista de receptores AMPA, D-AP5, antagonista de receptores NMDA y Ba<sup>2+</sup>. Se observaron muy pocos eventos sinápticos miniaturas en el ratón de cuatro semanas comparado con el de dos semanas (fig. 6D), lo cual favorece la hipótesis de una disminución en las estructuras sinápticas que contactan las células NG2 durante el desarrollo.

### 3.2.2 Morfología de las células NG2

De modo de relacionar la actividad sináptica con el grado de arborización de las células NG2, se analizó la morfología de estas células. Aunque las células NG2 registradas electrofisiológicamente son DsRed<sup>+</sup>, la mayoría de su fluorescencia está restringida al soma y procesos próximos (ramificaciones), lo cual impide realizar un estudio riguroso de la morfología. Para estudiar la morfología completa de las células NG2 se realizó un marcaje con biocitina, el cual es añadido en la solución intracelular. Una vez que la biocitina difunde al citoplasma en configuración célula completa, la rebanada es fijada en paraformaldeído y revelada con estreptavidina conjugada al indicador fluorescente Alexa488. De este modo, a 7 células que se registró la actividad sináptica, se les marcó con biocitina. Las figuras 6A<sub>2</sub> y 6B<sub>2</sub> muestran la morfología de dos células NG2 después de la detección de la biocitina con estreptavidina conjugada a Alexa488. Las células presentaron un soma de forma estrellada ( $n=2$ ) u ovalado ( $n=5$ ), con un diámetro pequeño de  $8.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$ . Cuatro de las siete células mostraron hasta 4 procesos de gran espesor que se extendían desde el soma ramificándose a una distancia variable entre 2.3 y 11.0  $\mu\text{m}$ . Asimismo, se observaron pequeños procesos altamente ramificados que emergían desde el soma ( $n=4$ ). Los procesos cubrían un área de un diámetro de  $103.8 \pm 9.2 \mu\text{m}$ . De acuerdo a las 7 células analizadas, correspondiente a ratones de dos semanas PN ( $n=4$ ) y cuatro semanas PN ( $n=3$ ), la complejidad en la arborización de los procesos aparenta ser variable tanto en el animal de dos y de cuatro semanas PN, lo cual podría explicar el distinto semblante entre las células y la inmutabilidad de su capacitancia. No parece existir tampoco una correlación entre la morfología de la célula y la frecuencia de las corrientes sinápticas.

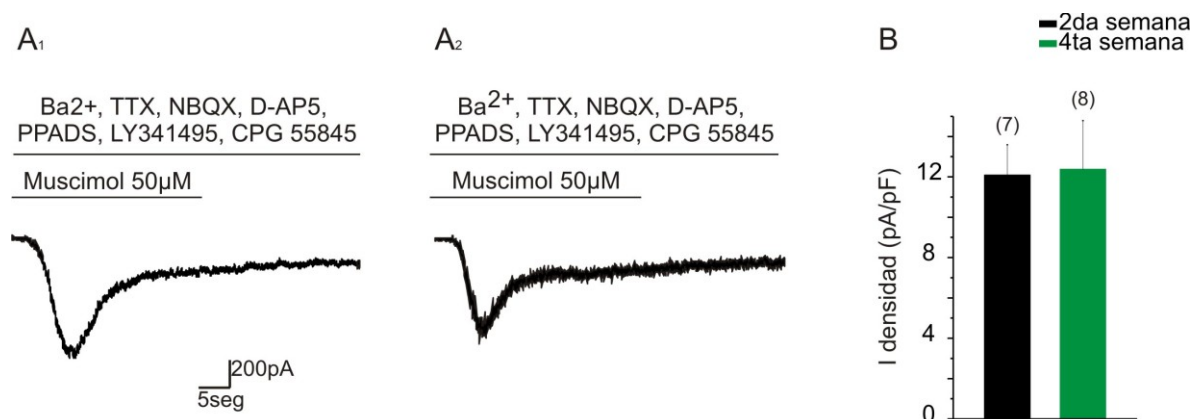


**Fig. 6. Actividad sináptica entre interneuronas GABAérgicas y células NG2.** A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>, corrientes sinápticas espontáneas de dos células NG2 marcadas con biocitina PN8 (A<sub>1</sub>) y PN26 (B<sub>1</sub>), sostenidas a -90 mV. Nótese el rápido rise time a PN8 (\*, inserto) y la ausencia de actividad a PN26. La morfología de las células registradas fue obtenida con un microscopio confocal (A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>). Superposición de 15 y 20 imágenes respectivamente, secciones ópticas de 1  $\mu$ m. Barra de escala: 20  $\mu$ m. C, histograma de la frecuencia de la corriente sináptica espontánea a la segunda y cuarta semana PN. D, histograma de la frecuencia de la corriente sináptica miniatura a la segunda y cuarta semana PN. n= número de células registradas. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

