



**RIDAA**  
Repositorio Institucional  
Digital de Acceso Abierto de la  
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Di Bella, Daniela Jesica

# Regulación transcripcional de la diferenciación de las neuronas del canal central



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

*Di Bella, D. (2018). Regulación transcripcional de la diferenciación de las neuronas del canal central. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*  
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/802>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Regulación transcripcional de la diferenciación de las Neuronas del Canal Central**

*TESIS DOCTORAL*

**Daniela J. Di Bella**

danielajdibella@gmail.com

### **Resumen**

La generación de los tipos neuronales correctos, en el momento y cantidad adecuados, es fundamental para obtener un sistema nervioso funcional. En los últimos 20 años, se han comprendido ampliamente los mecanismos genéticos de la especificación neuronal durante el desarrollo embrionario, y cómo coordenadas posicionales determinan la identidad neuronal. Sin embargo, la contribución temporal a la generación de diversidad ha sido menos explorada. Recientemente, hemos identificado en la médula espinal un evento neurogénico que ocurre en simultáneo con la especificación glial, en estadios avanzados del desarrollo antes considerados no-neurogénicos. Las Neuronas que contactan con el Fluido Cerebroespinal (CSF-cN), ampliamente conservadas en cordados, se diferencian a partir de progenitores ventrales tardíos y se ubican en la interfase entre el sistema nervioso central y el CSF. No se conoce cuáles son los mecanismos genéticos que permiten la diferenciación de esa clase neuronal en estadios gliogénicos. En este trabajo, identificamos que los factores de transcripción *Ascl1*, *Gata3* y *Gata2* se expresan secuencialmente en las CSF-cN espinales de ratón y controlan su especificación. Mediante análisis de expresión y el uso de herramientas genéticas, encontramos que las proteínas *Gata3* y *Gata2* se expresan postmitóticamente en las CSF-cN, y que controlan la adquisición de la identidad neuronal. Por otro lado, la proteína proneural *Ascl1* se expresa en los progenitores que dan lugar a las CSF-cN y es necesaria para su diferenciación en especies amniotas. Mediante la disección temporal de la actividad de *Ascl1*, encontramos que el factor de transcripción es un componente esencial de la neurogénesis tardía de las CSF-cN. Por último, mapeos de destino en ausencia de *Ascl1* demostraron que confiere potencial neurogénico a progenitores ventrales tardíos, que, de otra forma, se convertirían en endotelios. Concluimos que la secuencia *Ascl1*-*Gata3/2* dirige la especificación de las CSF-cN, con *Ascl1* gobernando el inicio de la diferenciación neuronal en el epitelio gliogénico y con *Gata2/3* controlando su especialización neuronal.

**Palabras claves:** neurogénesis; regulación transcripcional; médula espinal; canal central.

## **Abstract**

The generation of the precise neuronal types in the right time and quantity, is essential for building a functioning nervous system. In the last 20 years, we have reached a huge understanding of the genetic mechanisms that control neuron specification during embryonic development, and how positional coordinates determine neuronal identity.

However, the temporal contribution to neuronal diversity has been less explored. We have recently identified a neurogenic event in the spinal cord that takes place simultaneously with glial specification, during advanced developmental stages previously considered nonneurogenic. CerebroSpinal Fluid contacting Neurons (CSF-cN), widely conserved in chordates, are located at the interface between the central nervous system and the CSF and are generated from late ventral progenitors. The genetic mechanisms that allow the differentiation of this class of neurons at gliogenic stages are unknown. In this work, we identified that the transcription factors *Ascl1*, *Gata3* and *Gata2* are sequentially expressed in mouse CSF-cN and control their specification. Through expression analysis and mouse genetics, we described that *Gata3* and *Gata2* are postmitotically expressed in CSF-cN, where they direct the acquisition of neuronal identity. Furthermore, the proneural protein *Ascl1* is expressed in progenitors that give rise to CSF-cN and is necessary for their differentiation in amniotes. By temporal dissection of *Ascl1* activity, we found that the transcription factor is an essential component of late CSF-cN neurogenesis. Finally, fate mapping experiments in the absence of *Ascl1* demonstrated that it confers neurogenic potential to late ventral progenitors, which would otherwise become ependymal cells. We conclude that the sequence *Ascl1-Gata3/2* directs the specification of CSF-cN, with *Ascl1* governing the onset of neuronal differentiation in the gliogenic neural tube and *Gata2/3* controlling neuronal specialization.

Key words: neurogenesis, transcriptional regulation, spinal cord, central canal governing the onset of neuronal differentiation in the gliogenic neural tube and *Gata2/3* controlling neuronal specialization.

**Key words:** neurogenesis; transcriptional regulation; spinal cord; central canal.

**Director:** Dr. Guillermo Lanuza

**Consejero de estudios:** Dra. Patricia D'Agostino

**Lugar de trabajo:** Fundación Instituto Leloir. IBBA; CONICET

There is a theory which states that if ever anyone discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable. There is another theory which states that this has already happened.

Douglas Adams, *The Restaurant at the End of the Universe*

*A Nelson*

*A Sebastián y Carla*

*A mi abuelo*

# AGRADECIMIENTOS

Creo que casi cualquier cosa que uno emprende es fruto del trabajo en equipo. Esta tesis fue realizada gracias al trabajo y apoyo de mucha gente, que trabajaron y contribuyeron directa o indirectamente para que saliera adelante. Gracias a todos ellos.

A Guillermo Lanuza, primero por darme un lugar en el laboratorio, hace ya muchos años, pero también por renovar esa posibilidad después. Además de agradecer por lo que aprendí (mucho), por su paciencia, por transmitir su pasión y dedicación, y por trabajar al lado nuestro; gracias, sobre todo, por darme confianza. Por confiar en mí y hacerme sentir valorada. Y por dejarnos trabajar como quisimos.

A Abel Carcagno. Tuve mucha suerte muchas veces, pero una de las veces más importantes fue cuando empecé a trabajar con vos. Gracias por escucharme, aconsejarme, retarme. Por levantarme el ánimo cuando las cosas no salen y por seguir intentando después de muchos años. Pero sobre todo gracias por tu forma de trabajo, por tratarme como a un par desde el primer día. Por mostrarme que la mejor forma de trabajar es en equipo.

A mis compañeros de laboratorio Luciano Brum, Yanina Petracca y Micaela Sartoretti. Gracias por todas las pequeñas cosas de todos los días que hicieron que trabajar en el laboratorio fuese mejor y más divertido. Pero muy especialmente a Mica. Nos tocó crecer juntas y aprender de todo, a los ponchazos, pero creo que salimos bastante decentes. Gracias por estar al lado mío en ese camino. Y a Lucho, que vino a ordenarnos y bufferearnos.

A Cristina Monzón y Eliana Cortes, gracias por la ayuda, las charlas y las ganas de aprender.

A todo el laboratorio 308, gracias, los quiero mucho.

Al Laboratorio Schinder por las discusiones semanales y los espacios y recursos compartidos todos los días.

A Antonia Marín Burgín y Belén Pardi por hacer con nosotros los experimentos de electrofisiología. Cada vez que pienso que Belén, uno o dos meses antes de entregar su tesis, estaba sentada en el *set up* con nosotros, me convenzo aún más de que es una genia, gracias! A Anto, gracias por su forma de ver las cosas y por transmitir siempre tranquilidad. Sus palabras y su confianza me sirvieron mucho.

A mi CST, Fernanda Ceriani, Graciela Boccacio y Mariana Melani. Sobre todo a Fer. A veces, unas palabras de apoyo dan fuerza y empuje.

A todos los laboratorios del Instituto Leloir, por ayudas, consejos, préstamos y demases.

A los chicos del bioterio, especialmente a Sonia y Jime, y a Maxi Neme en los microscopios. Su trabajo fue, literalmente, indispensable para esta tesis.

A la gente que trabaja en el Instituto, que hacen la diferencia. Gracias por su trabajo, pero también por las pequeñas cosas extras con que nos ayudan. Contabilidad, compras, subsidios, mantenimiento, maestranza, autoclave, soporte, biblioteca. Nombro solo a algunos: Pancho, José, Gladys, Juana, Juli, Vale, Matías, Emiliano, gracias!

A tanta gente del Instituto que ayuda a que me sienta bien en esos pasillos. Jime, Ruso, Her, Marie, Nati, Gabis. A la tanda de becarios que compartimos media biblioteca los últimos dos meses.

A Leandro Grille, por compartir conmigo horas de docencia, y enseñarme sobre física, proteínas, historia y niños. A Alejo Parola y a Mario Ermácora, por confiar en mí y brindarme su apoyo. Al LEPP, por darme un lugar una vez a la semana durante los últimos dos años. Por su ayuda, especialmente a Pamela y Ramiro.

A la UNQ, por formarme en las carreras de grado y posgrado. Por trabajar por una educación pública, gratuita e inclusiva de calidad. Al CONICET y al Estado Nacional por garantizar mi formación y financiar este proyecto.

A las chicas de la Facu: Sole, Nati, Aldi, Vero, Sol, Eli, Marian. Especialmente a Mir, por retarme cuando hizo falta y escucharme el resto del tiempo.

A Laurita y a Pau. Una de las mejores cosas que tiene la ciencia es que las conocí a ustedes dos. Espero que, aunque desperdigadas por ahí, siga cada una al lado mío.

A mis amigas de siempre, por ese amor incondicional que nos tenemos, y por esa confianza casi ciega que me tienen. Quiero que estén siempre conmigo para que me den fuerzas.

A mi familia, por su apoyo incondicional. A mis abuelos, por esperarme y recibirme siempre y perdonar las ausencias.

A Nelson y Vilma, por hacerme sentir parte de su familia, por apoyarnos y ayudarnos.

A mis hermanos Sebastián y Carla. Gracias por bancarme tantas tantas cosas, por estar cerca, siempre. Estoy muy orgullosa de ustedes. Tenemos que seguir esforzándonos, cada uno en lo suyo, que las cosas que nos cuestan son las que más valen la pena.

A mis papás. Gracias por apoyarme incondicionalmente en todo, siempre. Por tratar de ayudarme y simplificarme los problemas, incluso ahora que ya no es tan fácil. Saber que cuento con ustedes es una felicidad y tranquilidad enormes. Los quiero mucho.

A Nelson, gracias por todo. Por corregirme la tesis y ocuparte de todo este verano. Por cocinarme y quedarte conmigo hasta altas horas de la noche. Por confiar en mí, cuidarme y estar al lado mío en cada paso. Porque conoces mi peor cara y seguís al lado mío. Porque no se me ocurre una forma mejor de pasar mi vida que no sea con vos.

# ABREVIATURAS

Ascl1	<i>Achaete Scute complex like 1</i>
bHLH	<i>Basic Helix Loop Helix</i> , dominio básico hélice-bucle-hélice
Bmp	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BrdU	5-Bromo-2'deoxiUridina
cc	Canal central
cKO	<i>conditional Knock out</i> (mutantes condicionales)
CPG	<i>Central Pattern Generator</i> (Generadores de patrones centrales de la clocomoción)
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> , Fluido Cerebroespinal
CSF-cN	<i>CSF-contacting Neurons</i> , Neuronas que contactan con el Fluido Cerebroespinal
DE	Desvío estándar
E#	Estadio embrionario #, días post coito
EE	Error estándar
Fgf	<i>Fibroblast growth factor</i>
GFP	Green fluorescent protein, proteína fluorescente verde
i.p.	intraperitoneal
KA	Neuronas Kolmer Agduhr
KI	<i>Knock in</i>
KO	<i>Knock out</i> (mutante nulo)
MN	Motoneuronas
n.s.	no significativo
P#	Estadio postnatal #, días de vida
p(1-3)	Dominios progenitores
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> , buffer fosfato salino
PBS-Tw	<i>Buffer fosfato salino Tween</i> 0,1%
PFA	Paraformaldehído
Pkd211	<i>Polycystic kidney disease 2 like 1</i>
pMN	Dominio progenitor de motoneuronas
PNM	Progenitores neuron-mesodérmicos
pOL	Dominio progenitor de oligodendrocitos
pp	Placa del piso

Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
T.A.	Temperatura ambiente
TAM	Tamoxifeno
V(0-3)	Poblaciones de neuronas ventrales
VA(0-3)	Poblaciones de astrocitos ventrales
wt	<i>Wild type</i> , genotipo sin modificaciones
ZM	Zona del manto
ZV	Zona ventricular

# ÍNDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<i>La diversidad neuronal.....</i>	<i>3</i>
<i>Desarrollo de la médula espinal.....</i>	<i>4</i>
Inducción neural.....	4
Organización del tubo neural – <i>Patterning</i> .....	6
Diferenciación neuronal - Proteínas proneurales.....	7
<i>Especificación neuronal.....</i>	<i>9</i>
Mecanismos espaciales – Diversidad en el eje dorso-ventral.....	9
Interpretación del gradiente de Shh.....	10
Dominios de progenitores ventrales.....	12
Diversidad adicional en dominios de progenitores – El dominio p2.....	12
La contribución temporal a la diversidad neural.....	13
El componente temporal en la especificación de subtipo.....	14
Fases neurogénica y gliogénica del desarrollo.....	15
<i>Eventos neurogénicos tardíos.....</i>	<i>17</i>
Las Neuronas que contactan con el Fluido Cerebroespinal (CSF-cN).....	17
Ontogenia de las CSF-cN.....	19
<i>Ascl1, Gata2/3 y la especificación de las CSF-cN.....</i>	<i>21</i>
El factor de transcripción proneural Ascl1.....	21
Los factores de transcripción Gata2 y Gata3.....	23
<b>Objetivos e Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>27</b>
<i>Animales.....</i>	<i>28</i>
<i>Genotipificación de animales.....</i>	<i>34</i>
Extracción de DNA genómico.....	34
Reacción de PCR.....	34
<i>Tratamientos farmacológicos.....</i>	<i>35</i>
Marcación con BrdU.....	35
Inducción de la actividad recombinasa.....	35
Rescate farmacológico de los mutantes nulos <i>Gata3</i> .....	36
<i>Preparación de tejido espinal.....</i>	<i>36</i>

Disección, criopreservación y seccionamiento de tejido espinal.....	36
<i>Inmunofluorescencia</i> .....	37
Protocolo general .....	37
Recuperación antigénica de BrdU por tratamiento ácido.....	39
<i>Hibridación in situ</i> .....	39
Preparación de las sondas. Transcripción <i>in vitro</i> .....	39
Protocolo general .....	40
<i>Detección de actividad de <math>\beta</math>-Galactosidasa</i> .....	41
<i>Microscopía</i> .....	41
<i>Electrofisiología: registro en rebanadas agudas</i> .....	41
<i>Análisis estadístico</i> .....	42
<b>Resultados</b> .....	<b>44</b>
<i>I- Expresión de <i>Ascl1</i> y <i>Gata3</i> en la neurogénesis espinal avanzada</i> .....	46
<i>Ascl1</i> en la médula espinal embrionaria.....	46
Las células <i>Ascl1</i> <sup>+</sup> comienzan a expresar marcadores de las neuronas del canal central.....	52
Las células ventriculares <i>Gata3</i> <sup>+</sup> son precursores de las CSF-cN.....	56
<i>II- <i>Ascl1</i> controla la especificación de las CSF-cN</i> .....	61
La generación de las CSF-cN depende de <i>Ascl1</i> .....	61
<i>Ascl1</i> es necesario para generar las CSF-cN tardías de amiotas.....	67
<i>Ascl1</i> actúa sobre los progenitores ventrales tardíos para dirigir la diferenciación de las CSF-cN .....	69
<i>Ascl1</i> controla la diferenciación de las CSF-cN de manera autónoma de célula .....	75
<i>Ascl1</i> confiere potencial neurogénico a progenitores espinales tardíos.....	80
<i>III- <i>Gata3</i> regula la especificación de las CSF-cN</i> .....	91
<i>Gata3</i> controla la diferenciación de un subgrupo de las CSF-cN.....	91
<i>Gata3</i> se expresa en las dos poblaciones de CSF-cN.....	93
Las CSF-cN' están ausentes en los mutantes <i>Gata3 cKO</i> .....	94
<i>Gata3</i> actúa tempranamente en el proceso de diferenciación .....	96
<i>Gata2</i> cumple funciones redundantes con <i>Gata3</i> en el desarrollo de las CSF-cN".	100
<b>Discusión</b> .....	<b>104</b>
<i>Ascl1 y <i>Gata3/2</i> dirigen la especificación de las CSF-cN</i> .....	105
<i>Ascl1</i> .....	105
<i>Gata3</i> .....	106
<i>Gata2</i> .....	107

---

<i>Origen dual y mecanismos diferenciales en el desarrollo de las CSF-cN.....</i>	<i>108</i>
Las CSF-cN' y CSF-cN'' están diferencialmente controladas por Gata3 .....	109
¿Fuentes diferentes, células diferentes?.....	110
<i>Ascl1 confiere potencial neurogénico a progenitores tardíos.....</i>	<i>111</i>
<i>Switch en competencias progenitoras.....</i>	<i>113</i>
<i>Ascl1 y la heterocronía de las CSF-cN .....</i>	<i>115</i>
El desarrollo heterocrónico de las CSF-cN en vertebrados .....	115
La relación entre Ascl1 y la heterocronía de las CSF-cN.....	116
<i>Sobre la función de las CSF-cN.....</i>	<i>117</i>
Mecanorrecepción vs. quimiorrecepción .....	117
Función de las CSF-cN y heterocronía en su desarrollo.....	118
<i>Conclusiones .....</i>	<i>119</i>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>120</b>

# INTRODUCCIÓN

Esta tesis aborda la regulación genética de la diferenciación de una población discreta de neuronas en la médula espinal de ratón: las Neuronas que contactan con el Fluido Cerebroespinal (CSF-cN).

Iniciamos esta Introducción con un resumen del desarrollo de la médula espinal y la especificación de tipos celulares, abordando los mecanismos espaciales y temporales generadores de diversidad en la mitad ventral del tubo neural. A continuación se describe un evento neurogénico tardío en la médula espinal, la generación de las CSF-cN, y se presentan los factores de transcripción *Ascl1* y *Gata2/3*, estudiados en esta tesis.

## LA DIVERSIDAD NEURONAL

El estudio sistemático de la arquitectura del Sistema Nervioso Central (SNC), realizado por Ramón y Cajal a fines del siglo XIX es un trabajo fundacional para la neurobiología moderna. Mediante la doble impregnación en cromato de plata (modificada a partir de la técnica inventada por Golgi en 1873) y el “*método ontogénico*”, es decir el estudio de tejidos embrionarios para la comprensión de la estructura del sistema nervioso, Ramón y Cajal fue capaz de observar neuronas individuales y proponer la *Teoría Neuronal* que revolucionó el campo de la neurociencia y lo hizo acreedor del premio Nobel en 1906. A partir de la caracterización de distintas regiones del cerebro, y basado en el trabajo de predecesores como Purkinje (1787-1869), identificó numerosos tipos de neuronas diferentes, cada una con una ubicación, morfología y proyecciones específicas. Sus estudios evidenciaron la existencia de una amplia diversidad morfológica a lo largo del SNC que, presumiblemente, corresponden a clases de neuronas con distintas funciones (de Castro *et al.*, 2007; Lopez-Munoz *et al.*, 2006).