### 3.2.3 Receptores GABA<sub>A</sub>

En estos experimentos, se analizó la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> de las células NG2. El receptor GABA<sub>A</sub> presente en las células NG2 es un receptor ionotrópico que tiene como agonista endógeno a GABA. Con el fin de activar este receptor exclusivamente en las células NG2 registradas y evitar un posible efecto indirecto de su activación en otras células se utilizó muscimol 50  $\mu$ M (concentración

saturante), un agonista exógeno, en presencia de  $Ba^{2+}$ , TTX, AP5, NBQX, PPADS (antagonista de receptores purinérgicos), LY341495 (antagonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos) y CPG55845 (antagonista de los receptores metabotrópicos  $GABA_B$ ). Luego de la aplicación extracelular de muscimol, se observó una gran corriente de entrada producto de la salida masiva de cloruro, cuya amplitud no presentó diferencias significativas entre el ratón de dos y el de cuatro semanas PN (fig. 7A<sub>1</sub> y 7A<sub>2</sub>), alcanzando una densidad de corriente de  $12.1 \pm 1.5$  pA/pF y  $12.4 \pm 2.4$  pA/pF, respectivamente (fig. 7B). El presente resultado indica que no existe una disminución del número de receptores funcionales  $GABA_A$  durante el desarrollo de las células NG2 y por lo tanto, no son responsables de la disminución de la actividad sináptica GABAérgica. Esto sugiere que la activación de los receptores  $GABA_A$  en estados más tardíos de desarrollo depende de GABA que difunde a partir de sinapsis neuronales lejanas.



**Fig. 7. Receptores  $GABA_A$  de células NG2.** A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, corriente transitoria en células NG2 de ratón de PN10 (A<sub>1</sub>) y PN22 (A<sub>2</sub>) tras aplicación extracelular de muscimol 50  $\mu$ M, las células fueron sostenidas a -90 mV. B, histograma de la amplitud de corriente expresado en densidad a la segunda y cuarta semana PN. n= número de células registradas.

## 4. DISCUSIÓN

Para caracterizar y evaluar el desarrollo de las células NG2 de la corteza somatosensorial, desde un punto de vista electrofisiológico, en el presente estudio se compararon las propiedades intrínsecas de membrana y la actividad sináptica GABAérgica entre la segunda y cuarta semana postnatal. Se demostraron cambios tanto en el potencial de reposo de membrana, la resistencia de membrana, las corrientes de potasio y de sodio; como en la actividad sináptica GABAérgica de las células NG2 durante el primer mes de desarrollo postnatal de ratón.

### 4.1 Combinación de propiedades pasivas hacen de las células NG2 una población de glías únicas

Las propiedades pasivas de las células NG2 de ratón de dos semanas PN fueron claramente distinguibles de otros tipos gliales y neuronas. En particular, las células NG2 presentaron un hiperpolarizado potencial de membrana de reposo ( $E_m$ ) (-80 mV), lo cual implica que estas células, en las condiciones de registros de este estudio, son altamente permeables a este ión en reposo. Además, presentan una alta resistencia de membrana ( $R_m$ ) (107 M $\Omega$ ), la cual está más cercana a la  $R_m$  de neuronas piramidales que a la de astrocitos (10 M $\Omega$ ). Lo cual implica que incluso pequeños inputs sinápticos pueden causar una gran despolarización de la membrana de estas células. Sin embargo, a la cuarta semana PN el  $E_m$ , la  $R_m$  y su relación I-V fueron similar a las reportada, por ejemplo, para astrocitos (Adermark and Lovinger, 2008). Tal vez el parámetro más interesante que cambia durante el desarrollo de las células NG2 es su  $R_m$ , en donde se observó una dramática disminución de 107 a 35 M $\Omega$ , en registros realizados con una solución intracelular de KCl 130 mM. La  $R_m$  se mide en un potencial donde hay el menor número de conductancias abiertas, es decir a potenciales muy hiperpolarizantes,

para dar un valor que depende de las propiedades "pasivas" de la célula. En nuestro caso, esta fue incrementada por la acción de los bloqueadores de conductancias de potasio,  $\text{Cs}^+$  (intracelular) y  $\text{Ba}^{2+}$  (extracelular), por lo que se podría especular que la disminución de la resistencia observada en el animal de cuatro semanas PN se debe al aumento o aparición de una(s) conductancia(s) de potasio activa(s) a potenciales hiperpolarizantes.

#### 4.2 Canales de potasio y sodio, conductancias determinantes en la excitabilidad de las células NG2

Al igual que los trabajos desarrollados en "células complejas" y células NG2 en el hipocampo, identificadas por inmunohistoquímica (Kressin et al., 1995; Zhou et al., 2006), las células NG2 de la corteza somatosensorial presentaron una gran rectificación de salida en su relación I-V a la segunda semana PN, la cual se torna lineal con la edad, asemejándose a la de los astrocitos (Adermark and Lovinger, 2008). En ratones de dos semanas PN, se ha visto que la rectificación de las corrientes de salida está compuesta por un componente transitorio y uno sostenido, previamente identificados por otros estudios como corriente de tipo A ( $I_A$ ), sensible a 4AP, y una corriente rectificadora retardada ( $I_{KDR}$ ), sensible a TEA, respectivamente (Lin y Bergles, 2002). Un estudio realizado en células complejas de hipocampo, señala que durante la maduración de estas células, la  $I_A$  y la  $I_{KDR}$  disminuyen, mientras que aparece una corriente independiente de voltaje insensible a la aplicación de TEA y 4AP extracelular (Kressin et al., 1995). Probablemente, la linealidad de la curva I-V en células NG2 de corteza en ratones de cuatro semanas PN, se deba a un cambio similar en la expresión de las conductancias de potasio. Para determinar el tipo de conductancia de potasio involucradas en los cambios observados en las células NG2 neocorticales, sería necesario realizar experimentos biofísicos y/o farmacológicos de modo de aislar cada uno de los diferentes componentes

de la  $I_{K^+}$  a diferentes etapas del desarrollo postnatal. En los cuales se bloquea uno de los componentes de las corrientes de potasio elegido y luego mediante una sustracción a la corriente control se obtiene el valor del otro componente.

Además de las  $I_{K^+}$ , las células NG2 también expresaron las  $I_{Na^+}$ , las cuales fueron mucho más grandes a la segunda semana PN (Fig. 5). Los canales de sodio son responsables de la despolarización de la membrana en neuronas, la cual en el potencial de acción, corresponde a la fase del alza del potencial. El potencial de acción ha estado siempre asociado a células excitables como las neuronas, sin embargo este fenómeno ha sido observado *in vitro* en glías, como los astrocitos (Bordey y Sontheimer, 1999). El primer trabajo en células NG2 que describe la presencia de potenciales de acción, sensibles a TTX e inducidos por la inyección de corriente, fue desarrollado por Chittajallu et al. (2004), las cuales solamente fueron observadas en células de la sustancia gris no así en la sustancia blanca. Según nuestros resultados, el 61% de las células NG2 en ratones de dos semanas PN exhibieron potenciales de acción inmaduros contra un 31% en el ratón de cuatro semanas PN, aunque la sensibilidad a TTX no fue evaluada. Sorprendentemente, Káradóttir et al. (2008) mostraron que la inyección de corrientes despolarizantes generaba “verdaderas” descargas de potenciales de acción en una subpoblación de células NG2 de la sustancia blanca cerebelar. Sin embargo, la existencia de células NG2 que descarguen potenciales de acción regenerativos no ha sido confirmado por ningún otro laboratorio, ni por el nuestro. Considerando que las células NG2 se encuentran frecuentemente en oposición con somas y dendritas de neuronas (Dayer et al., 2005; Mangin et al., 2008), se puede especular que en el trabajo de Káradóttir probablemente se registraron interneuronas inmaduras migrando desde la sustancia blanca cerebelar.