Una de las preguntas actuales en el campo de la neurociencia es cómo se genera esa diversidad. El SNC está formado por múltiples tipos celulares incluyendo una gran variedad de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos. La generación de los tipos celulares apropiados en las coordenadas espacio-temporales y números adecuados es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. A pesar del avance considerable que se ha logrado sobre ese tema, aún restan resolver muchas incógnitas sobre cómo, a partir de precursores equivalentes, se obtiene la enorme variedad de células que pueblan el SNC. La médula espinal, debido a la relativa simpleza de su estructura y circuitos, ha demostrado ser un excelente modelo para abordar esas preguntas (Jessell, 2000).

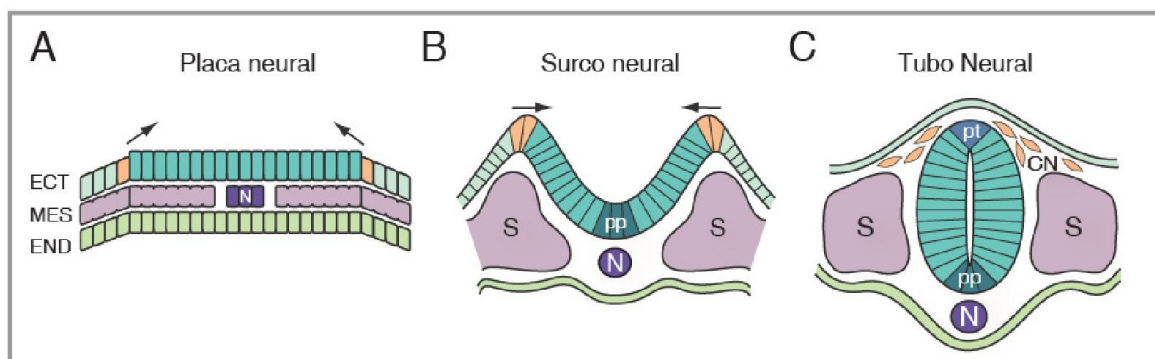
En nuestro laboratorio, estudiamos los mecanismos genéticos que regulan la diversidad neuronal durante el desarrollo embrionario. En ese contexto, iniciamos esta tesis con un resumen del desarrollo de la médula espinal en vertebrados.

## DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal se genera a partir de la región más posterior del tubo neural, el derivado ectodérmico precursor del SNC. En vertebrados, su desarrollo es un proceso complejo en el que se destacan los siguientes eventos: (1) la inducción neural, en la que se recluta la población de progenitores que constituyen el tubo neural, (2) la organización de los progenitores en respuesta a señales externas, necesaria para la generación de diversidad a lo largo del tubo, y (3) la diferenciación de las células progenitoras en neuronas de diferentes subtipos (Bayraktar *et al.*, 2015; Jessell, 2000; Jessell *et al.*, 2000; Rowitch *et al.*, 2010).

### Inducción neural

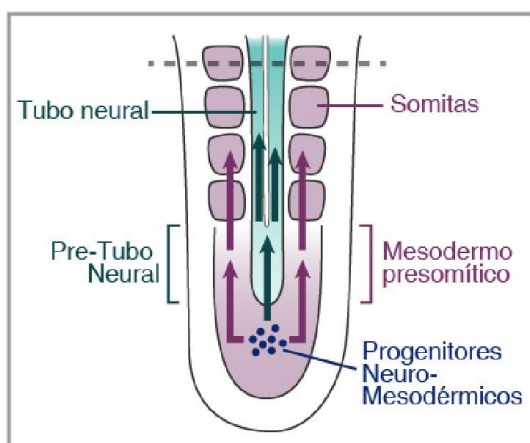
La diferenciación de la médula espinal, al igual que la de cualquier otro órgano, es la consecuencia de un programa transcripcional que dirige la expresión génica en las células progenitoras. Ese programa se establece a partir de moléculas inductoras, generadas por estructuras o células vecinas, que promueven cambios en las células blanco.



**Figura 1. Inducción neural y neurulación.**

**A)** Durante la inducción neural, la porción media del ectodermo (ECT) se diferencia en placa neural. Por debajo se ubican la notocorda (N) y el mesodermo paraxial. **B)** En la neurulación, las células se angostan y la placa neural se pliega formando el surco neural. Las células de la placa del piso (pp) se evidencian en la línea media ventral. Lateralmente el mesodermo se organiza en somitas (S). **C)** El ectodermo neural se independiza del epidérmico formando el tubo neural. Las células más dorsales constituyen la placa del techo (pt), mientras que algunas células del límite entre el ectodermo neural y no-neural delaminan como cresta neural (CN). Para formar la médula espinal la placa neural además es sometida a la acción de señales caudalizantes (Fgf, Wnt, ácido retinoico). ECT ectodermo; MES mesodermo; END endodermo (Figura adaptada de Tanabe *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, se ha descrito que la médula espinal se origina a partir del mismo proceso que genera las regiones anteriores del SNC (Jessell, 2000; Jessell *et al.*, 2000). La hipótesis de activación-transformación (originalmente propuesta por Nieuwkoop en 1952) propone que en el embrión temprano se induce la formación de la placa neural anterior a partir del ectodermo. Dicho proceso incluye señalización por Fgf y antagonistas de Bmp4 producidos desde el nodo de Hensen y la notocorda (proceso de *activación*). Esa placa neural, de carácter anterior, es transformada por señales como ácido retinoico, Fgf y Wnt3a para generar las regiones más caudales del SNC (cerebro posterior y médula espinal, Jessell *et al.*, 2000; Stern, 2001, 2005; Tanabe *et al.*, 1996). Durante la neurulación, la placa neural se constituye sucesivamente en surco y tubo neural, físicamente separado del ectodermo del que se originó (Figura 1). El tubo neural recién constituido se subdivide en vesículas, que dan origen a las distintas estructuras rostro-caudales. La porción más anterior, el telencéfalo, genera los hemisferios cerebrales, mientras que la porción más caudal origina la médula espinal.



**Figura 2. Contribución de progenitores neuro-mesodérmicos (PNM) al desarrollo de la médula espinal.**

En la región caudal del embrión se identificaron progenitores multipotentes que contribuyen tanto con el SN como con el mesodermo somítico. Los PNM atraviesan primero el pre-tubo neural o el mesodermo presomítico antes de incorporarse al tubo neural o a los somitas respectivamente. Aún no se ha determinado si ésta es la principal fuente de la médula espinal o si se trata de una situación híbrida con la neurulación clásica (Figura adaptada de Gouti *et al.*, 2015; Henrique *et al.*, 2015).

Recientemente se ha revalorizado una hipótesis alternativa que propone un origen distinto para el tubo neural caudal (Gouti *et al.*, 2015; Henrique *et al.*, 2015). Mediante análisis clonales, se han identificado progenitores que contribuyen tanto con el tubo neural como con el mesodermo somítico o paraxial (Brown *et al.*, 2000; Tzouanacou *et al.*, 2009). Esos progenitores neuro-mesodérmicos (PNM) se originan a partir de las regiones caudales del embrión, son inducidos por Fgf8 y Wnt3a, y expresan marcadores de mesodermo y tejido nervioso como Brachiury y Sox2. Los PNM primero forman parte de la región denominada pre-tubo neural, para luego integrarse como progenitores neurales al tubo (Figura 2). Se ha encontrado que esos PNM contribuyen a la formación de la médula espinal desde el extremo caudal hasta la altura del somita 6. Resta elucidar

si la médula espinal se origina exclusivamente a partir de PNM o si se trata de un proceso híbrido en conjunto con la inducción neural y caudalización planteados en el modelo tradicional (Gouti *et al.*, 2015; Henrique *et al.*, 2015).

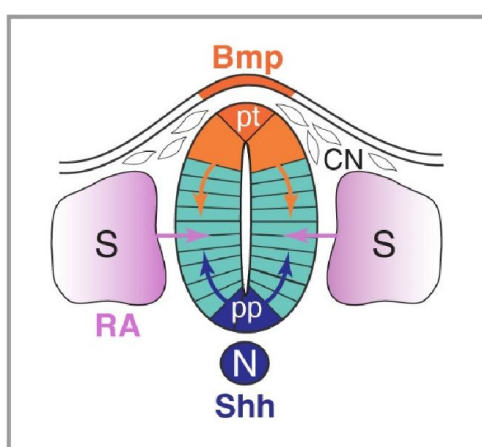
### **Organización del tubo neural – *Patterning***

Una vez constituido el tubo neural surge el interrogante de cómo se generan los múltiples tipos celulares (neuronales y gliales) a partir de progenitores inicialmente equivalentes. Esos progenitores quedan alojados en la región adyacente al ventrículo (la zona ventricular), expuestos a señales externas. De manera simplificada, pueden definirse dos ejes ortogonales en el tubo neural (antero-posterior y dorso-ventral) a lo largo de los cuales gradientes de morfógenos proporcionan coordenadas cartesianas que regulan redes transcripcionales en los progenitores. La información posicional así proporcionada determina la identidad de los subtipos neuronales y gliales producidos (Briscoe *et al.*, 2001; Gouti *et al.*, 2015; Guillemot, 2007; Jessell, 2000; Rowitch *et al.*, 2010).

La señalización a lo largo del **eje antero-posterior** permite la formación de las estructuras macroscópicas especializadas que conforman al SNC. En particular, señales de las vías de Fgf, ácido retinoico y Wnt3a son necesarias para la formación de la médula espinal, ya sea a través de la caudalización del tubo neural o de la inducción de PNM (Gouti *et al.*, 2015; Henrique *et al.*, 2015; Jessell, 2000). Adicionalmente, al igual que lo que ocurre con el plan corporal de todos los animales, existe una expresión diferencial de genes Hox a lo largo del eje antero-posterior que incide sobre las poblaciones neuronales de distintas posiciones segmentales. El ejemplo mejor documentado es el de las motoneuronas, en las que el código de genes Hox determina la formación de neuronas preganglionares del SN autónomo, la organización de la columna lateral a la altura de los miembros, o la segregación de las motoneuronas que inervan músculos específicos (Dasen *et al.*, 2008; Dasen *et al.*, 2003; Jessell, 2000; Maden, 2006; Shirasaki *et al.*, 2002).

Los progenitores a lo largo del **eje dorso-ventral** están expuestos a gradientes de sentido opuesto de morfógenos, secretados por centros organizadores ventrales como la notocorda y la placa del piso (extremo ventral del tubo neural), o dorsales como el ectodermo dorsal y la placa del techo (extremo dorsal del tubo neural). La notocorda es

un cordón de células mesodérmicas que se extiende a lo largo de la línea media, ventral al tubo neural, y es responsable de producir, junto a la placa del piso, la proteína *Sonic hedgehog* (Shh, Briscoe *et al.*, 2001; Briscoe *et al.*, 2008; Goulding *et al.*, 2002; Guillemot, 2007; Jessell, 2000). Shh ha sido identificado como el morfógeno responsable de la ventralización del tubo neural (Ericson *et al.*, 1996; Ericson *et al.*, 1997; Roelink *et al.*, 1995; Tanabe *et al.*, 1996). Dado su carácter difusible, se establece un gradiente ventral alto-dorsal bajo de actividad de Shh (Jessell, 2000) que induce la adquisición de identidades progenitoras diferenciales a lo largo del eje dorso-ventral (Figura 3, Briscoe *et al.*, 2001; Ericson *et al.*, 1997; Jessell, 2000).



**Figura 3. Gradientes de morfógenos en el tubo neural.**

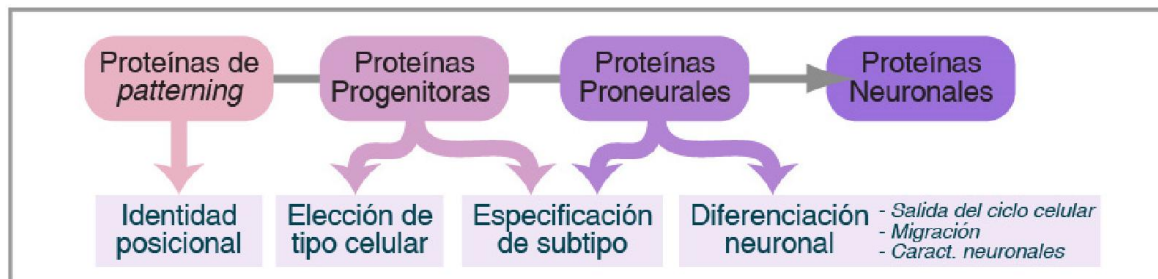
En el SNC, se establecen centros organizadores que producen señales difusibles. Las células de la notocorda (N) producen Shh, mientras que el ectodermo dorsal, produce Bmp. La acción de Shh y Bmp inducen la formación de la placa del piso (pp) y del techo (pt) respectivamente. De esa manera, quedan establecidos dos gradientes opuestos en el eje dorso-ventral. Adicionalmente, los somitas (S) contribuyen con señalización de ácido retinoico (RA). Las diferentes concentraciones de morfógenos definen dominios de progenitores a lo largo del eje dorso-ventral. CN cresta neural (Figura adaptada de Tanabe *et al.*, 1996).

Otros morfógenos asociados a la adquisición de identidades neurales son los retinoides, producidos por el mesodermo somítico, que inducen la especificación de algunas neuronas ventrales; y las proteínas de las familias Bmp y Wnt, producidas por la placa del techo y el ectodermo dorsal, y principales responsables del *patterning* del tubo neural dorsal (Briscoe *et al.*, 2001; Jessell, 2000; Liu *et al.*, 2005; Pierani *et al.*, 1999). Sin embargo, también se ha demostrado la participación de Bmp/Wnt en el *patterning* del tubo neural ventral a través de la limitación de la acción ventralizante de Shh (Barth *et al.*, 1999; Briscoe *et al.*, 2001; Briscoe *et al.*, 2008; Jessell, 2000; Liem *et al.*, 1995).

## Diferenciación neuronal - Proteínas proneurales

Durante la neurogénesis, la acción secuencial de factores de transcripción contribuye a definir los destinos postmitóticos de las neuronas generadas. El establecimiento de la identidad posicional es seguido por la expresión de genes asociados a identidades específicas, que vuelve competentes a las células progenitoras para producir tipos

celulares definidos. La diferenciación propiamente dicha, que incluye el arresto de la proliferación y la migración estereotípica fuera de la zona ventricular hacia la zona marginal, está coordinada por proteínas proneurales. Esas proteínas, finalmente controlan la expresión de determinantes de identidad neuronal y la consecuente adquisición de características neuronales específicas (Figura 4, Ge *et al.*, 2006; Guillemot, 2007; Jessell, 2000).



**Figura 4. Proteínas que controlan la diferenciación neuronal.**

El proceso de generación de una neurona a partir de un progenitor indiferenciado requiere de la acción secuencial de numerosas proteínas cumpliendo más de una función. Las proteínas proneurales son responsables de la neurogénesis o diferenciación neuronal (por lo que recibieron su nombre) y también participan de la especificación de subtipo (adaptado de Guillemot, 2007).

Las proteínas proneurales Neurog1-3, Ascl1 y Atoh1 son factores de transcripción activadores, miembros de la familia bHLH (*basic Helix Loop Helix*). Han demostrado ser necesarios y suficientes para la generación de neuronas a partir de progenitores indiferenciados tanto *in vivo* como *in vitro* (Arlotta *et al.*, 2014; Bertrand *et al.*, 2002; Guillemot, 2007; Imayoshi *et al.*, 2014). Esas proteínas inducen la neurogénesis actuando sobre distintos blancos: (a) activan la diferenciación de algunos progenitores y previenen la de las células vecinas a través de la vía de Notch (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2002; Fortini, 2009; Ge *et al.*, 2006), (b) promueven la salida del ciclo celular inhibiendo los genes Sox1-3 y activando inhibidores del ciclo (Bertrand *et al.*, 2002; Guillemot, 2007), (c) inducen la migración y la expresión de otros factores de transcripción importantes en la consolidación de la identidad neuronal (Bertrand *et al.*, 2002; Guillemot, 2007; Rowitch, 2004; Rowitch *et al.*, 2010), y (d) inhiben la diferenciación en astrocitos mediante el secuestro de complejos transcripcionales gliogénicos y la inhibición de la vía Jak/Stat (Guillemot, 2007; Imayoshi *et al.*, 2014). Además de esa función neurogénica clásica, se observó que distintas proteínas proneurales influyen sobre la especificación de destino. Mediante experimentos de sobreexpresión ectópica se encontró que la ganancia de función de genes proneurales altera los planes de diferenciación preestablecidos para una región, imponiendo destinos

particulares asociados al gen sobreexpresado (Figura 4). Así se demostró que la expresión de *Ascl1*, por ejemplo, induce la generación de neuronas GABAérgicas en el telencéfalo ventral, mientras que la diferenciación de las neuronas glutamatérgicas dorsales depende de *Neurog1-2* (Fode *et al.*, 2000; Imayoshi *et al.*, 2014; Schuurmans *et al.*, 2002).

El patrón de expresión de los genes proneurales está determinado espacialmente por represiones cruzadas entre ellos y por la actividad de los genes de *patterning*. La capacidad de las proteínas proneurales de unirse al DNA, a través de la región básica del dominio bHLH, depende de la formación de heterodímeros con proteínas E (E12, E47, HEB o E2-2 en mamíferos) mediados por el dominio HLH (Bertrand *et al.*, 2002; Guillemot, 2007). Adicionalmente, la actividad de esas proteínas es regulada a múltiples niveles. Las proteínas bHLH inhibitorias *Hes* y *Hey*, efectores de la señalización por Notch, regulan negativamente la expresión de *Ascl1* y *Neurog2*. Por otro lado, las proteínas *Id* (por *Inhibit differentiation*), dependientes de señalización por Bmp, actúan secuestrando a las proteínas E, y antagonizando a las proteínas proneurales (Imayoshi *et al.*, 2014; Imayoshi *et al.*, 2008).

## ESPECIFICACIÓN NEURONAL

En la sección anterior se revisó brevemente el desarrollo de la médula espinal y la diferenciación neuronal. En este apartado se discuten los mecanismos detrás de la especificación de subtipos de neuronas, en particular en la médula espinal ventral, de interés para esta tesis.

### Mecanismos espaciales – Diversidad en el eje dorso-ventral

Como se señaló anteriormente, los progenitores están expuestos a gradientes de morfógenos a lo largo del eje dorso-ventral. La combinación y concentración de señales que recibe un progenitor determina su identidad posicional y condiciona el tipo de neurona que generará posteriormente. En las últimas décadas se ha alcanzado una comprensión detallada de cómo los gradientes de morfógenos son interpretados y traducidos en el establecimiento de los distintos *dominios progenitores*. Esos dominios son grupos de progenitores restringidos espacialmente que expresan una combinación de factores de transcripción específica. Si bien parte de la lógica transcripcional fue

descrita hace muchos años (Briscoe *et al.*, 2001; Briscoe *et al.*, 2000; Ericson *et al.*, 1996; Ericson *et al.*, 1997; Goulding *et al.*, 2000; Jessell, 2000; Jessell *et al.*, 1996; Roelink *et al.*, 1995) existen avances recientes que desentrañan el complejo proceso de interpretación de un gradiente (Balaskas *et al.*, 2012; Dessaud *et al.*, 2010; Kicheva *et al.*, 2015).