#### 4.3 Sinapsis GABAérgica en células NG2 neocorticales, una señalización de destino celular

Las células NG2 reciben contactos sinápticos desde neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Bergles et al., 2000; Lin y Bergles, 2004), comprometiendo el exclusivo rol que se les ha otorgado a neuronas en la transmisión sináptica. La existencia de esta forma de comunicación, ha sugerido que la liberación de neurotransmisores puede estar relacionada con desarrollo y devenir de estas células. Los receptores de las células NG2 son activados endógenamente *in vivo* durante diferentes fases del desarrollo de oligodendrocitos. Las células NG2 generan nuevos oligodendrocitos mielinizantes tanto en situaciones de pérdida de mielina experimental (Watabe et al., 2002) como en condiciones fisiológicas (Dawson et al., 2003). Si la actividad sináptica aumenta la oligodendrogénesis, la invasión sináptica debiera ser máxima en la segunda semana postnatal que corresponde con el período de máxima generación de oligodendrocitos en roedores (Rivers et al., 2008). Esta hipótesis no ha sido demostrada aún, sin embargo datos de nuestro laboratorio apoyan esta hipótesis. La frecuencia de la actividad sináptica espontánea GABAérgica disminuye drásticamente después de la segunda semana PN. Estos datos han sido corroborados por un reciente estudio en células NG2 de la neocorteza, en donde se reporta una actividad sináptica GABAérgica con una frecuencia de 0.1-0.2 eventos/min en ratón de ocho semanas PN (Tanaka et al., 2009).

#### 4.4 Cambio en las sinapsis interneurona-células NG2 modula la actividad GABAérgica

Las células NG2 son capaces de discernir la liberación cuántica de neurotransmisores, es decir, la liberación de una vesícula única, calcio-independiente, en ausencia de potenciales de acción de la neurona presináptica (Bergles et al., 2000; Lin y Bergles, 2004). Esta liberación produce un evento postsináptico llamado



“miniatura” que depende de un *quantum* de neurotransmisores. Para aumentar la frecuencia de estos eventos miniaturas se tomó ventaja del potente secretagogo rojo de rutenio para promover la liberación masiva de vesículas desde las terminales neuronales hacia las células NG2, en ausencia de potenciales de acción los cuales fueron bloqueados con TTX. Estos experimentos se hicieron en presencia de  $Ba^{2+}$  extracelular para optimizar el clamp de las células y por lo tanto, la detección de los eventos. Al igual que para la actividad sináptica espontánea, las corrientes miniaturas GABAérgicas en presencia de rojo de rutenio disminuyeron dramáticamente de 14 a 0.5 eventos/min de la segunda a la cuarta semana PN. Este resultado supone una disminución en el número de sinapsis, pues no se observa liberación vesicular de ningún tipo en los animales más viejos.

#### 4.5 Morfología y expresión de receptores $GABA_A$ , parámetros constantes durante el desarrollo PN de las células NG2

La morfología de las células NG2 neocorticales presentó características similares a las descritas en el hipocampo (Vélez-Fort et al., 2009). Sin embargo, sorprendentemente no se observó un aumento de la arborización de los procesos de las células durante el desarrollo postnatal, lo que implica que los cambios observados en la actividad sináptica GABAérgica de las células NG2 son reales y no debidos a problemas en la detección de las corrientes sinápticas por encontrarse en procesos distales.

La expresión de receptores  $GABA_A$  en células NG2 ha sido descrita tanto en estudios *in vitro* como *in situ* en donde aplicación de THIP, un agonista selectivo de estos receptores, activa corrientes bloqueadas por picrotoxina y gabazina, ambos antagonistas de receptores  $GABA_A$  (Lin y Bergles, 2004). Tal como lo reportado por

Lin y Bergles (2004) en el hipocampo, la aplicación exógena de muscimol, otro agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, indujo la activación de estos receptores (fig. 7A<sub>1</sub> y 7A<sub>2</sub>), en donde no se observó cambios en la densidad de corriente durante el desarrollo postnatal (fig. 7B). Los receptores GABA<sub>A</sub> pueden ser activados de manera rápida y transitoria, directamente a nivel de una sinapsis, o tónica, en donde la activación está mediada por pequeñas concentraciones de GABA que escapan de las sinapsis y difunden en el medio extracelular para activar receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos (Farrant y Nusser, 2005). El hecho que el mismo número de receptores GABA<sub>A</sub> persistan en ausencia de contactos sinápticos a las cuatro semanas PN indica que estos receptores se localizan en regiones extrasinápticas de las células NG2 y sugiere que su mecanismo de activación depende de GABA presente en el ambiente, lejos de sinapsis GABAérgicas.