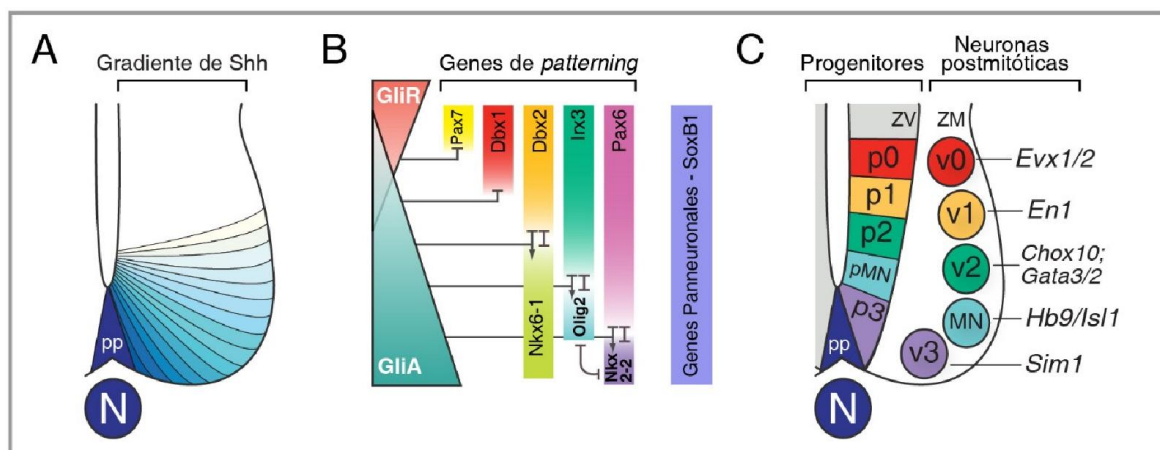
### Interpretación del gradiente de Shh

El gradiente dinámico de Shh presenta componentes espaciales y temporales, donde la integración de los niveles y el tiempo de exposición determinan la activación de redes transcripcionales (Balaskas *et al.*, 2012; Briscoe *et al.*, 2001; Briscoe *et al.*, 2015; Dessaud *et al.*, 2010; Jessell, 2000; Kicheva *et al.*, 2015; Stamatakis *et al.*, 2005). Ese gradiente de actividad es traducido e interpretado en la activación y represión de factores de transcripción, que resulta en territorios de expresión restringidos dorso-ventralmente y definen los dominios de progenitores. Los factores de transcripción que actúan en ese paso son las proteínas que contienen homeodominio de las familias Nkx, Pax, Irx y Dbx, y la proteína con dominio bHLH Olig2 (Figura 5, Briscoe *et al.*, 2001; Briscoe *et al.*, 2000; Guillemot, 2007; Jessell, 2000).

Shh controla la actividad de los factores de transcripción Gli, que pueden presentar variantes activadoras (GliA) o represoras (GliR) según los niveles del morfógeno. De esa manera, el gradiente de Shh se convierte en dos gradientes opuestos de actividades GliA y GliR (Briscoe *et al.*, 2001; Jessell, 2000; Oosterveen *et al.*, 2012). Existen dos mecanismos distintos para la señalización de Shh: local o de largo alcance. Para la expresión de los blancos más ventrales, más próximos a la fuente de Shh, la actividad GliA es responsable de la inducción. Por otro lado, genes con territorios de expresión más dorsales necesitan la des-represión de las proteínas GliR para expresarse (Cohen *et al.*, 2013; Litingtung *et al.*, 2000; Oosterveen *et al.*, 2012; Persson *et al.*, 2002). Se ha propuesto que diferencias en la afinidad de los sitios de unión a Gli en las regiones regulatorias de los genes de *patterning* subyacen a la interpretación del gradiente de Shh y explican las restricciones dorso-ventrales en los dominios de expresión. Los genes que requieren activación presentan sitios de mayor afinidad, mientras que los genes de expresión distal, que dependen de la des-represión por GliR, presentan sitios de menor afinidad (Cohen *et al.*, 2013; Oosterveen *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2012). Sin embargo, ese no parece ser el único mecanismo de interpretación del gradiente.

Los elementos regulatorios de los genes de *patterning* presentan, además, sitios de unión de proteínas panneurales (de la familia SoxB1) que se expresan uniformemente en

la zona ventricular. Esos sitios poseen una activación independiente de Shh/Gli y otorgan contexto neural a la activación de Shh, al mismo tiempo que contribuyen a establecer el umbral de GliA/GliR necesario para la transcripción (Briscoe *et al.*, 2015; Cohen *et al.*, 2013; Oosterveen *et al.*, 2012; Oosterveen *et al.*, 2013; Peterson *et al.*, 2012). Adicionalmente, los factores de transcripción se regulan mutuamente mediante represiones cruzadas (como la interacción del par Pax6 y Nkx2-2, Figura 5B, Briscoe *et al.*, 2000; Briscoe *et al.*, 1999; Ericson *et al.*, 1997) que contribuyen a definir el territorio de expresión de un gen y a establecer límites precisos entre dominios.



**Figura 5. Especificación de neuronas espinales ventrales.**

**A)** Gradientes opuestos de morfógenos definen el *patterning* dorso-ventral y el establecimiento de dominios progenitores. En la medula espinal ventral, Shh es el morfógeno más relevante. **B)** El gradiente de Shh se traduce en dos gradientes opuestos del factor de transcripción Gli activador (GliA) y Gli represor (GliR). Distintos niveles de actividad Gli (dependiente de Shh) activan y reprimen la expresión de los genes de *patterning*. La expresión de esos genes depende de la combinación de tres factores: el balance de actividad GliA/GliR Shh dependiente, la actividad de genes panneuronales de la familia SoxB1 (que aporta contexto neuronal y ayuda a establecer el umbral de actividad Gli) y la represión cruzada entre los genes de *patterning* (Nkx2-2/Pax6, por ejemplo). **C)** La combinación particular de genes de *patterning* que se expresa en distintas posiciones en la médula espinal ventral, determina el establecimiento de dominios de progenitores a lo largo del eje dorso-ventral (p0-p3 y pMN), que dan origen a poblaciones postmitóticas de interneuronas (V0-V3) y motoneuronas (MN) identificadas por la expresión de marcadores moleculares. pp, placa del piso; ZV, zona ventricular; ZM, zona del manto (Figura adaptada de Jessell, 2000).

Finalmente, la interpretación del gradiente y de la identidad posicional de los progenitores es impartida, a nivel transcripcional, por el balance de la actividad GliA/GliR, dependiente de Shh, la activación por proteínas SoxB1, y las represiones cruzadas entre los propios genes de *patterning* (Figura 4, Briscoe *et al.*, 2015; Cohen *et al.*, 2013; Oosterveen *et al.*, 2013). Esas redes transcripcionales otorgan robustez a la interpretación del gradiente frente a fluctuaciones de la señal, y se ha propuesto que presentan histéresis (memoria)

que permite el mantenimiento del *patterning* aun ante la declinación del gradiente de la proteína inductora (Briscoe *et al.*, 2015; Cohen *et al.*, 2013; Kicheva *et al.*, 2015).

### Dominios de progenitores ventrales

La expresión combinada de los genes de *patterning* define poblaciones discretas de progenitores en la zona ventricular a lo largo del eje dorso-ventral (Briscoe *et al.*, 2001; Jessell, 2000). Temprano en el desarrollo (estadios embrionarios E9.5-E12.5 en el embrión de ratón) el tubo neural atraviesa la fase neurogénica, cuando los progenitores de cada uno de los cinco dominios ventrales proliferan y dan origen a distintas poblaciones postmitóticas de neuronas. Los dominios ventriculares p0, p1, p2 y p3 producen las interneuronas ventrales V0, V1, V2 y V3 respectivamente, y el dominio de progenitores pMN genera las motoneuronas (Figura 5C, Briscoe *et al.*, 2001; Goulding *et al.*, 2000; Jessell, 2000). Cada uno de esos grupos neuronales embrionarios se caracteriza por la expresión de marcadores moleculares, el fenotipo neurotransmisor y un patrón estereotipado de migración y proyección axonal. En los últimos años, se ha demostrado que cada grupo neuronal cumple funciones definidas y esenciales en los circuitos espinales que controlan la actividad motora (Crone *et al.*, 2008; Dougherty *et al.*, 2013; Gosgnach *et al.*, 2006; Goulding, 2009; Lanuza *et al.*, 2004; Talpalar *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2008).

### Diversidad adicional en dominios de progenitores – El dominio p2

A pesar de que el *patterning* del tubo neural es una fuente importante de diversidad celular en la médula espinal, existen mecanismos adicionales que operan dentro de los dominios de progenitores y expanden la variedad de tipos neuronales. Ese enriquecimiento genera el complejo arreglo de subtipos neuronales que asegura el control motor (Goulding, 2009; Goulding *et al.*, 2002; Guillemot, 2007; Jessell, 2000). Por ejemplo, el dominio de progenitores p0, genera las interneuronas inhibitorias V0<sub>D</sub>, glutamatérgicas V0<sub>V</sub> (Lanuza *et al.*, 2004; Pierani *et al.*, 2001), y las interneuronas Pitx2<sup>+</sup> glutamatérgicas y colinérgicas (V0<sub>g</sub> y V0<sub>c</sub>, Zagoraïou *et al.*, 2009).

Por otro lado, el dominio p2 de progenitores genera al menos 5 subtipos de neuronas diferentes, siendo las clases V2a y V2b las mejor estudiadas. Las interneuronas V2a son neuronas glutamatérgicas que expresan los factores de transcripción Chx10, Sox14 y Lhx3 (Briscoe *et al.*, 2000; Crone *et al.*, 2008; Hargrave *et al.*, 2000), y las V2b inhibitorias (GABAérgicas/glicinérgicas) expresan Scl, Gata2 y Gata3 (Karunaratne *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Lundfald *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2000). En los últimos

años, además, se han agregado las neuronas V2c y V2d (Dougherty *et al.*, 2013; Francius *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Panayi *et al.*, 2010; Panayiotou *et al.*, 2013). Por último, resultados recientemente publicados de nuestro laboratorio muestran que el dominio p2 tardío es la principal fuente de las neuronas del canal central (ver más adelante, Petracca *et al.*, 2016).

Hasta el momento, se ha encontrado que las subpoblaciones de neuronas V2 cumplen funciones diferentes dentro de los circuitos motores generadores de patrones centrales (CPG) que coordinan la actividad locomotora (Goulding, 2009; Kiehn, 2006; Kiehn *et al.*, 2003). Las interneuronas V2a excitatorias, junto con neuronas V0, activan vías comisurales que controlan la alternancia izquierda-derecha de los miembros (Crone *et al.*, 2008; Lanuza *et al.*, 2004), mientras que la actividad inhibitoria de las neuronas V2b y V1 permite la inhibición recíproca entre pares musculares flexor-extensor (Zhang *et al.*, 2014). Por otro lado, las interneuronas excitatorias V2d (junto con un subgrupo de neuronas dl5) podrían estar involucradas en la generación de ritmos en los CPG (Dougherty *et al.*, 2013).

La diferenciación de clases neuronales distintas a partir de progenitores p2 comunes ha sido foco de investigación de varios grupos. Se ha demostrado que ese fenómeno depende de decisiones binarias mediadas por la vía de señalización de Notch (Del Barrio *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2007). De manera estocástica, aunque dependiente del factor de transcripción Foxn4, algunos progenitores p2 expresan el ligando *Delta like 4* (Dll4), que activa la vía de Notch en las células vecinas (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Fortini, 2009). En consecuencia, se establecen dos linajes diferentes: las células que expresan el ligando Dll4 generan las interneuronas V2a, mientras que las células vecinas, en las cuales se activa la vía Notch, se diferencian en las neuronas V2b (Del Barrio *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2006).

## **La contribución temporal a la diversidad neural**

Como se describió hasta ahora, los gradientes de morfógenos y el establecimiento de dominios de progenitores dan cuenta de la contribución espacial a la generación de diversidad en el tubo neural. Sin embargo, existe también un importante componente temporal.

### *El componente temporal en la especificación de subtipo*

En algunos casos, la generación de distintos tipos de neuronas a partir de un grupo de progenitores depende de un componente temporal. Los ejemplos paradigmáticos del control temporal de la identidad neuronal son la neurogénesis en la retina y en la corteza cerebral. En la corteza, las neuronas de proyección que ocupan cada capa se generan secuencialmente de “adentro hacia afuera”, de manera que las neuronas de la capa VI, más profundas, se generan antes que las de las capas I-V, más superficiales (Molyneaux *et al.*, 2007; Rakic, 1988). En la retina existe un orden conservado de generación de los distintos tipos neuronales, donde las células ganglionares, horizontales y conos se generan en una primera etapa, seguidas por las células amácrinas y finalmente por los bastones, células bipolares y células de Müller (Cepko, 2014; Livesey *et al.*, 2001).

Si bien no existen ejemplos tan contundentes en la médula espinal, se pueden mencionar algunos casos en los que el momento de la neurogénesis contribuye a generar diversidad. Los dominios de progenitores dorsales dp1-dp6 generan primero (entre los estadios E10-E11.5) las interneuronas dl1-6. Entre E12-E14, los progenitores dorsales se dedican a producir dos tipos de interneuronas tardías, las dILA y dILB, que se distinguen por la expresión de *Lbx1* y distintos patrones migratorios (Gross *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002; Wildner *et al.*, 2006). Por otro lado, en el dominio ventral p1 se generan las células de Renshaw y las interneuronas de inhibición recíproca de manera separada en el tiempo, diferenciándose las células de Renshaw entre los estadios E9-E10, antes que los otros tipos neuronales V1 (Sapir *et al.*, 2004; Stam *et al.*, 2012). Por último, el concepto de heterogeneidad y génesis temporal de oligodendrocitos y astrocitos ha comenzado a ser estudiado más recientemente (Bayraktar *et al.*, 2015; Rowitch *et al.*, 2010). En el caso de los oligodendrocitos se ha encontrado que los generados en estadios embrionarios tempranos (E13.5), tardíos (E16.5) o postnatales, expresan distintos marcadores y cumplen, potencialmente, funciones diferentes. Esas evidencias demuestran que en la médula espinal existe un componente temporal que contribuye a la generación de diversidad celular.

Las neuronas del canal central, introducidas brevemente en la sección anterior, constituyen otro ejemplo de ese fenómeno ya que se generan más tardíamente que el resto de las neuronas espinales. Ese proceso fue recientemente identificado en nuestro laboratorio y los mecanismos genéticos de su diferenciación son abordados en esta tesis.

### Fases neurogénica y gliogénica del desarrollo

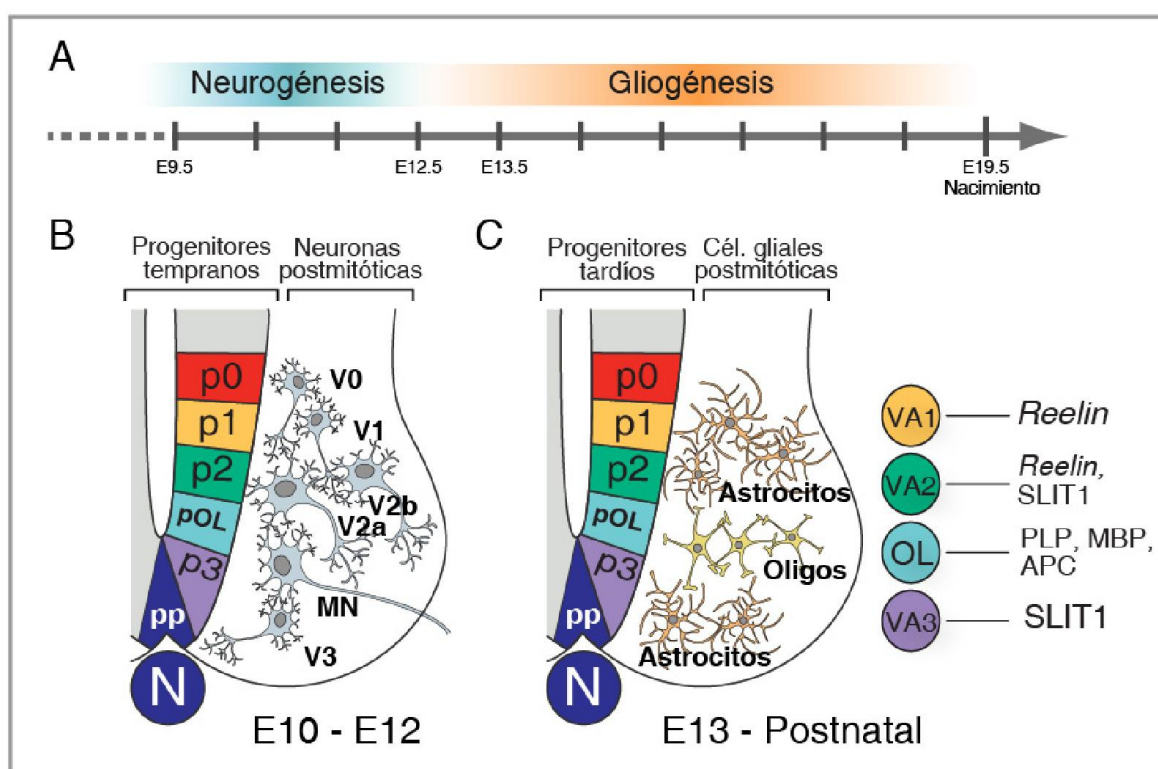
La diferenciación celular en el tubo neural está separada en dos fases claras. Experimentos de pulso y caza han demostrado que el desarrollo de las neuronas precede al de células gliales (Figura 6A, Altman *et al.*, 1984; Rowitch, 2004). Los progenitores del tubo neural caudal atraviesan, en los estadios E9.5-E12.5, una etapa neurogénica en la que se generan las neuronas de la médula espinal (Figura 6B). A continuación, comenzando aproximadamente en E13, comienza la producción de astrocitos y oligodendrocitos (Bayraktar *et al.*, 2015; Rowitch *et al.*, 2010).

Durante la fase gliogénica, la producción de distintos tipos gliales, astrocitos y oligodendrocitos, sigue un arreglo dorso-ventral similar al que dio origen a las clases de neuronas. Los oligodendrocitos se originan del dominio pOL (oligodendrogénico, anteriormente pMN), junto con los dominios dorsales dp3-dp6 (Cai *et al.*, 2000; Fogarty *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2006; Rowitch *et al.*, 2010; Vallstedt *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2002), mientras que los astrocitos se generan a lo largo de todo el neuroepitelio dorso-ventral (Rowitch *et al.*, 2010). Recientemente, se ha identificado que los dominios ventrales p0-p3 producen los subtipos de astrocitos ventrales VA0-VA3 con funciones y marcadores moleculares diferentes (Figura 6C, Hochstim *et al.*, 2008; Molofsky *et al.*, 2014; Muroyama *et al.*, 2005; Rowitch *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012). Finalmente, los progenitores ventrales (fundamentalmente del pOL y p2) remanentes se convierten en ependimocitos que recubren el canal central (sistema ventricular a nivel de la médula espinal, Fu *et al.*, 2003; Spassky *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2013).

Esa secuencia refleja un cambio de competencia en las células de la zona ventricular y, al igual que para la corteza, aún no se ha esclarecido si progenitores individuales son capaces de generar secuencialmente todos los tipos celulares. Mediante análisis clonales se ha propuesto la existencia de progenitores multipotentes que generan primero neuronas y luego glía. Sin embargo, otros estudios sugieren la existencia simultánea de progenitores restringidos a un único tipo celular (Bayraktar *et al.*, 2015; Rowitch, 2004).