La suma de los resultados expuestos sugiere que el rol jugado por las células NG2 en etapas de desarrollo tardías no es el mismo que el desempeñado en etapas tempranas. Lo cual se ve reflejado en los cambios observados en las propiedades pasivas, la expresión de conductancias de potasio y sodio y la conectividad neuronal sináptica. Además, estos resultados corroboran que la presencia de sinapsis funcionales no es sólo una propiedad de exclusiva de la comunicación neuronal.

## 5. CONCLUSIONES

-Las propiedades pasivas, tales como el potencial de membrana de reposo y la resistencia de membrana cambian durante el desarrollo de las células NG2, excepto su capacitancia, que se mantiene invariable.

-Las corrientes de potasio presentan un cambio en su perfil I-V durante el desarrollo de las células NG2. El componente sostenido aumenta y la rectificación de salida se torna lineal en el ratón de cuatro semanas PN.

-Las corrientes de sodio disminuyen durante el desarrollo postnatal de las células NG2, lo cual en conjunto con el aumento de las corrientes de potasio hacen disminuir el número de potenciales de acción inmaduros (PAI) en el ratón de cuatro semanas PN.

-La actividad sináptica espontánea y miniatura GABAérgica disminuyen durante el desarrollo postnatal de las células NG2, posiblemente por una disminución en el número de sinapsis.

-La morfología de las células NG2 es variable tanto a la segunda como a la cuarta semana postnatal y no existen diferencias cualitativas entre los dos estados de desarrollo.

-La expresión de receptores GABA<sub>A</sub> se mantiene constante durante el desarrollo postnatal de las células NG2.

## 6. REFERENCIAS

- Adermark L, Lovinger DM. 2008. Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem Int* 52(7):1365-72. Epub 2008 Mar 4.
- Akopian G, Kressin K, Derouiche A, Steinhäuser C. 1996. Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca<sup>2+</sup> currents. *Glia*. 1996 17(3):181-94.
- Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LL, Corey DP. 1990. Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4(4):507-24.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405(6783):187-91.
- Biglami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43(2):429-35.
- Bordey A, Sontheimer H. 1999. Differential inhibition of glial K(+) currents by 4-AP. *J Neurophysiol* 82(6):3476-87.
- Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM, Berry M. 1999. Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia* 26(1):84-91.
- Butt AM, Kiff J, Hubbard P, Berry M. 2002. Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* 31(6-7):551-65. Review.

- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17(10):3894-906.
- Chen ZJ, Negra M, Levine A, Ughrin Y, Levine JM. 2002. Oligodendrocyte precursor cells: reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *J Neurocytol* 31(6-7):481-95. Review.
- Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V. 2002. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4):2350-5.
- Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V. 2004. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol* 561(Pt 1):109-22.
- Chittajallu R, Kunze A, Mangin JM, Gallo V. 2007. Differential synaptic integration of interneurons in the outer and inner molecular layers of the developing dentate gyrus. *J Neurosci* 27(31):8219-25.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R. 2003. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24(2):476-88.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168(3):415-27.

- de Castro R Jr, Tajrishi R, Claros J, Stallcup WB. 2005. Differential responses of spinal axons to transection: influence of the NG2 proteoglycan. *Exp Neurol*. 2005 192(2):299-309.
- Farrant M, Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6(3):215-29.
- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17(21):8363-75.
- Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC. 1996. Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *J Neurosci* 16(8):2659-70.
- Gallo V, Mangin JM, Kukley M, Dietrich D. 2008. Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions?. *J Physiol*. 586(16):3767-81. Epub 2008 Jul 17. Review.
- Ge WP, Yang XJ, Zhang Z, Wang HK, Shen W, Deng QD, Duan S. 2006. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca<sup>++</sup> permeable AMPA receptors. *Science* 312(5779):1533-7.
- Ge WP, Zhou W, Luo Q, Jan LY, Jan YN. 2009. Dividing glial cells maintain differentiated properties including complex morphology and functional synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(1):328-33. Epub 2008 Dec 22.

- Gudz TI, Komuro H, Macklin WB. 2006. Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an alpha5 integrin/myelin proteolipid protein complex. *J Neurosci* 26(9):2458-66.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. 2000. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20(6):2218-28.
- Inan M, Crair MC. 2007. Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *Neuroscientist* 13(1):49-61.
- Jabs R, Pivneva T, Huttmann K, Wyczynski A, Nolte C, Kettenmann H, Steinhauser C. 2005. Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J Cell Sci* 118(Pt 16):3791-803.
- Káradóttir R, Cavalier P, Bergersen LH, Attwell D. 2005. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438(7071):1162-6.
- Káradóttir R, Hamilton NB, Bakiri Y, Attwell D. 2008. Spiking and non spiking classes of oligodendrocytes precursor glia in CNS. *Nat Neurosci* 11(4):450-6. Epub 2008 Mar 2.
- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9(2):173-9. Epub 2005 Dec 25.