Ese *switch* neurogénico-gliogénico ha sido estudiado y se ha demostrado la actividad conjunta de distintos mecanismos (Rowitch *et al.*, 2010). En primer lugar se identificó que los genes proneurales *Neurog2* y *Ascl1* se regulan negativamente justo antes del inicio de la gliogénesis (Niето *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Se ha descrito también que la vía de kinasas Jak/Stat regula el cambio de competencias, donde las neuronas generadas en primer lugar producen la citoquina CT-1, que activa en los progenitores la transcripción de proteínas gliales como *Gfap* y *S100β* (Barnabe-Heider *et al.*, 2005; Miller

*et al.*, 2007). Esa vía interactúa a su vez con las vías de Notch y Bmp para inhibir la neurogénesis y promover la diferenciación glial. Adicionalmente, es posible que la vía de Notch también cumpla funciones instructivas a través del uso de ligandos específicos (Namihira *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2003; Pierfelice *et al.*, 2011; Rabadan *et al.*, 2012). Finalmente, se ha identificado la participación de factores de transcripción *progliales* que inducen activamente la diferenciación glial, como Sox9 y Nfia. Esto se evidencia en animales deficientes para Sox9, en los que no se generan astrocitos ni oligodendrocitos, y distintas poblaciones de neuronas se ven aumentadas debido a la prolongación de la fase neurogénica (Deneen *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2012; Stolt *et al.*, 2003).



**Figura 6. Cronología del desarrollo neural en el ratón.**

**A**) La gestación en el ratón es de aproximadamente 20 días desde el momento de la fecundación (estadio embrionario 0, E0). La fase neurogénica se inicia ~E9.5 y prosigue hasta ~E12.5. Posteriormente tiene lugar la gliogénesis, iniciándose ~E12.5 hasta estadios postnatales tempranos.

**B**) Durante la fase neurogénica, los dominios tempranos de progenitores ventrales (p0-p3 y pMN) dan origen a poblaciones de interneuronas (V0-V3) y a motoneuronas (MN). **C**) Más tardíamente, en la fase gliogénica, los mismos dominios de progenitores son reutilizados para generar distintos tipos de células gliales. El dominio de progenitores pOL genera oligodendrocitos (PLP<sup>+</sup>, MBP<sup>+</sup>, APC<sup>+</sup>), y los dominios de progenitores p1, p2 y p3 generan tres subtipos de astrocitos ventrales (VA): VA1 (*Reelin*<sup>+</sup>), VA2 (*Reelin*<sup>+</sup>, *Slit1*<sup>+</sup>) y VA3 (*Slit1*<sup>+</sup>), respectivamente (Figura adaptada de Rowitch *et al.*, 2010).

Experimentos de nuestro laboratorio (discutidos en detalle más adelante, Petracca *et al.*, 2016) desafían la noción de las fases exclusivas neuro y gliogénica. Como ya se

mencionó, hemos demostrado la existencia de un evento neurogénico en estadios sorprendentemente avanzados, durante la etapa en que se asumía solo se producen células gliales.

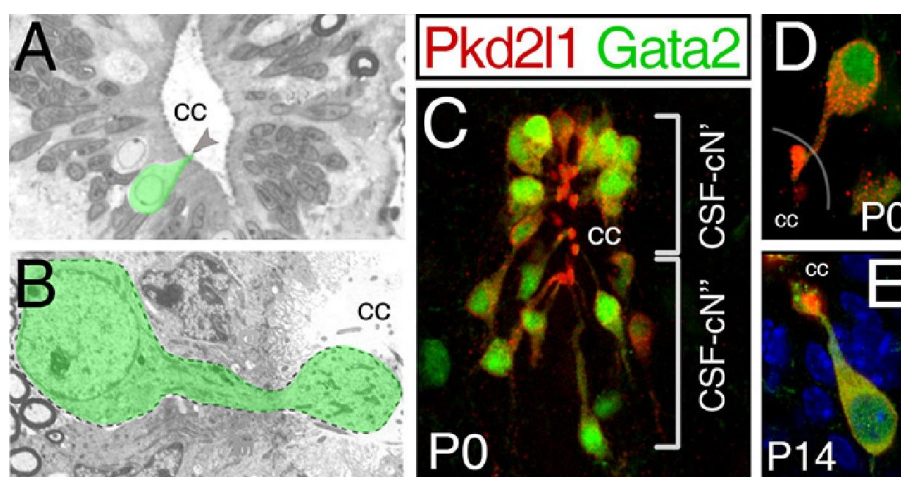
## EVENTOS NEUROGÉNICOS TARDÍOS

Contrario a lo descrito en la literatura, que definía la etapa avanzada del desarrollo espinal como no-neurogénica, identificamos un evento neurogénico en la médula espinal tardía, que ocurre simultáneamente con la producción de astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales. Mediante experimentos de pulso y caza, sumados al uso de marcadores específicos, se determinó que se trata de las Neuronas que contactan con el Fluido Cerebroespinal (CSF-cN), que aparecen tardíamente y se posicionan alrededor del canal central. Su ubicación estratégica en la interfase entre el fluido cerebroespinal (CSF) y el SNC, y su alto grado de conservación en los cordados, convierte a las CSF-cN en una población neuronal sumamente interesante. Además, su origen en estadios avanzados del desarrollo supone una pregunta intrigante respecto de los mecanismos capaces de inducir diferenciación neuronal e inhibir la generación de glía y endotelios en esa etapa. En ese contexto, nos dispusimos a estudiar los mecanismos genéticos de la diferenciación de las CSF-cN en la médula espinal de ratón.

### Las Neuronas que contactan con el Fluido Cerebroespinal (CSF-cN)

Las CSF-cN forman parte del denominado *sistema de neuronas que contactan con el CSF*, descrito hace más de un siglo (Vigh *et al.*, 2004). El CSF presente en los ventrículos y el canal central, está asociado al drenaje de productos de desecho, amortiguación y protección del SNC, entre otras funciones (Brodbelt *et al.*, 2007; Lun *et al.*, 2015). La mayoría de las neuronas del SNC se encuentran aisladas del CSF por el epitelio endotelial que recubre las cavidades (Bruni, 1998; Del Bigio, 1995; Fu *et al.*, 2003). Sin embargo, inmersas en ese epitelio endotelial existen neuronas que tienen contacto directo con el fluido cefalorraquídeo. La primera descripción de esa clase de neuronas fue realizada por Landolt en el siglo XIX en la retina de anfibios (Landolt, 1871; Vigh *et al.*, 2004). Posteriormente, a principios del siglo XX, se identificaron neuronas en contacto con el CSF a nivel del cuarto ventrículo y canal central, las denominadas **CSF-cN espinales** (Agduhr, 1922; Kolmer, 1921; Studnicka, 1900). Esas neuronas se encuentran extensamente conservadas en todos los cordados estudiados (Figura 7),

incluyendo cefalocordados (anfioxos, Vigh *et al.*, 1998), ciclostomados como lamprea (Vigh-Teichmann *et al.*, 1980) y mixinos (Vigh *et al.*, 1992), peces cartilaginosos (*Raja clavata*, Vigh, 1983), peces óseos (teleósteos como el pez cebra-*Danio rerio*, Vigh, 1977) y múltiples especies de tetrápodos: anfibios, aves, reptiles y mamíferos desde roedores hasta primates (Dale *et al.*, 1987b; Djenoune *et al.*, 2014; LaMotte, 1987; Vigh *et al.*, 1977). En honor a los dos científicos que contribuyeron a su identificación en anfibios y peces, se las conoce como neuronas Kolmer-Agduhr (KA, *Xenopus laevis* y *Danio rerio*, Dale, 1987).



**Figura 7. Las Neuronas que contactan con el CSF (CSF-cN).**

**A)** Las CSF-cN espinales están presentes en distintas especies de vertebrados no amniotas, entre ellas en la carpa (*Cyprinus carpio*). La flecha señala una célula contactando el canal central (cc), coloreada en verde, en una micrografía electrónica (adaptado de Vigh-Teichmann *et al.*, 1974). **B)** Las CSF-cN espinales también han sido descritas en vertebrados amniotas como el ratón. En la micrografía electrónica, se observa una CSF-cN coloreada en verde (adaptado de Vigh-Teichmann *et al.*, 1983). **C-E)** Las CSF-cN expresan el canal iónico Pkd211 y el factor de transcripción Gata2. Secciones transversales de médula espinal de ratón teñidas con anticuerpos contra Pkd211 y GFP en animales *Gata2<sup>GFP</sup>* en estadio perinatal (P0, C-D) o postnatal 14 (P14, E). En azul en E, Hoechst tiñe los núcleos del epéndimo. Se destaca la ubicación subependimal de las CSF-cN y la extensión de un proceso a través del epéndimo que culmina con un ensanchamiento en contacto con el CSF (B, D-E). Las CSF-cN', más dorsales, se posicionan laterales al canal central, mientras que las CSF-cN'' se ubican ventrales al mismo (C, C-E adaptados de Petracca *et al.*, 2016).

En roedores, las CSF-cN presentan sus somas en posición inter o subependimal y extienden una proyección de naturaleza dendrítica (MAP2<sup>+</sup>, Orts-Del'Immagine, 2014) que culmina con un engrosamiento en contacto con el CSF (Figura 8, Marichal *et al.*, 2009; Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Stoeckel *et al.*, 2003; Vigh *et al.*, 1971). Mediante inmunohistoquímica se demostró, en todas las especies analizadas, que las CSF-cN son GABAérgicas (Christenson *et al.*, 1991; Dale *et al.*, 1987b; Djenoune *et al.*, 2014; Harper *et al.*, 1993; Petracca *et al.*, 2016; Stoeckel *et al.*, 2003). Adicionalmente, análisis de

expresión y electrofisiológicos realizados en nuestro y otros laboratorios, arrojaron que las CSF-cN son una población con características de neuronas inmaduras (Marichal *et al.*, 2009; Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2004; Sabourin *et al.*, 2009; Stoeckel *et al.*, 2003)

A pesar de haber sido descritas hace muchos años, las funciones de las CSF-cN recién están empezando a ser esclarecidas. Su ubicación en la interfase entre el CSF y el SNC ha sugerido funciones relacionadas con la detección de distintos tipos de señales. En primer lugar, han sido asociadas a funciones mecanorreceptoras. El proceso dendrítico de las CSF-cN, en contacto con el CSF, está cubierto por un número variable de estereocilias y un cilio largo móvil (Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Vigh *et al.*, 2004; Vigh *et al.*, 1998), que le permitiría monitorear cambios en la presión o el flujo del CSF (Kolmer, 1921; Vigh *et al.*, 2004). En lamprea y otros organismos, se ha propuesto a las CSF-cN como detectoras del movimiento y moduladoras de los circuitos locomotores (Christenson *et al.*, 1991; Grillner, 1985; Jalalvand *et al.*, 2016; Jalalvand *et al.*, 2014). Más recientemente, en el pez cebra se identificó que las CSF-cN modulan la locomoción en estadios larvales a través de circuitos locales con las interneuronas excitatorias V0v (Fidelin *et al.*, 2015; Wyart *et al.*, 2009).

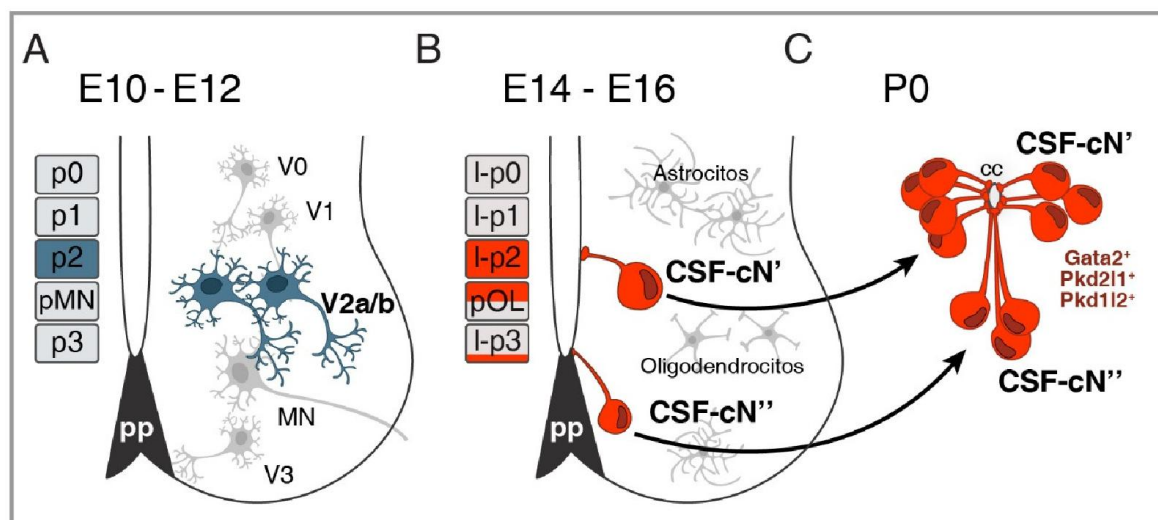
Se han propuesto también para esas neuronas funciones quimiosensoras (Vigh *et al.*, 2004). Se identificó que las CSF-cN expresan el canal catiónico Pkd2l1 (*Polycystic kidney disease 2 like 1*, Figuras 8C-E, Huang, 2006), componente de los receptores gustativos de la lengua sensibles al pH (Huang *et al.*, 2006; Inada *et al.*, 2008; Ishimaru *et al.*, 2006; Kawaguchi *et al.*, 2010; Orts-Del'immagine *et al.*, 2012; Shimizu *et al.*, 2009). La expresión de ese receptor sugiere que las CSF-cN podrían estar monitoreando la calidad del CSF. En concordancia con esa hipótesis, se demostró que esas neuronas responden a cambios en pH y osmolaridad (Huang *et al.*, 2006; Orts-Del'immagine *et al.*, 2012), y que las corrientes de los canales Pkd2l1 son capaces de generar potenciales de acción en esas neuronas (Orts-Del'Immagine *et al.*, 2016). Resultados recientes sugieren que las CSF-cN de lamprea son neuronas sensoriales bimodales, en las que coexisten ambas modalidades (Jalalvand *et al.*, 2016).

## **Ontogenia de las CSF-cN**

Como se describió anteriormente, en nuestro laboratorio se demostró que las CSF-cN son una población de neuronas de origen ventral que se genera tardíamente en la médula espinal del ratón y el pollo (Figura 9B, Kutna *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016).

En el embrión murino, las primeras CSF-cN surgen en E14.5 a partir de progenitores que proliferan entre E13-E14.5, durante la fase gliogénica (E12.5-postnatal) y posterior a la diferenciación de todas las interneuronas espinales (E9.5-E12.5, Altman *et al.*, 1984; Guillemot, 2007; Jessell, 2000). El desarrollo llamativamente tardío de las CSF-cN en rata, ratón y pollo, se opone a lo descrito para otras especies no amniotas como el pez cebra y *Xenopus*, donde las CSF-cN (neuronas KA) se generan simultáneamente con motoneuronas e interneuronas, antes del desarrollo de precursores gliales (Binor *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 1987a; Park *et al.*, 2004; Schafer *et al.*, 2007; Seredick *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2010; Yeo *et al.*, 2007).

Adicionalmente, encontramos que esas neuronas expresan los factores de transcripción Gata2 y Gata3, también expresados por las neuronas CSF-cN/KA en pez cebra (Figuras 7C-E, Yang *et al.*, 2010).



**Figura 8. El desarrollo de las CSF-cN en la médula espinal ventral.**

**A)** Esquema de la médula espinal E10-E12, con los dominios de progenitores ventrales que dan origen a motoneuronas e interneuronas V0-V3 a lo largo del eje dorso-ventral. El dominio p2 temprano genera las interneuronas V2a/b, entre otras, marcadas en azul. **B)** Diagrama de la médula espinal ventral E14-E16 mostrando la diferenciación de las CSF-cN junto con astrocitos y oligodendrocitos. La mayoría de las CSF-cN nacen de progenitores tardíos del dominio p2 y de la porción dorsal del dominio pOL. Una proporción menor de las CSF-cN surge de progenitores en la frontera con la placa del piso (pp). **C)** Los dominios p2/pOL contribuyen con las CSF-cN' que se ubican laterales al canal central (cc), mientras que del límite entre el dominio p3 y la placa del piso se generan las CSF-cN'', ventrales al canal. Las dos poblaciones se diferencian por su ubicación, origen, mecanismos genéticos de desarrollo y propiedades fisiológicas (adaptado de Petracca *et al.*, 2016).

Las CSF-cN en la médula espinal del ratón se originan a partir de dos fuentes diferentes de progenitores y cada uno de ellos contribuye con un subgrupo de CSF-cN (Figura 8, Petracca *et al.*, 2016). El origen dual de las CSF-cN en el ratón guarda similitud con su

origen en pez cebra (Djenoune *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2004; Schafer *et al.*, 2007; Seredick *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2010; Yeo *et al.*, 2007):

- El 80% de las CSF-cN se genera a partir de progenitores del dominio p2 y de la mitad dorsal del pOL (Nkx6-1<sup>+</sup>,Pax6<sup>+</sup>), y reciben el nombre de **CSF-cN'**, de ubicación lateral al canal central;
- El 20% de las CSF-cN es producido por progenitores del dominio p3, en la frontera con la placa del piso (Nkx6-1<sup>+</sup>,Nkx2-2<sup>+</sup>,Foxa2<sup>+</sup>), y son denominadas **CSF-cN''**, localizadas ventrales al canal central.

El origen tardío de esas neuronas implica mecanismos duales, que inducen la producción de neuronas, y previenen la especificación gliogénica o endimaria. Además, sugiere que los mecanismos que median la diferenciación de las CSF-cN serían diferentes entre amniotas y no amniotas, debido al desarrollo temprano de las CSF-cN en ese último grupo (ej: pez cebra y *Xenopus*).

En ese contexto el objetivo de esta tesis es determinar la regulación genética detrás de la neurogénesis tardía de las CSF-cN en la médula espinal del ratón (como modelo de especie amniota).

## **ASCL1, GATA2/3 Y LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CSF-CN**

La identidad celular es producto de la interacción entre factores extrínsecos e intrínsecos, que culminan en redes transcripcionales que definen un destino. En esta tesis se estudia la participación de los factores de transcripción Ascl1 y Gata2/3 en la especificación de las CSF-cN. A partir de la observación de su patrón de expresión, postulamos a la proteína proneural Ascl1 como reguladora de la neurogénesis tardía en la médula espinal. Por otra parte, estudios previos del laboratorio revelaron que los factores de transcripción Gata2 y Gata3 se expresan en las CSF-cN, sugiriendo un rol en su especificación.

### **El factor de transcripción proneural Ascl1**

La proteína proneural Ascl1 (*Achaete Scute Complex like 1*) fue identificada en el ratón por su homología con el complejo proneural *Achaete Scute Complex* de *Drosophila melanogaster* (Johnson *et al.*, 1990). Durante el desarrollo embrionario de roedores y

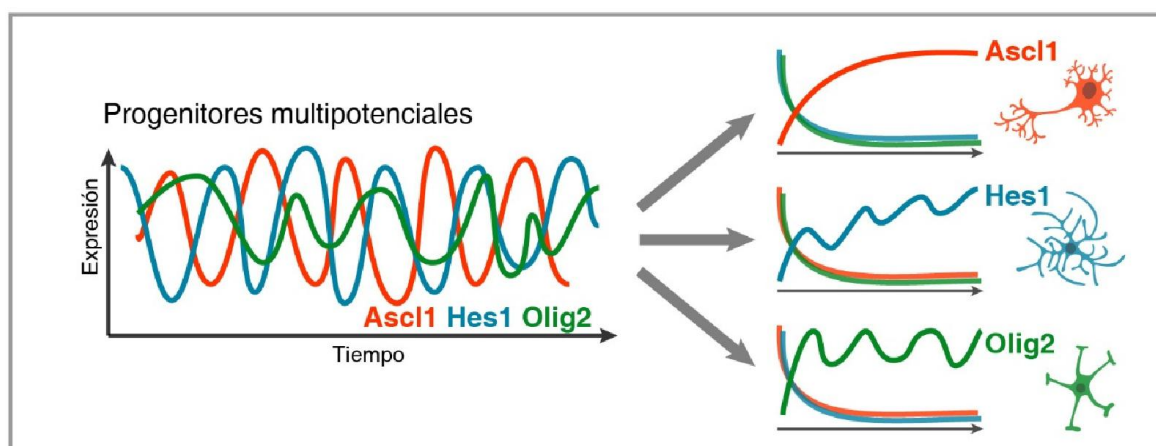
aves, *Ascl1* se expresa en progenitores restringidos del SNC y, a nivel de la médula espinal, en la mitad dorsal y en el dominio de progenitores ventrales p2 (Guillemot *et al.*, 1993a; Lo *et al.*, 1991; Parras *et al.*, 2002). En individuos adultos se mantiene en regiones que conservan capacidad neurogénica, como el giro dentado del hipocampo (Andersen *et al.*, 2014; Parras *et al.*, 2004). El estudio de los mutantes nulos de *Ascl1* detectó defectos en el SN autónomo y en el epitelio olfatorio (Guillemot *et al.*, 1993b), además de neurogénesis alterada que se manifiesta por la retención de progenitores en la zona ventricular y la diferenciación descoordinada (Casarosa *et al.*, 1999; Helms *et al.*, 2005). Por otro lado, la expresión forzada de *Ascl1* es capaz de inducir la diferenciación en neuronas a partir de fibroblastos, pericitos o astrocitos en experimentos de reprogramación *in vitro* e *in vivo* (Arlotta *et al.*, 2014; Karow *et al.*, 2012; Torper *et al.*, 2013; Vierbuchen *et al.*, 2010).

Adicionalmente, *Ascl1* funciona como determinante de la especificación de algunos tipos celulares, en los que su expresión controla la adquisición de identidad. Por ejemplo, la expresión de *Ascl1* induce la generación de neuronas GABAérgicas en el telencéfalo ventral y en el cerebelo (Fode *et al.*, 2000; Grimaldi *et al.*, 2009; Parras *et al.*, 2004). Por otra parte, *Ascl1* es un importante determinante de la identidad noradrenérgica en el sistema nervioso periférico (SNP), de las neuronas serotoninérgicas y de las interneuronas espinales dl3, dl5 y dlA/B (Helms *et al.*, 2005; Kriks *et al.*, 2005; Mizuguchi *et al.*, 2006; Pattyn *et al.*, 2004; Wildner *et al.*, 2006). Esas funciones en la especificación neuronal son propias de *Ascl1* y no son rescatadas por otras proteínas proneurales (Jacob *et al.*, 2009; Parras *et al.*, 2002; Wildner *et al.*, 2006).

Experimentos de mapeo de destino demostraron que *Ascl1* también se expresa en progenitores gliales (Battiste *et al.*, 2007; Nakatani *et al.*, 2013; Vue *et al.*, 2014). Al igual que en otras regiones del SN (Parras *et al.*, 2004), *Ascl1* se encuentra asociado a los linajes de astrocitos dorsales y oligodendrocitos que se producen en el cordón espinal a continuación de la etapa neurogénica (Sugimori *et al.*, 2007; Sugimori *et al.*, 2008; Vue *et al.*, 2014). Su función en el proceso astro/oligodendrogénico aún no ha sido esclarecida.

Mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, se demostró recientemente que *Ascl1* regula la expresión de genes del ciclo celular. Experimentos funcionales indicaron que es necesario para mantener el estado proliferativo de los progenitores (Castro *et al.*, 2011). Las dos funciones antagónicas de *Ascl1* (inducir la salida del ciclo celular y la proliferación) pueden explicarse mediante distintos patrones de expresión. En ese sentido, se encontró que *Ascl1*, al igual que los genes *Hes1* y *Olig2*, presenta una

expresión oscilatoria en los progenitores neurales. En los momentos previos a la última división, se estabiliza la expresión de uno de los tres genes y se inhiben los restantes. El gen estabilizado influye sobre el destino de las células generadas: el mantenimiento de *Ascl1* induce diferenciación en neuronas, mientras que el de *Olig2* o *Hes1* lo hace hacia oligodendrocitos o astrocitos, respectivamente. Se especula que ese mecanismo de oscilaciones contribuye a mantener el estado proliferativo multipotente de los progenitores neurales, aunque no se descarta que también funcione como un reloj celular (Figura 5B, Imayoshi *et al.*, 2013; Imayoshi *et al.*, 2014).



**Figura 9. Mecanismo de acción de los genes proneurales.**

En los progenitores multipotentes en estado proliferativo se detecta la expresión oscilante de tres proteínas bHLH: *Ascl1*, *Hes1* y *Olig2*, necesaria para la proliferación y para mantener el estado multipotente. Antes de la última división celular se estabiliza la expresión de una de ellas tres y se silencia a las restantes. La proteína estabilizada controla el destino celular: *Ascl1* induce la diferenciación neuronal, *Hes1* la generación de astrocitos y *Olig2* la de oligodendrocitos (Figura adaptada de Imayoshi *et al.*, 2014).

## Los factores de transcripción *Gata2* y *Gata3*

*Gata2* y *Gata3* son factores de transcripción que contienen dominios de unión al DNA con dedos de zinc. Forman parte de una familia con 6 miembros que reciben su nombre por la secuencia de nucleótidos conservada que reconocen (WGATAR) en los promotores y regiones regulatorias de más de mil genes específicos de linajes o tejidos (Hosoya *et al.*, 2010). Los factores de transcripción de la familia *Gata* fueron originalmente identificados a partir del estudio de los genes que controlan la síntesis de hemoglobina, por lo que los primeros tres miembros (*Gata1-3*) son considerados los factores hematopoyéticos de la familia. *Gata2* es necesario para la supervivencia y proliferación de las células madre hematopoyéticas, por lo que su ausencia produce una

anemia severa, letal en estadios tempranos del desarrollo (Tsai *et al.*, 1994). Por otro lado, Gata3 controla el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T y *Natural Killer*. Sin embargo, esas proteínas se expresan también en tejidos no hematopoyéticos como endotelio, próstata, glándula mamaria o folículos pilosos de la piel (Bresnick *et al.*, 2012; Hosoya *et al.*, 2010). De los seis miembros de la familia Gata, Gata2 y Gata3 son los únicos que se expresan en el SN (Nardelli *et al.*, 1999), donde participan conjuntamente en la diferenciación de varios tipos neuronales.

Gata3 controla la especificación terminal y sobrevida de las neuronas productoras de norepinefrina en los ganglios simpáticos y en la glándula adrenal, por lo que los animales mutantes nulos mueren en estadios tempranos del desarrollo por falla cardíaca (Lim *et al.*, 2000; Moriguchi *et al.*, 2006; Pandolfi *et al.*, 1995). En la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior, Gata2 y Gata3 se expresan en los progenitores postmitóticos y, mientras que Gata2 se propone como un regulador del programa de diferenciación, Gata3 controla decisiones terminales como la expresión de enzimas asociadas a la síntesis de serotonina (Deneris *et al.*, 2013).

Adicionalmente Gata2 y Gata3, junto con el factor de transcripción Tal1/Scl, están involucrados en el desarrollo de neuronas GABAérgicas en distintas áreas del cerebro. Los factores de transcripción se expresan en precursores postmitóticos en el prosómero 2 del diencéfalo (tálamo, cerebro anterior), en los dominios m3-m5 del cerebro medio, y en el dominio rV2 del rombómero 1 (Kala *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2015; Virolainen *et al.*, 2012), todas ellas, regiones productoras de neuronas GABAérgicas. En la mayoría de los casos, Gata2 y Gata3 parecen cumplir funciones diferentes, con Gata2 controlando la especificación GABAérgica a expensas de destinos glutamatérgicos. Solo en el rombómero 1, se ha encontrado que ambas proteínas son redundantes (Lahti *et al.*, 2015).

Finalmente, en la médula espinal, Gata2 y Gata3 se expresan conjuntamente en las interneuronas V2b y han sido considerados como marcadores selectivos de esa clase neuronal. Además, Gata2 se expresa en células precursoras p2, precediendo su diferenciación en neuronas excitatorias V2a e inhibitorias V2b (Francius *et al.*, 2015; Karunaratne *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2007).

De los casos mencionados, surgen algunas características generales. Existe una alta coexpresión de esos factores de transcripción tanto en el SNC como en otros órganos en desarrollo. En particular, Gata2 y Gata3 suelen coexpresarse en precursores postmitóticos en los que Gata2 precede la activación de Gata3. La función de Gata2/3

está asociada a la elección y/o consolidación de destinos, fundamentalmente neuronas GABAérgicas o monoaminérgicas. Adicionalmente, el factor de transcripción *Scf/Tal1* interactúa con los factores de transcripción *Gata* tanto en hematopoyesis como en el SNC (a excepción de la diferenciación serotoninérgica). Resulta interesante que *Ascl1* está involucrado en los mismos eventos en los que participan los factores de transcripción *Gata2/3*. Por ejemplo, *Ascl1* se expresa en los progenitores de los ganglios simpáticos, de las neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas, y en el dominio p2 de la médula espinal (Del Barrio *et al.*, 2007; Deneris *et al.*, 2013; Kala *et al.*, 2009; Moriguchi *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2007; Virolainen *et al.*, 2012).

En resumen, esta tesis está comprendida dentro del estudio de la regulación genética de la especificación de subtipos neurales, integrando mecanismos de índole espacial y temporal. La diferenciación de las CSF-cN presenta ambos componentes: se generan a partir de progenitores restringidos dorso-ventralmente y en un estadio notablemente avanzado del desarrollo embrionario. Abordamos, entonces, el estudio de los mecanismos genéticos que regulan su especificación.

# OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Esta tesis doctoral se enmarca en el **objetivo general** de comprender los mecanismos que controlan la generación de diversidad celular en la médula espinal en desarrollo, integrando información espacial y temporal.

En particular, estudiamos un evento neurogénico tardío: la diferenciación de las neuronas espinales que contactan con el fluido cerebroespinal (CSF-cN), generadas a partir del neuroepitelio ventral en estadios avanzados, previamente considerados gliogénicos. Utilizamos como modelo experimental la médula espinal de ratón, ya que ofrece una variedad de herramientas genéticas para el estudio de la regulación transcripcional en mamíferos.

A partir de resultados preliminares, proponemos la siguiente **hipótesis** de trabajo:

Los factores de transcripción *Ascl1*, *Gata3* y *Gata2* regulan secuencialmente la diferenciación de las CSF-cN.

Los **objetivos específicos** abordados son:

- 1- Evaluar la expresión de los factores de transcripción *Ascl1* y *Gata3* durante el proceso de diferenciación de las CSF-cN.
- 2- Determinar la función de *Ascl1* en la especificación de las CSF-cN. Analizar diferencias entre especies amniotas y no amniotas. Evaluar la acción espacio-temporal de *Ascl1* y el control de destino celular.
- 3- Caracterizar la participación de *Gata2* y *Gata3* en el desarrollo de las dos subpoblaciones de CSF-cN.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## ANIMALES

Los ratones (*mus musculus*) fueron criados en el bioterio del Instituto Leloir. El laboratorio cuenta con una estantería microventilada (Micro-Vent, Allentown Inc, USA), en la cual cada jaula recibe aire filtrado a través de membranas HEPA (High Efficiency Particle Arresting). En base a las dimensiones de las cajas de cría, se mantuvieron un máximo de 4 animales adultos por jaula. Los ratones tienen acceso a alimento y agua *ad libitum* en un ambiente a temperatura constante (22°C) en ciclos de luz-oscuridad 12-12hs. Todos los experimentos se condujeron respetando las recomendaciones internacionales para la utilización de animales de experimentación (National Research Council, 2011) y bajo protocolos de trabajo aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Fundación Instituto Leloir (Protocolos #24 y #55, Lanuza).

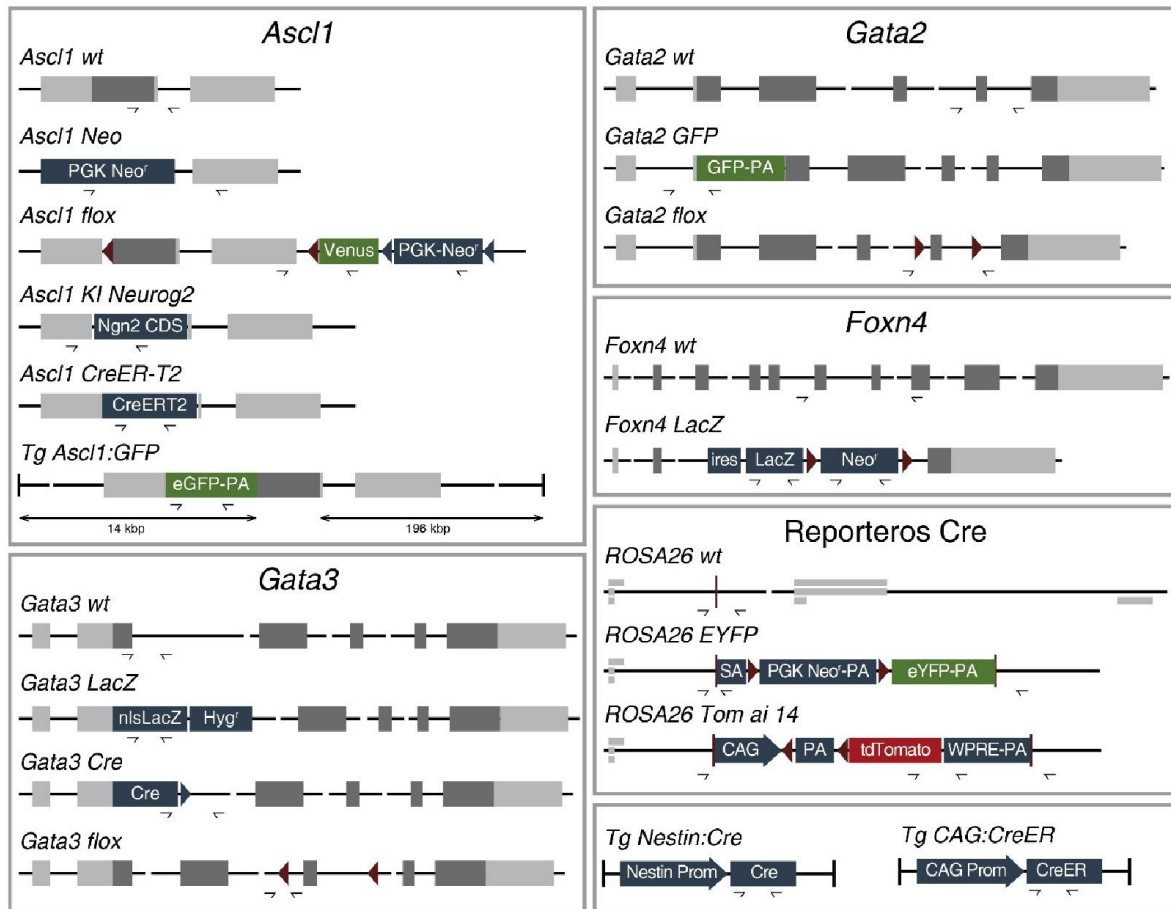
El inicio de la preñez de las hembras fue determinado por la detección del tapón vaginal producto del depósito de secreciones seminales durante la cópula. El mediodía de la detección fue designado estadio embrionario 0.5 días postcópula (E0.5). Adicionalmente, la edad de los embriones fue confirmada mediante la observación de las características anatómicas particulares de cada estadio (Kaufman, 1992).

Se utilizaron ratones exocriados Hsd:ICR (CD-1®, Harlan Laboratories, IN, USA) para los experimentos con animales *wild type* y para el mantenimiento de las líneas genéticamente modificadas. Los animales CD-1 fueron mantenidos bajo una estrategia de exocría.

A continuación se detallan las distintas líneas de ratones modificados genéticamente utilizadas a lo largo de este trabajo (Figura 10).

***Ascl1<sup>Neo</sup>*** (MGI ID: 1857470, Guillemot *et al.*, 1993b). Línea utilizada para generar animales *Ascl1* nulos en la que la región codificante de *Ascl1* fue reemplazada por un *cassette* de resistencia a neomicina. Línea letal en homocigosis (los animales mueren a minutos de nacer).

***Ascl1<sup>K<sup>INgn2</sup></sup>*** (MGI ID: 2388165, Parras *et al.*, 2002). Línea en la que la región codificante de *Ascl1* fue reemplazada por la del factor de transcripción *Neurogenina2*.



**Figura 10. Líneas de ratones modificados genéticamente usadas.**

Esquemas ilustrativos (no a escala) de las líneas de ratones modificados genéticamente utilizadas en este trabajo. Los recuadros gris claro representan exones y los gris oscuro la región codificante. Los triángulos rojos corresponden a sitios *loxP*, mientras que los azules a sitios FRT.

***Ascl1<sup>flox</sup>*** (MGI ID: 5141455, Pacary *et al.*, 2011). Las regiones codificante y 3' UTR de *Ascl1* se encuentran flanqueadas por secuencias *loxP* que permiten su escisión ante la actividad de la recombinasa Cre. A continuación de la señal de poliadenilación endógena de *Ascl1* se insertó la secuencia codificante de la proteína fluorescente Venus, cuya expresión no es detectada en ninguna condición (Pacary *et al.*, 2011). Adicionalmente, contiene un *cassette* de resistencia a neomicina, cuya expresión está dirigida por el promotor fuerte PGK. La presencia del promotor fuerte puede disminuir los niveles de transcripción generados a partir de *Ascl1* por lo que los animales *Ascl1<sup>flox/flox</sup>* pueden presentar fenotipos hipomorfos (Andersen *et al.*, 2014).

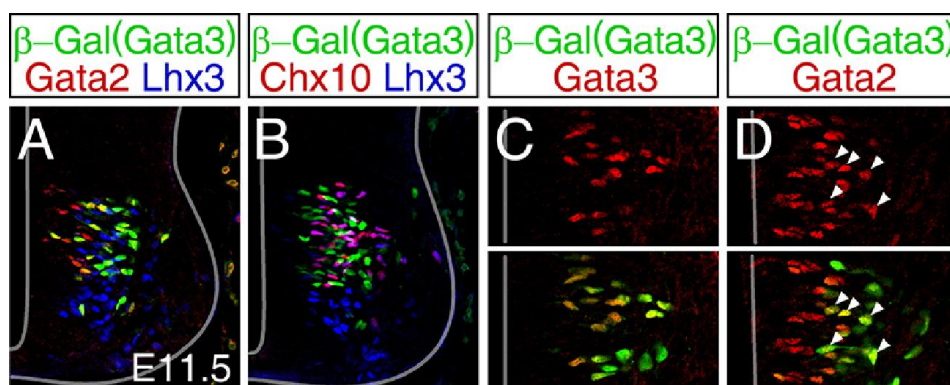
***Ascl1<sup>CreERT2</sup>*** (MGI ID: 4452601, Kim *et al.*, 2011). Línea utilizada para marcar de manera indeleble y controlada en el tiempo la progenie de las células *Ascl1<sup>+</sup>*, así como para generar mutantes condicionales. La región codificante de *Ascl1* fue reemplazada por la de la recombinasa Cre fusionada al dominio de unión a ligando del receptor de

estrógenos (segunda generación-CreERT2), de manera que solo ante la administración de tamoxifeno la recombinasa trasloca al núcleo y se efectúa la recombinación.