- Kitada M, Rowitch DH. 2006. Transcription factor co-expression patterns indicate heterogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord. *Glia* 54(1):35-46.
- Kressin K, Kuprijanova E, Jabs R, Seifert G, Steinhäuser C. 1995. Development regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia* 15(2):173-87.
- Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D. 2007. Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10(3):311-20. Epub 2007 Feb 11.
- Kukley M, Kiladze M, Tognatta R, Hans M, Swandulla D, Schramm J, Dietrich D. 2008. Glial cells are born with synapses. *FASEB J* 22(8):2957-69. Epub 2008 May 8.
- Lin SC, Bergles DE. 2002. Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 31(6-7):537-49.
- Lin SC, Bergles DE. 2004. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci* 7(1):24-32.
- Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE. 2005. Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 46(5):773-85.
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH. 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109(1):75-86.



- Mangin JM, Kunze A, Chittajallu R, Gallo V. 2008. Satellite NG2 progenitor cells share common glutamatergic inputs with associated interneurons in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 28(30):7610-23.
- Nishiyama A, Dahlin KJ, Prince JT, Johnstone SR, Stallcup WB. 1991. The Primary Structure of NG2, a Novel Membrane-spanning Proteoglycan. *J Cell Biol* 114(2):359-71.
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. 1996. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 43(3):299-314.
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A. 2005. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?. *J Anat* 207(6):687-93. Review.
- Nishiyama A. 2009. Polydendrocytes (NG2): Multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10(1):9-22.
- Polito A, Reynolds R. 2005. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207(6):707-16.
- Reynolds R, Hardy R. 1997. Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J Neurosci Res* 47(5):455-70.
- Reynolds R, Dawson M, Papadopoulos D, Polito A, Di Bello IC, Pham-Dinh D, et al. 2002. The response of NG2-expressing oligodendrocyte progenitors to demyelination in MOG-EAE and MS. *J Neurocytol* 31:523-36.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD. 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating

- oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11(12):1392-401. Epub 2008 Oct 8.
- Schmidt K, Eulitz D, Veh RW, Kettenmann H, Kirchhoff F. 1999. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res* 843(1-2):145-60.
- Stallcup WB. (2002). The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31(6-7):423-35.
- Tanaka Y, Tozuka Y, Takata T, Shimazu N, Matsumura N, Ohta A, Hisatsune T. 2009. Excitatory GABAergic Activation of Cortical Dividing Glial Cells. *Cereb Cortex*. Epub 2009 Jan 8
- Tong XP, Li XY, Zhou B, Shen W, Zhang ZJ, Xu TL, Duan S. 2009. Ca(2+) signaling evoked by activation of Na(+) channels and Na(+)/Ca(2+) exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration. *J Cell Biol* 186(1):113-28.
- Vélez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. 2009. Functional alpha7-containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus. *Glia* 57(10):1104-1114.
- Watanabe M, Toyama Y, Nishiyama A. 2002. Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *J Neurosci Res* 69:826-36.
- Woolsey TA, Dierker ML, Wann DF. 1975. Mouse Sml cortex: qualitative and quantitative classification of golgi-impregnated barrel neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(6):2165-9.

- Xie M, Lynch DT, Schools GP, Feustel PJ, Kimelberg HK, Zhou M. (2007). Sodium channel currents in rat hippocampal NG2 glia: characterization and contribution to resting membrane potential. *Neuroscience* 150(4):853-62. Epub 2007 Oct 3.
- Yang Z, Suzuki R, Daniels SB, Brunquell CB, Sala CJ, Nishiyama A. 2006. NG2 glial cells provide a favorable substrate for growing axons. *J Neurosci* 26:3829-39.
- Zhou M, Schools GP, Kimelberg HK. 2006. Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *J Neurophysiol* 95(1):134-43.
- Zhou Q, Anderson DJ.2002. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109(1):61-73.
- Zhu X, Hill RA, Nishiyama A. 2008. NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord. *Neuron Glia Biol* 4(1):19-26. Epub 2008 Nov 13.
- Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. 2007. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10(3):321-30.