**Tg *Ascl1:GFP*** (MGI ID: 3845062, Gong *et al.*, 2003). Línea transgénica en la que el promotor de *Ascl1* dirige la expresión de GFP (*green fluorescent protein*). La mayor vida media de la proteína fluorescente permite realizar experimentos de seguimiento de linaje de corto alcance.

***Gata3<sup>LacZ</sup>*** (MGI ID: 2181200, van Doorninck *et al.*, 1999). Un *cassette* de expresión de  $\beta$ -Galactosidasa con señal de localización nuclear fue insertado inmediatamente río abajo del ATG de *Gata3*. El alelo resultante reporta la expresión de *Gata3*, y permite generar animales *Gata3* nulos. Línea letal en homocigosis (los embriones mueren en E10.5).

$\beta$ -Gal reporta la expresión de *Gata3*. Verificamos la expresión de  $\beta$ -Gal mediante inmunohistoquímica en la médula espinal E11.5.  $\beta$ -Gal coincide con *Gata3* (Figura 11C) y con *Gata2* (Figuras 11A,D, puntas de flecha) en las neuronas V2b. Las células *Gata2<sup>+</sup>, $\beta$ -Gal<sup>-</sup>*, son precursores p2 aún negativos para *Gata3*/ $\beta$ -Gal. La expresión de  $\beta$ -Gal está excluida de las neuronas V2a *Chx10<sup>+</sup>,Lhx3<sup>+</sup>* (Figuras 11A-B).



**Figura 11.  $\beta$ -Gal reproduce la expresión de *Gata3* en la línea *Gata3<sup>LacZ</sup>*.**

**A-D)** Inmunohistoquímicas sobre secciones transversales de médula espinal *Gata3<sup>LacZ</sup>* E11.5, contra  $\beta$ -Gal y *Gata2* (A,D), *Lhx3* (A-B), *Chx10* (B) y *Gata3* (C).  $\beta$ -Gal recapitula la expresión de *Gata3* (C) en el linaje de las V2b donde se expresa junto con *Gata2* (A,D, puntas de flecha). En D se observan células *Gata2<sup>+</sup>, $\beta$ -Gal<sup>-</sup>*. Las neuronas V2a, *Chx10<sup>+</sup>,Lhx3<sup>+</sup>* son negativas para  $\beta$ -Gal (A-B).

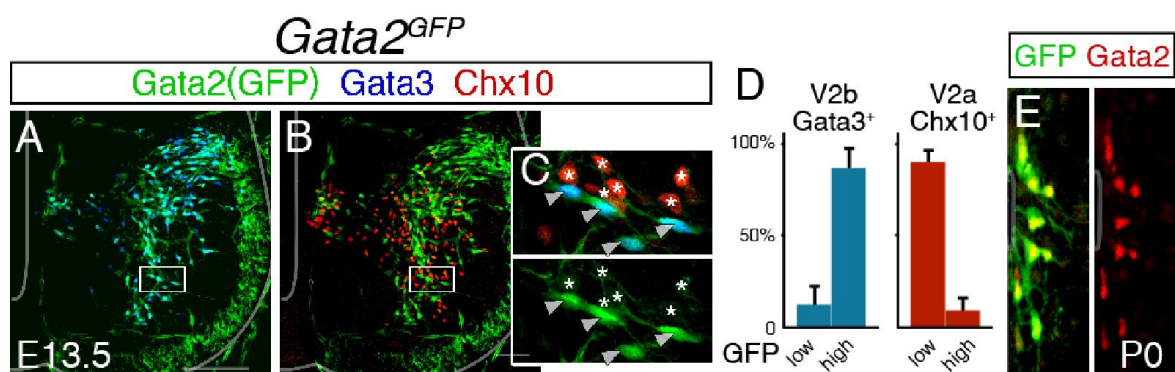
***Gata3<sup>Cre</sup>*** (MGI ID: 5619418, Zhang *et al.*, 2014). La región codificante de la recombinasa *Cre* se encuentra río abajo del ATG de *Gata3* permitiendo la marcación indeleble de la progenie de las células *Gata3<sup>+</sup>* y la generación de mutantes condicionales.

***Gata3<sup>flox</sup>*** (MGI ID: 3487291, Zhu *et al.*, 2004). El exón 4 de *Gata3* (que contiene el dominio de unión a DNA) se encuentra flanqueado por elementos loxp que permiten su

escisión de manera controlada en el tiempo y el espacio. La proteína resultante es truncada y no funcional.

***Gata2<sup>GFP</sup>*** (MGI ID: 2673268, Suzuki *et al.*, 2006). Línea *knock in* en la que se insertó la secuencia de GFP reemplazando el ATG de *Gata2*, de manera que la proteína fluorescente reporta la del factor de transcripción. La mutación en homocigosis es letal (los embriones mueren en E10).

La línea fue validada en la médula espinal ventral, donde *Gata2* se expresa en altos niveles en las neuronas V2b (*Gata3*<sup>+</sup>) pero no en las V2a (*Chx10*<sup>+</sup>). Mediante inmunohistoquímica en E13.5 se detectó expresión de GFP restringida a las neuronas V2b/*Gata3*<sup>+</sup> (Figuras 12A-D), pero solo niveles bajos o nulos en las neuronas V2a *Chx10*<sup>+</sup> (Figuras 12B-D). Los bajos niveles de GFP en las V2a se atribuyen a la expresión de *Gata2* inicialmente en progenitores comunes. En estadio postnatal (P0) la expresión de GFP coincide con la del factor de transcripción endógeno alrededor del canal central (Figura 12E).



**Figura 12. La línea *Gata2<sup>GFP</sup>* reporta fielmente la expresión de *Gata2*.**

**A-D)** Inmunohistoquímicas sobre secciones transversales de médula espinal *Gata2<sup>GFP</sup>* E13.5, contra GFP, *Gata3* y *Chx10* (A-C). Los canales están repartidos para facilitar la visualización. Los recuadros en A,B corresponden a la región mostrada en C. La expresión de GFP coincide con la de *Gata3* en las neuronas V2b (puntas de flecha en C), pero solo se observa expresión baja o indetectable en las neuronas *Chx10*<sup>+</sup> (V2a). Porcentaje de células expresando niveles altos (*high*) o bajos (*low*) de GFP (D). **E)** Tinción contra GFP y *Gata2* en secciones de médula espinal P0. En la zona del canal central (a la izquierda en las fotos), la expresión de GFP coincide completamente con la de *Gata2*.

***Gata2<sup>lox</sup>*** (MGI ID: 3628640, Charles *et al.*, 2006). El exón 5 de *Gata2* (que contiene el dominio de unión a DNA) se encuentra flanqueado por sitios loxp que permiten su escisión de manera controlada en el tiempo y el espacio. La proteína resultante no es funcional.

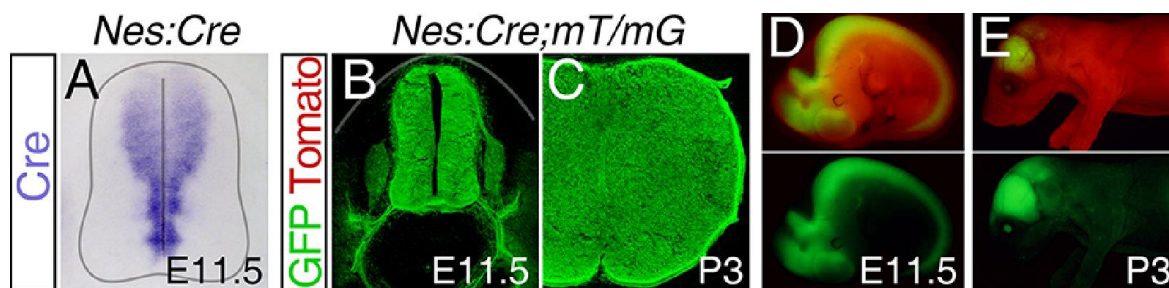
**Foxn4<sup>LacZ</sup>** (MGI ID: 3054789, Li *et al.*, 2004). Línea *knock in* en la que *LacZ* reemplaza gran parte de la región codificante. Línea letal en homocigosis en estadio postnatal.

**ROSA26:*floxSTOP-EYFP*** (MGI ID: 2449038, Srinivas *et al.*, 2001). Línea reportera que contiene la secuencia *EYFP* (*enhanced yellow fluorescent protein*) precedida por un *cassette* STOP (PGK-Neo) flanqueado por elementos *loxP* en el *locus* endógeno de expresión ubicua ROSA26. Solo ante la actividad de la recombinasa Cre se remueve el *cassette* STOP y se expresa la proteína fluorescente.

**Ai14 *td-Tomato* / CAG:*floxSTOP-tdTomato*** (MGI ID: 3809524, Madisen *et al.*, 2011). Línea reportera *knock in*, condicional a la actividad de Cre, que contiene la construcción TomatoAi en el *locus* ROSA26. Esta construcción incluye el promotor híbrido pCAG, un *cassette* STOP flanqueado por sitios *loxP* y la secuencia de la proteína fluorescente tdTomato.

**Tg CAG:CreER** (MGI ID: 2182767, Hayashi *et al.*, 2002). Línea transgénica en la que el promotor fuerte constitutivo CAG dirige la expresión ubicua de la recombinasa Cre asociada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos (primera generación), lo que permite la eliminación génica o marcación celular de manera controlada en el tiempo.

**Tg Nes:Cre** (MGI ID: 2176173, Tronche *et al.*, 1999). Línea transgénica que expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor de rata de *Nestina* y del *enhancer* específico de SN presente en el segundo intrón del gen. Permite la eliminación de genes de manera restringida al SNC.

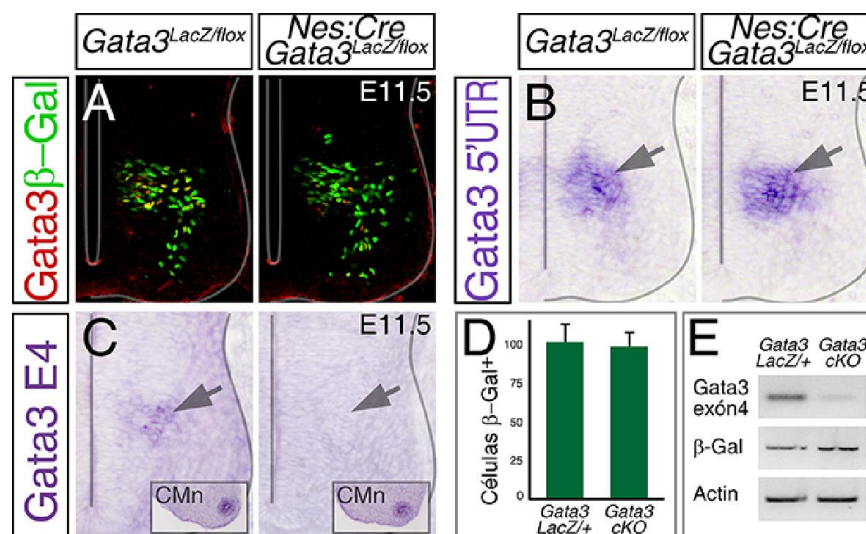


**Figura 13. La línea Nes:Cre dirige la expresión de Cre al SN.**

**A)** Hibridación *in situ* con sonda para la recombinasa Cre en secciones transversales de embriones *Nes:Cre* E11.5. La expresión de Cre recapitula la de la proteína Nestina expresada en la zona ventricular. **B-E)** Expresión de GFP en el SN E11.5 (B,D) y P3 (C,E) de animales *Nes:Cre;mT/mG*. El alelo *CAG:mTomato-floxSTOP-mGFP* (*mT/mG*) expresa de manera constitutiva la proteína Tomato asociada a membrana, pero ante la recombinación por Cre se escinde la región codificante para Tomato y la secuencia STOP adyacente, de manera de activar la transcripción de mGFP. En B-C (secciones transversales) se observa que GFP, dependiente de *Nes*, se expresa en la totalidad del SN y está ausente en tejidos no-neurales donde aún se expresa Tomato (D-E, embriones enteros).

Confirmamos la utilidad de la herramienta mediante hibridación *in situ* en la médula espinal E11.5, detectando al mRNA de Cre en la zona ventricular (Figura 13A). Adicionalmente, usando animales reporteros GFP (*Nes:Cre;mT/mG*), verificamos que tanto en E11.5 como a P3 se observa expresión de GFP en la totalidad del SN (Figuras 13B-E), pero está excluido de tejidos no-neurales (Figuras 13D-E). Eso indica que la línea transgénica *Nes:Cre* dirige eficientemente la expresión de la recombinasa al SN.

La línea *Nes:Cre* se utilizó para generar animales mutantes nulos *Gata3* condicionales al SN (*cKO*, *Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*). Como control, se analizaron embriones *Gata3 cKO* E11.5. Las células  $\beta$ -Gal<sup>+</sup> presentan niveles muy bajos de *Gata3*, resultado de la proteína trunca producida (Figura 14A). Mediante hibridación *in situ* y RT-PCR verificamos la recombinación efectiva del alelo *Gata3<sup>flox</sup>*. Una sonda contra el exón 4 (removido) no reveló marca, mientras que se detectó transcripción del 5'UTR del mRNA tanto en heterocigotas, como en *cKO* (Figuras 14B,C,E, flechas). Tejido no-neural como los conductos mesonéfricos (CMn), mantuvieron la expresión de *Gata3* normal (Figura 14C, recuadro). Esos controles validan que los animales *Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>* carecen de expresión de *Gata3* funcional exclusivamente en el SN.



**Figura 14. Los animales *Gata3 cKO* no producen *Gata3* funcional en el SN.**

**A,D)** Tinciones contra *Gata3* y  $\beta$ -Gal en embriones E11.5 *Gata3<sup>LacZ/flox</sup>* y *Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>* (*Gata3 cKO*). La expresión de  $\beta$ -Gal persiste en los animales *cKO*, reportando las células que expresan *Gata3* (cuantificado en D). La señal de la proteína endógena se ve reducida en los animales *cKO*.

**B-C)** Hibridaciones *in situ* con sondas que detectan el 5' UTR (B) o el exón 4 (C) del mRNA de *Gata3*. En los animales *Gata3 het* y *Gata3 cKO* se evidencia la transcripción del 5' UTR (B, flechas). Sin embargo, en el tubo neural del *Gata3 cKO* no se observa transcripción del exón 4 (C, flechas). En los conductos mesonéfricos (CMn, recuadros en C), fuera del SN, se detecta el mRNA completo.

**E)** Retrotranscripción seguida de PCR para detectar la transcripción del exón 4 de *Gata3* en tejido nervioso de animales *Gata3 het* y *Gata3 cKO*. No detectada en animales *Gata3 cKO*. Se incluyen PCR para  $\beta$ -Gal y actina a modo de control. Barras media+DE.

A excepción de las líneas reporteras *ROSA26:loxSTOP-EYFP* o *CAG:loxSTOP-tdTomato* y de las líneas condicionales *lox* (*Ascl1<sup>lox</sup>*, *Gata3<sup>lox</sup>*, *Gata2<sup>lox</sup>*), las líneas de ratones modificados fueron mantenidos en heterocigosis.

## GENOTIPIFICACIÓN DE ANIMALES

### Extracción de DNA genómico

Para la determinación del genotipo de los animales se extrajo DNA genómico de una biopsia de la cola (aproximadamente 2mm). En el caso de los embriones, la misma fue disectada bajo lupa estereoscópica. El tejido fue incubado en 100µl de solución de lisis (100mM Tris-HCl pH 8,5; SDS 0,2%; EDTA 5mM; NaCl 200mM y Proteinasa K 20µg/ml, Invitrogen 25530) a 55°C en agitación hasta lograr su completa degradación. Para precipitar el DNA se agregó 100µl de isopropanol y se centrifugó a máxima velocidad por 5min. Se lavó con 500µl de alcohol etílico 70% y se resuspendió en 100-200µl de agua desionizada con agitación a 55°.

### Reacción de PCR

El genotipo de los animales y los embriones se determinó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Se realizaron reacciones de 25µl (*Buffer* Taq 1x; dNTPs 150µM; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; oligonucleótidos 0,4µM; Taq 0,1%; ~100ng DNA) siguiendo un protocolo de 30 ciclos (94°C 30seg, 60°C 30seg, 72°C 1min) con una desnaturalización inicial de 94°C 3min y una elongación final de 72°C 5min (Termociclador Veriti, Applied Biosystems). La temperatura de *annealing* varió entre 60-65°C según la reacción. En algunos casos, se agregó DMSO 2,5% para obtener mejores resultados. En todos los casos se incluyó controles positivos, negativos y blancos. El producto de reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Los embriones que portaron proteínas fluorescentes o β-Galactosidasa fueron identificados mediante la observación de la fluorescencia en el patrón esperado bajo lupa estereoscópica (Olympus Macroview MVX10) o mediante la detección de la actividad enzimática, respectivamente (ver más adelante).

PCR	Oligonucleótidos	Condiciones
Neomicina (Ascl1 <sup>Neo</sup> )	GCATACGCTTGATCCGGCTACC AAGCGATGCGCTGC GAATC	60°C
Cre (Gata3 <sup>Cre</sup> , Ascl1 <sup>CreERT2</sup> , tgNestin:Cre, tgCAG:CreER)	TAATCGCCATCTTCCAGCAG GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	60°C
GFP (Gata2 <sup>GFP</sup> , R26 <sup>eYFP</sup> , tgAscl1:GFP)	GACGTAAACGGCCACAAGTT GAACTCCAGCAGGACCATGT	60°C
Tomato (Ai14)	ACGGCATGGACGAGCTGTAC CAGGCGAGCAGCCAAGGCAA	60°C
LacZ (Gata3 <sup>LacZ</sup> , Foxn4 <sup>LacZ</sup> )	TTGGCGTAAGTGAAGCGAC AGCGGCTGATGTTGAACTG	60°C
Ascl1 <sup>fllox</sup>	CTACTGTCCAAACGCAAAGTGG GCTCCACAATCCTCGTAAAGA TAGACGTTGTGGCTGTTGTAGT	60°C
Gata3 <sup>fllox</sup>	CAGTCTCTGGTATTGATCTGCTTCTT GTGCAGCAGAGCAGGAACTCTCA	60°C
Gata2 <sup>fllox</sup>	GCCTGCGTCCTCCAACACCTCTAA TCCGTGGGACCTGTTTCCTTAC	60°C
Ascl1 <sup>KINGn2</sup>	ACAGTTTGGCCCGGCATGGA AGATGTAATTGTGGGCGAAG	60°C
Ascl1 <i>wild type</i>	CTCCGGGAGCATGTCCCCAA CCAGGACTCAATACGCAGGG	60°C
Gata3 <i>wild type</i>	CATGGAAGCTCAGTATCCGC GAAGCTGGAAGTCCTTCGGG	60°C
Foxn4 <i>wild type</i>	GGCCTCTCTGTCCATACCTGTA CTACTCTCTTTGATGACAGCTCCC	60°C
Locus ROSA26	Rosa10: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT Rosa11: CGAGGCGGATCACAAGCAATA SA: GCGAAGAGTTTGTCTCAACC	65°C, DMSO 2,5%

**Tabla 1.** Oligonucleótidos específicos utilizados en la genotipificación de las correspondientes líneas de ratones.

## TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

### Marcación con BrdU

El análogo sintético de timidina 5-Bromo-2'deoxyUridina (BrdU, Sigma Aldrich B5002) se incorpora al DNA durante la fase S del ciclo celular, permitiendo la identificación de las células (o su progenie) que se encuentran en división al momento de la administración. Se aplicó BrdU intraperitonealmente (i.p., 50mg/kg, Miller *et al.*, 1988) a hembras preñadas en una única o múltiples dosis según lo indicado en cada caso. Posteriormente se colectó y analizó el SN de su descendencia.

### Inducción de la actividad recombinasa

La enzima Cre es capaz de recombinar fragmentos de DNA entre sitios definidos por las secuencias palindrómicas loxP. La variante CreER consiste en la recombinasa asociada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos, lo que permite un control

temporal de la actividad (Joyner *et al.*, 2006). En ausencia de ligando la recombinasa está excluida del núcleo. Ante la administración del estrógeno tamoxifeno (Tam, Sigma Aldrich T5648) la recombinasa Cre trasloca al núcleo y recombina al DNA blanco. El tamoxifeno se preparó en aceite de maíz (Sigma Aldrich, C8267) 20mg/ml y se inyectó i.p. entre 2-6mg por hembra preñada en los estadios especificados, en una dosis única o en múltiples dosis, según el experimento.

### **Rescate farmacológico de los mutantes nulos *Gata3***

La delección de *Gata3* es letal en estadios embrionarios tempranos (E10.5-E11, Pandolfi *et al.*, 1995). Sin embargo, esa letalidad puede ser rescatada con la administración de agonistas adrenérgicos (Kaufman *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2000). Con el objetivo de obtener animales nulos para *Gata3* en estadios perinatales, a partir del día 7.5 de preñez, las hembras *Gata3<sup>LacZ/+</sup>* que copularon con machos *Gata3<sup>LacZ/+</sup>* recibieron a diario agua fresca conteniendo isoprotenerol (100µg/ml, Sigma Aldrich I5627), fenilefrina (100µg/ml, Sigma Aldrich P6126) y ácido ascórbico (2mg/ml, Sigma Aldrich A0278).

## **PREPARACIÓN DE TEJIDO ESPINAL**

### **Disección, criopreservación y seccionamiento de tejido espinal**

Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical en los estadios de preñez indicados. El útero fue retirado y los embriones extraídos en una solución *buffer* PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM; pH 7,4) bajo lupa estereoscópica (Olympus SZ61 y Zeiss Stemi2000). Los embriones fueron decapitados, inmovilizados con alfileres de 100-200µm en placas de Sylgard® (Dow Corning 4019862) con PBS y eviscerados con pinzas afiladas (Dumont #5, FST). Los cordones espinales de los embriones en estadios >E16.5 o postnatales (P0-P3) fueron aislados abriendo la columna vertebral desde el lado ventral utilizando tijeras de disección (Spring Scissors, angled, FST).

Los embriones o cordones espinales aislados se fijaron por una hora en paraformaldehído 4% en PBS (PFA, pH 7,4, Sigma Aldrich P6148) a temperatura ambiente (T.A.). Luego, se lavó el tejido tres veces con PBS por 10-20 min. Finalmente

se lo equilibró durante la noche en una solución de sacarosa 20% en PBS a 4°C para ser criopreservado.

Se embebieron los tejidos o embriones en medio de montaje para criostato (Cryoplast, Biopack 120405) en un molde de papel aluminio que se congeló progresivamente utilizando etanol (96%) enfriado con hielo seco. En cada uno de los bloques se incluyeron los tejidos de animales de la misma camada de modo que las condiciones experimentales fuesen idénticas entre los distintos individuos/genotipos a comparar. Se almacenó los bloques congelados a -80°C.

Se cortó el tejido en secciones transversales de 30µm de espesor utilizando un criostato (modelo CM 1850, Leica Biosystems) y se lo colectó directamente sobre portaobjetos de vidrio (Superfrost Plus, VWR o Fisher). Los vidrios fueron secados durante 15min en estufa a 37°C y guardados a 4°C o -20°C hasta su utilización.

## **INMUNOFLUORESCENCIA**

### **Protocolo general**

Se delimitó la superficie a utilizar del vidrio con las secciones con un marcador hidrofóbico (SuperPap-Pen). Se realizaron tres lavados de 5min con PBS Tween-20 0,1% (PBS-Tw) a T.A. y se incubaron las secciones con solución de bloqueo (suero normal de cabra o burro inactivado 5%, Natocor; Tritón X-100 0,1% en PBS) por al menos una hora a T.A. Finalmente se incubaron las secciones durante la noche en cámara húmeda a 4°C con la dilución correspondiente de anticuerpos primarios en solución de bloqueo (Tabla 2).

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS-Tw de 15min a T.A. y se incubaron las secciones en cámara húmeda durante al menos dos horas a T.A. o durante la noche a 4°C, con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos o a biotina (Tabla 3) en solución de bloqueo (dilución 1:250). En aquellos casos donde se utilizaron anticuerpos biotinilados se realizaron tres lavados adicionales (PBS-Tw 15min a T.A.) y se incubaron las secciones por 45 minutos a T.A. con estreptoavidina acoplada a fluoróforo (Tabla 3) en solución de bloqueo (dilución 1:250). Posteriormente, se tiñeron los núcleos celulares utilizando una solución del colorante nuclear bis-benzimida Hoescht 33342 (Invitrogen

H1399, 1µg/ml) en PBS-Tw por 5min a T.A. y se realizaron tres lavados finales (PBS-Tw 15min a T.A.).

Antígeno	Especie	Fuente	Factor de Dilución
Ascl1	Ratón	BD Pharmigen 556604	500
Ascl1	Conejo	Babco	200
Gata2	Cobayo	Kamal Sharma, <i>University Chicago, IL, USA (Peng et al., 2007)</i> .	2000
Chx10	Cobayo	S. Pfaff (Thaler <i>et al.</i> , 1999).	500
Gata3	Ratón	Santa Cruz sc-268	100
Lhx3	Ratón	DSHB	15
Hb9	Conejo	S. Pfaff (Thaler <i>et al.</i> , 1999).	1000
Isl1/2	Ratón	DSHB 40.2D6	10
Pax3	Rata	Martyn Goulding, <i>The Salk Institute, La Jolla, CA, USA (Gross et al., 2000)</i> .	400
Pkd211	Conejo	Charles Zuker, <i>UCSD, San Diego, CA, USA (Huang et al., 2006)</i> .	23000
βIII-tubulina(Tuj1)	Ratón	Covance MMS-435P	500
Nkx6-1	Ratón	DSHB F55A10	15
Nkx2-2	Ratón	DSHB 74.5A5	25
Olig2	Conejo	Masato Nakafuku, <i>Cincinnati Children's Hospital, OH, USA (Takebayashi et al., 2000)</i> .	1000
Foxa2	Ratón	Abcam	200
Sox2	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	300
Sox9	Cabra	RD Systems	100
NeuN	Ratón	Chemicon International, Inc.	500
Nfia	Conejo	Active Motif	1000
Vimentina	Pollo	Chemicon International, Inc. AB5733	1000
S100 β	Ratón	Sigma S2532	500
BrdU	Rata	ImmunoDirect MCA2060T	250
GFP	Pollo	Aves GFP-1020	500
GFP	Conejo	Molecular Probes A11122	1000
Ds-Red (Tomato)	Conejo	Clontech	300
β-Galactosidasa	Conejo	Cappel	1000
β-Galactosidasa	Rata	Martyn Goulding (Lanuzza <i>et al.</i> , 2004).	1000

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios usados.

Se optó por una de dos opciones de montaje: polivinilalcohol (PVA) con el preservante de la fluorescencia Dabco (2,5%, Sigma Aldrich D2522); o deshidratación en una serie de soluciones de concentración creciente de etanol (25%, 50%, 66%, 96%, 100%; 4min en cada una) y dos de xileno 100%, seguido del montaje con DPX (Sigma Aldrich 06522). En ambos casos se dejó secar las secciones durante la noche a T.A. protegidas de la luz.

Cuando se utilizaron anticuerpos primarios generados en ratón, se bloqueó adicionalmente con el fragmento monovalente (Fab) de anticuerpo de burro anti-ratón (15µg/ml en solución de bloqueo, Jackson ImmunoResearch 715007003) para disminuir la señal basal. Luego se realizaron tres lavados con PBS-Tw de 15min a T.A. y se continuó con el protocolo.

Anticuerpo secundario/Estreptoavidina	Fuente
Anti-ratón acoplado a Cy2 / Cy3 / Cy5	Jackson ImmunoResearch (715225151, 715165151, 715175151)
Anti-conejo acoplado a Alexa 488	Life Technologies (A21206)
Anti-conejo acoplado a Cy2 / Cy3 / Cy5	Jackson ImmunoResearch (711225152, 711165152, 711175152)
Anti-rata acoplado a Cy2 / Cy3 / Cy5	Jackson ImmunoResearch (712225153, 712165153, 712175153)
Anti-cobayo acoplado a Cy2 / Cy3 / Cy5	Jackson ImmunoResearch (706225148, 706165148, 706175148)
Anti-Cabra biotinilado	Jackson ImmunoResearch (705065147)
Anti-Pollo biotinilado	Jackson ImmunoResearch (703065155)
Estreptoavidina acoplada a Cy2 / Cy3	Jackson ImmunoResearch (016220084, 016160084, 016170084)
Estreptoavidina acoplada a DyeLight 649	Jackson ImmunoResearch (016490084)

**Tabla 3.** Anticuerpos secundarios usados.

### Recuperación antigénica de BrdU por tratamiento ácido

Para la detección de BrdU mediante inmunohistoquímica, el nucleótido modificado debe estar accesible, por lo que se aplicó un tratamiento de exposición de epítopes con ácido (Gratzner, 1982; Miller *et al.*, 1988). Después de la incubación con los anticuerpos secundarios de la primera reacción, se realizaron tres lavados de 10min con PBS-Tw a T.A. y se fijó con PFA 4% en PBS por 5min. Luego se incubó con HCl 2N en PBS 20min. Se neutralizó con *buffer* borato (100mM, pH 8) 20min, seguido de tres lavados con PBS-Tw. Posteriormente se prosiguió con la inmunohistoquímica contra BrdU.

## HIBRIDACIÓN *IN SITU*

### Preparación de las sondas. Transcripción *in vitro*

Para la generación de transcritos anti-sentido se utilizaron plásmidos linealizados con la secuencia de interés o fragmentos obtenidos por PCR. Las sondas usadas fueron: Gata2 (Carcagno *et al.*, 2014), Pkd112 (Petracca *et al.*, 2016), Ascl1 (Kriks *et al.*, 2005), Cre, Gata3 5' UTR (Tong *et al.*, 2000), Gata3 exón 4 (generado en el laboratorio).

La transcripción se llevó a cabo en un volumen de 10µl de una mezcla conteniendo: DNA molde (~1µg), ribonucleótidos (1mM cada uno) incluyendo dig-rUTP (350µM, Roche 11209256910), inhibidor de RNAasas (RNAse-out, Invitrogen 100000840), DTT (10mM), *buffer* de transcripción (1X, Promega P118B) y RNA polimerasa T7, T3 o SP6 según corresponda (1 UE, Roche 10881775001, Promega P208C, P108B). Se incubó por 2hs a 37°C y luego se agregó 2µl de DNAsal (RQ Promega M610A) por 10min. Se precipitó el

RNA agregando 100µl de agua DEPC (3,5mM Sigma D5758), 2µl de LiCl 5M y 300µl de etanol 100%. Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 10µl de agua DEPC. Se controló la síntesis en gel de agarosa 1%. Las sondas se conservaron a -70°C.

## Protocolo general

**Pretratamiento.** Se secaron las secciones en estufa a 55°C por 15min. Se realizaron tres lavados de 3min con PBS-DEPC (0,05%), se fijó con PFA 4% por 10min y se lavó nuevamente. Luego, se incubó con proteinasa K (3µg/ml en PBS-DEPC) 3min, se fijó con PFA 4% 5min y se lavó. Se realizó una acetilación con trietanolamina-HCl 1,5%, pH8 y anhídrido acético 0,25% por 10min para disminuir el fondo. Se permeabilizó el tejido con Tritón X-100 1% en PBS-DEPC por 30min y se lavó nuevamente.

**Hibridación.** Se pre-incubaron las secciones 2hs con solución de hibridación (formamida desionizada 50%, SSC 5x, Denharts 5x (Ficoll-400 1%, polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%) y 0,25mg/ml tRNA de levadura (Invitrogen 15401-029)). Las sondas marcadas con digoxigenina (dig) se diluyeron en solución de hibridación a una concentración aproximada de 0.5-1µg/ml, se calentaron a 80°C 5min seguido de enfriamiento en hielo 5min. Se agregó a cada portaobjeto 150µl de la solución de hibridación con la sonda y se cubrió con cubreobjetos para su posterior incubación en cámara húmeda (formamida 50%) en estufa a 70°C durante la noche.

**Lavados y detección.** Se retiró el cubreobjetos y se realizaron tres lavados de 45min a 70°C con SSC 1x y formamida 50%. Posteriormente se lavó con B1-T (100mM Tris pH=7,5, NaCl 0,15M, Tween-20 0,1%) por 5min a T.A. y se incubó con solución de bloqueo (suero de cabra normal 10%, en solución B1-T) por 1h. Se incubó con anticuerpo anti-dig acoplado a fosfatasa alcalina (1:2000, Roche 11093274910) en solución de bloqueo a 4°C durante la noche. Se realizaron 3 lavados de 10min con B1-T a T.A. y uno de 5min con solución B3 (100mM Tris pH=9,5, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Tween-20 0,1%, tetramisol 50ng/ml (Sigma Aldrich, I9756)). La actividad de la fosfatasa alcalina se reveló con NBT 150µg/ml y BCIP 166µg/ml (Roche, 11585002001 y 11087479001) en B3. La reacción de revelado se detuvo con agua y se montó con PBS: glicerol 1:1.

## DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASA

Las criosecciones o fragmentos de tejido obtenidos de biopsias fueron lavados con PBS-Tw por 5min a T.A. y luego se les agregó *buffer* de reacción (X-Gal 1mg/ml (Invitrogen B1690),  $MgCl_2$  2mM, Tritón X-100 0.2%,  $K_4Fe(CN)_6$  5mM y  $K_3Fe(CN)_6$  5mM). Se reveló en oscuridad a T.A. y se detuvo la reacción lavando con PBS-Tw. En el caso de las criosecciones, se fijaron con PFA 4% y se montaron con glicerol: PBS 1:1.

## MICROSCOPIA

Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas con los microscopios Zeiss LSM5 Pascal y Zeiss LSM 510 Meta. Las fotos de hibridaciones *in situ* y de ensayos de detección de actividad de  $\beta$ -Galactosidasa (microscopía óptica de transmisión), se tomaron con microscopios Olympus Bx60 o Zeiss Axioplan acoplados a cámaras CCD. Esos microscopios también fueron utilizados para la toma de imágenes de epifluorescencia convencional. Se montaron las imágenes utilizando los programas Adobe Photoshop y Adobe Illustrator.

## ELECTROFISIOLOGÍA: REGISTRO EN REBANADAS AGUDAS

Se aisló el tejido y se tomaron los registros electrofisiológicos de acuerdo a lo descrito previamente (Zhang *et al.*, 2008). Embriones E18.5-E19.5 conteniendo el alelo *CAG:floxSTOP-tdTomato* fueron decapitados y su cordón espinal aislado en solución Ringer de bajo calcio de la siguiente composición (en mM): NaCl 128; KCl 4,69;  $NaHCO_3$  25;  $KH_2PO_4$  1,18;  $MgSO_4$  3,25;  $CaCl_2$  0,25;  $MgCl_2$  1,3 y glucosa 22; saturado con  $CO_2$  5%/O<sub>2</sub> 95%. Se aisló la región del cordón espinal correspondiente a la porción torácica inferior y lumbar superior y se realizaron cortes coronales de 400 $\mu$ m utilizando un vibrátomo Leica VY1000E. Las rebanadas fueron transferidas a una cámara conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial (en mM: NaCl 125; KCl 2,5;  $NaH_2PO_4$  2;  $NaHCO_3$  25;  $CaCl_2$  2;  $MgCl_2$  1,3; Na-ascorbato 1,3; Na-piruvato 3,1 y dextrosa 10, 315mOsm) donde fueron burbujeadas con  $CO_2$  5%/O<sub>2</sub> 95% a 30°C por 1h antes de iniciar los experimentos. Luego de la recuperación, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro

montada en un microscopio Olympus BX61WI con un objetivo 60x de inmersión de agua (A.N. 1.0) a T.A.

Las células Tomato<sup>+</sup> que rodean el canal central fueron identificadas por fluorescencia y videomicroscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) infrarroja utilizando una cámara EM-CCD (Hamamatsu). Se llevaron a cabo registros de *whole-cell* utilizando microelectrodos (4-5M $\Omega$ ) con una solución interna de composición (mM): K-gluconato 150; MgCl<sub>2</sub> 4; EGTA 0,1; NaCl 1; HEPES 10; ATP-tris 4; GTP-tris ,3 y fosfocreatina 10. Se incluyó el colorante Alexa flúor 488 (Invitrogen A10436) en la solución de la pipeta para identificar inequívocamente las células Tomato<sup>+</sup> registradas. Se obtuvieron los datos utilizando amplificadores Axopatch 200B, digitalizados y adquiridos a 20KHz en una computadora personal utilizando el programa pClamp10. La resistencia de membrana se obtuvo de trazos evocados por un estímulo hiperpolarizante de 10mV. Las corrientes voltaje-dependientes se registraron aplicando un pulso cuadrado de 1mV desde un potencial de reposo de la célula de -60mV. Las corrientes presentadas son las corrientes registradas menos las corrientes de fuga (sustracción P/N, pClamp). Para observar potenciales de acción se aplicaron escalones de corriente (en incrementos de 10pA; 500ms) bajo configuración *current clamp*, partiendo de un potencial de reposo de -60mV. En todos los casos se garantizó la despolarización de las células por encima de los -50mV. En todas las rodajas se registró, además de las células marcadas, una neurona control, no marcada, para garantizar la calidad de la rodaja.

Para identificar la existencia de *gap junctions* entre células ependimarias se evaluó el acople de las células Tomato<sup>+</sup> con células vecinas no marcadas. Para ello se cargó las pipetas con el colorante LuciferYellow-CH (0,1% de la sal de Li, Molecular Probes L453) que, debido a su tamaño y carga iónica, es capaz de atravesar las *gap junctions* por difusión inmediatamente después de haber sido inyectado en la célula (Rela *et al.*, 2010). Bajo el microscopio se evaluó la presencia de células LuciferYellow<sup>+</sup>Tomato<sup>-</sup> aledañas a la célula doble positiva registrada.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los conteos de células fueron realizados en al menos 10 secciones transversales de cómo mínimo tres individuos de la edad y el genotipo correspondiente. En todos aquellos experimentos que involucraron cepas de mutantes, los animales *wild type* de la misma camada fueron utilizados como controles. Los resultados se muestran como la

media $\pm$ desvío estándar (DE) a menos que se indique lo contrario. Los datos se analizaron usando el programa GraphPad Prism. Se examinó la significancia de los datos utilizando las pruebas no-paramétricas Mann-Whitney U o ANOVA de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. Para comparar distribuciones de células entre dos condiciones (tablas de contingencia) se utilizó la prueba exacta de Fisher no paramétrico. Se consideraron significativas las variaciones que arrojaran una significación asintótica (bilateral) menor a 0,05 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

# RESULTADOS

En esta sección se discute la participación de los factores de transcripción *Ascl1*, *Gata3* y *Gata2* en el proceso de diferenciación de las CSF-cN. Para organizar los resultados, se dividió esta sección en tres partes. La primer parte comprende las evidencias que sugieren que esos factores de transcripción se expresan en el linaje de las CSF-cN desde estadios tempranos, mientras que la segunda y tercera parte analizan el rol funcional de *Ascl1* y los factores *Gata* en la especificación de las CSF-cN.

## I- EXPRESIÓN DE ASCL1 Y GATA3 EN LA NEUROGÉNESIS ESPINAL AVANZADA

### Ascl1 en la médula espinal embrionaria

Como fue presentado en la Introducción, hemos identificado recientemente que, en estadios avanzados del desarrollo embrionario, existen eventos neurogénicos en la médula espinal ventral que producen las CSF-cN. Las neuronas del canal central se generan durante el período en el cual progenitores neurales se encuentran masivamente comprometidos en la producción de astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos. Además, nuestros resultados mapearon con precisión el origen de las CSF-cN en dos regiones restringidas del neuroepitelio espinal ventral.

Los progenitores de las CSF-cN proliferan entre los estadios E13 y E14 y las neuronas del canal central, identificadas por la expresión del canal iónico Pkd2l1 y el factor de transcripción Gata2, comienzan a aparecer en la médula espinal en E14.5. Demostramos que existen dos fuentes de CSF-cN: (1) el dominio tardío p2 y la mitad dorsal del dominio oligodendrogénico (pOL) que generan el subgrupo denominado CSF-cN', y (2) la frontera entre el dominio p3 tardío y la placa del piso que origina a las CSF-cN'' (Petracca *et al.*, 2016).

El llamativo retraso en el nacimiento de las CSF-cN sugiere que deben existir mecanismos dedicados que posibiliten su especificación tardía, que, por un lado, induzcan la diferenciación neuronal y simultáneamente prevengan la diferenciación de astrocitos y células ependimarias. Típicamente, las proteínas proneurales con dominios bHLH han demostrado ejercer esas acciones en otras regiones del SN en desarrollo. Esas proteínas usualmente se expresan en progenitores neurales, donde regulan la diferenciación y la adquisición de identidades neuronales específicas (Bertrand *et al.*, 2002; Guillemot, 2007; Rowitch, 2004; Rowitch *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que las proteínas proneurales inhiben la diferenciación astrocítica mediante el secuestro de complejos transcripcionales gliogénicos y la inhibición de la vía Jak/Stat, relevante para la inducción glial (Guillemot, 2007; Imayoshi *et al.*, 2014).

En la médula espinal ventral en desarrollo se ha identificado la expresión de varias proteínas proneurales que contienen dominio bHLH, incluyendo Neurog1-3, Olig1-3 y

Ascl1. Los factores de transcripción Olig1 y Olig2 son exclusivos del dominio que genera motoneuronas y oligodendrocitos (Mizuguchi *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002), mientras que Neurog3 se restringe al dominio p3 (Carcagno *et al.*, 2014). Las proteínas Neurog1 y 2 abarcan regiones progenitoras más extensas, incluyendo los dominios p0, p1 y pMN, entre otros (Mizuguchi *et al.*, 2001; Scardigli *et al.*, 2001), mientras que Olig3 presenta un patrón de bandas en los dominios p0, p2 y p3 (Takebayashi *et al.*, 2002). Ascl1 se expresa con alta densidad en progenitores en la zona ventricular dorsal (Helms *et al.*, 2005; Kriks *et al.*, 2005; Mizuguchi *et al.*, 2006) y, ventralmente, en células pertenecientes al dominio p2 y en algunas células inmersas en los dominios tardíos pOL y p3 (Guillemot *et al.*, 1993a; Lo *et al.*, 1991; Parras *et al.*, 2002; Sugimori *et al.*, 2007).

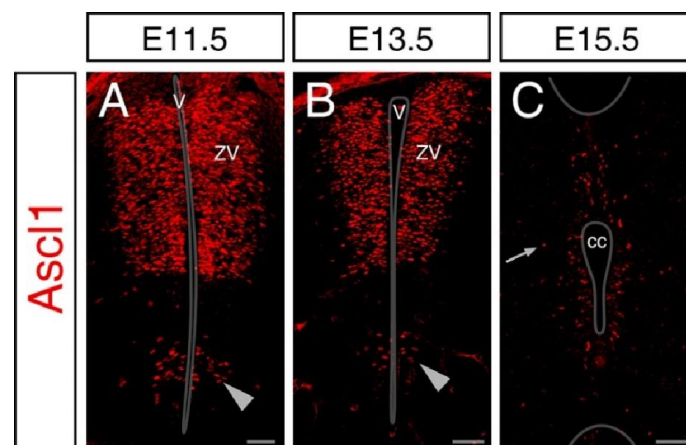
De todos los factores de transcripción con bHLH analizados más arriba, Ascl1 presenta el patrón más consistente con las regiones de origen de las CSF-cN. Decidimos entonces evaluar en mayor detalle si existe una correlación entre la expresión de Ascl1 y la generación de las CSF-cN.

En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de Ascl1 en los estadios neurogénicos y gliogénicos de la médula espinal embrionaria. El patrón de expresión, determinado mediante inmunohistoquímica, resultó similar a la distribución del mRNA obtenida por hibridación *in situ* (no mostrado), lo cual sugiere que Ascl1 se regula principalmente a nivel transcripcional.

En E11.5, durante la fase neurogénica (Figura 15A), Ascl1 está presente en células en la región adyacente a la cavidad ventricular (zona ventricular), que alberga los progenitores neurales. Su ausencia en la región del manto refleja que Ascl1 se regula negativamente durante la conversión postmitótica en neuronas. Ascl1 presenta un patrón definido a lo largo del eje dorso-ventral. En la zona ventricular dorsal, Ascl1 se expresa con alta densidad y se encuentra implicado en la especificación de las interneuronas dorsales dl3, dl5 y dILA/B (Helms *et al.*, 2005; Kriks *et al.*, 2005; Mizuguchi *et al.*, 2006; Pattyn *et al.*, 2006; Wildner *et al.*, 2006). En la mitad ventral del tubo neural caudal, la expresión de Ascl1 es menos uniforme y se encuentra acotada fundamentalmente al dominio p2. Se ha especulado que en ese dominio, Ascl1 está asociado a la especificación de las interneuronas V2, sin que exista consenso completo en la literatura respecto de su función (Del Barrio *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Parras *et al.*, 2002). La expresión heterogénea de Ascl1 en las células p2 (patrón de expresión salpicado o *salt and pepper*) refleja su regulación por la vía de Notch (Peng *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006) y/o por

mecanismos oscilatorios, como los reportados en el telencéfalo ventral (Imayoshi *et al.*, 2013).

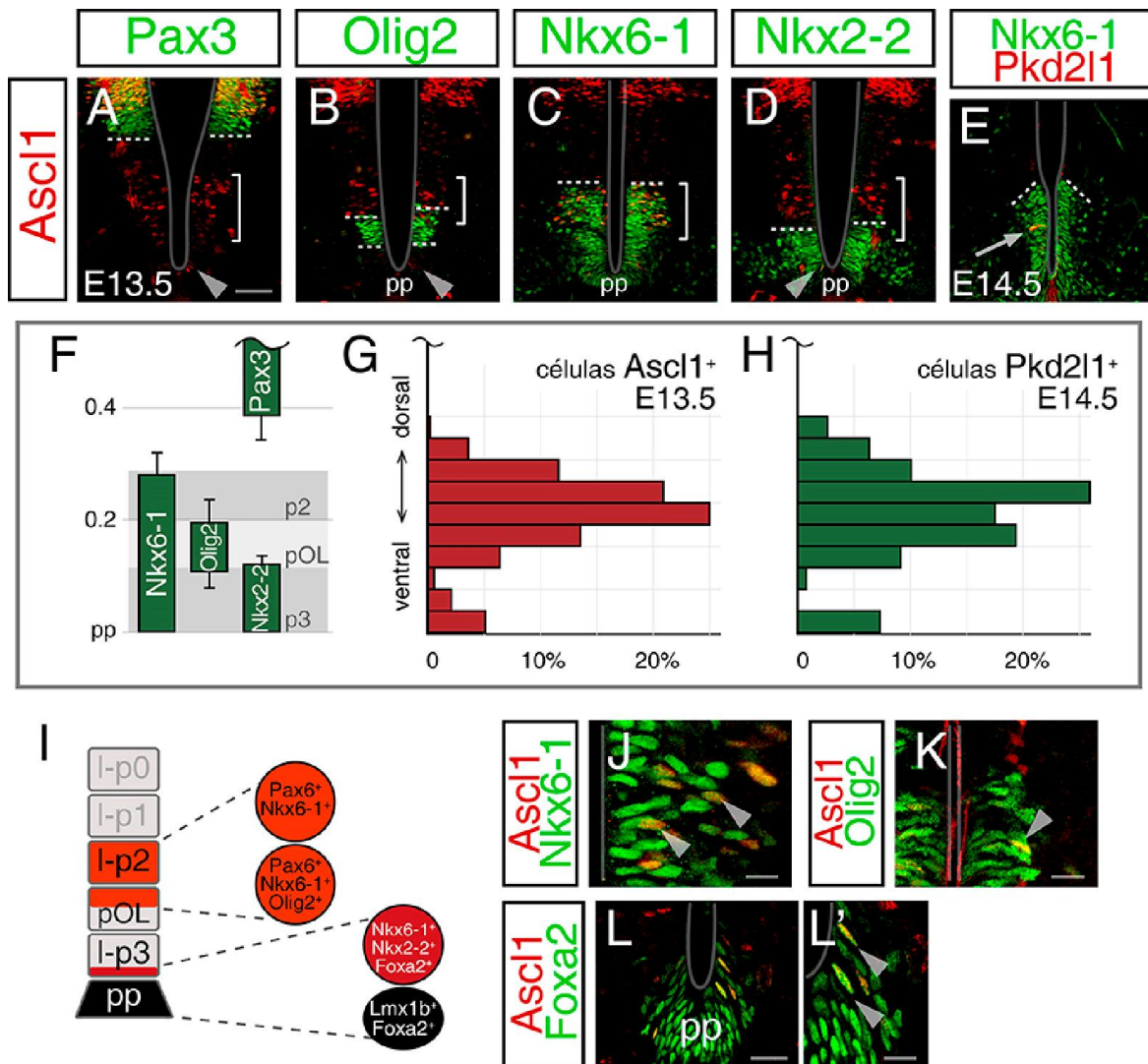
En E13.5, estadio en el cual los progenitores de las CSF-cN se encuentran en proliferación y el neuroepitelio se compromete con destinos gliales, el patrón de expresión de *Ascl1* presenta similitud con el encontrado en estadios previos (Figura 15B). Tanto a nivel dorsal como ventral, hay una disminución en el tamaño de la zona ventricular resultado de la reducción del número de progenitores durante la fase neurogénica. Adicionalmente, observamos que la expresión de *Ascl1* es más heterogénea, presentando distintos niveles de proteína (Figura 15B).



**Figura 15. *Ascl1* presenta un patrón de expresión dinámico en la médula espinal.**

**A-C** Tinciones con anticuerpo para *Ascl1* sobre secciones transversales de tubo neural E11.5 (A), E13.5 (B) y E15.5 (C). A E11.5 y E13.5 *Ascl1* se expresa en la zona ventricular (ZV) dorsal y en un grupo restringido de células ventrales (A-B, puntas de flecha). A E15.5 se expresa alrededor del canal central (cc) y en células gliales por fuera de la ZV (C, flecha). V: ventrículo. Barras de escala 50  $\mu\text{m}$  (A,B), 20  $\mu\text{m}$  (C).

En estadios posteriores, E15.5 (Figura 15C), se pierde la organización dorso-ventral y solo se detecta a la proteína *Ascl1* en algunas células de la reducida zona ventricular remanente y en células aisladas en el resto de la médula (Figura 15C, flecha). Ese patrón ha sido encontrado aún en estadios más tardíos (E18.5 y perinatales), y está asociado a la diferenciación oligodendrocítica (Sugimori *et al.*, 2007; Sugimori *et al.*, 2008; Vue *et al.*, 2014).



**Figura 16. Ascl1 se expresa en coordenadas dorso-ventrales consistentes con el origen de las CSF-cN.**

**A-D)** Secciones transversales de tubo neural E13.5 teñidas con anticuerpos contra Ascl1 y Pax3 (A), Olig2 (B), Nkx6-1 (C) y Nkx2-2 (D). Las líneas de puntos señalan los límites de los territorios positivos. Los corchetes indican la expresión ventral de Ascl1, que se concentra principalmente en territorios Nkx6-1<sup>+</sup> y dorsal a Olig2 y Nkx2-2. También se detectan células en el dominio pOL y adyacentes a la placa del piso (pp, puntas de flecha). **E)** Inmunohistoquímica contra Pkd2l1 y Nkx6-1 en E14.5. La flecha indica una CSF-cN (Pkd2l1<sup>+</sup>) en el dominio Nkx6-1<sup>+</sup>. **F)** Posición de los territorios positivos para cada marcador, relativos a la apertura ventricular total. Se señalan los dominios de progenitores p2, pOL y p3. **G-H)** Distribución a lo largo del eje dorso-ventral de las células Ascl1<sup>+</sup> en E13.5 (484 células, 5 embriones) y CSF-cN/Pkd2l1<sup>+</sup> en E14.5 (108 células, 5 embriones). La posición de las células se hizo relativa al marcador dorsal Pax3 para independizarse de cambios entre los estadios. No se encontraron diferencias significativas entre la distribución de las células Ascl1<sup>+</sup> y de las CSF-cN ( $p=0.84$ , prueba de Mann-Whitney). **I)** Las CSF-cN se originan a partir de dos fuentes: el dominio p2 y la mitad dorsal del pOL, y el dominio p3 en la zona adyacente a la placa del piso (pp); y expresan los genes indicados en las esferas correspondientes. **J-L)** Se detectan células Ascl1<sup>+</sup> en todos los territorios que generan CSF-cN. Tinciones contra Ascl1 y Nkx6-1 (J), Olig2 (K) y Foxa2 (L). Las puntas de flecha señalan células doble positivas. Barras media+DE. Barras de escala 50µm en A-E, 10µm en J,L', 20µm en K-L.

Con el objetivo de evaluar si la expresión ventral de *Ascl1* está relacionada con la generación de las CSF-cN, analizamos su organización dorso-ventral en mayor detalle. Comparamos el patrón de expresión de *Ascl1* en la médula espinal E13.5 con el de otros genes mediante inmunohistoquímicas dobles (Figuras 16A-F). Como fue mencionado anteriormente, la expresión combinada de factores de transcripción define un código que distingue los dominios progenitores a lo largo del eje dorso-ventral. En el tubo neural tardío, en la fase gliogénica, se preserva la organización dorso-ventral que caracteriza al tubo neural temprano (Figura 16F, Fu *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2005; Petracca *et al.*, 2016; Sugimori *et al.*, 2007). En embriones E13.5, *Pax3* se expresa en la mitad dorsal del tubo neural, desde la placa del techo hasta la región media (Figura 16A, Goulding *et al.*, 1991), *Nkx6-1* se expresa en el tercio ventral de la zona ventricular abarcando los dominios p2, pOL y p3 (Figura 16C, Sander *et al.*, 2000; Vallstedt *et al.*, 2001), y *Nkx2-2* demarca el dominio de progenitores más ventral (p3) (Figura 16D, Briscoe *et al.*, 1999) cuyo límite dorsal coincide con la frontera ventral del dominio positivo para *Olig2* (pMN/pOL, Figura 16B, Novitch *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002). La figura 16F presenta los territorios de expresión de esos genes medidos en relación a la apertura ventricular.

Como observamos en las tinciones, existe una región ventral con células *Ascl1*<sup>+</sup> (negativa para *Pax3*, Figura 16A) inmersas en territorios *Nkx6-1* (Figura 16C). Esas células *Ascl1*<sup>+</sup> se encuentran mayoritariamente dorsales al dominio *Olig2*<sup>+</sup> (pOL, Figura 16B) y al dominio p3 (*Nkx2-2*<sup>+</sup>, Figura 16D), en un patrón similar al reportado en estadios neurogénicos (Li *et al.*, 2005; Parras *et al.*, 2002). Sin embargo, en E13.5, existen también algunas células *Ascl1*<sup>+</sup> en el territorio *Olig2*<sup>+</sup> y en la región *Nkx2-2*<sup>+</sup> (puntas de flecha en Figuras 16A-D, ver más adelante). La expresión de *Ascl1* aquí descrita presenta coincidencias con las regiones del neuroepitelio que producen CSF-cN.

Analizamos comparativamente la posición de las células *Ascl1*<sup>+</sup> y el origen dorso-ventral de las CSF-cN. Si *Ascl1* definiera los progenitores que dan origen a las CSF-cN, pronosticamos una estricta correlación entre la expresión de *Ascl1* en E13.5, estadio en que proliferan sus progenitores (Petracca *et al.*, 2016), y las coordenadas de “nacimiento” de las CSF-cN. Para determinar la posición de origen de las CSF-cN, realizamos inmunohistoquímicas contra *Pkd2l1* en E14.5. *Pkd2l1* es un canal iónico que se expresa específicamente en las neuronas del canal central y no en otras células espinales (Djenoune *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2006; Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que, en ese estadio, las CSF-cN recién comienzan a producirse y que nunca pierden el contacto apical con la superficie ventricular, asumimos que la posición de las CSF-cN en E14.5 refleja la ubicación dorso-ventral de los

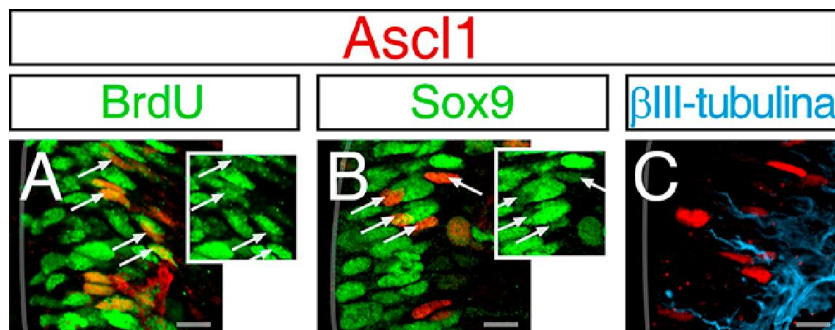
progenitores que les dan origen (Figura 16E, Petracca *et al.*, 2016). Para independizarnos de cambios citoarquitectónicos y comparar distintos estadios, todas las mediciones fueron relativizadas al límite ventral del territorio Pax3<sup>+</sup>, que distingue el neuroepitelio ventral y dorsal. A partir de la ubicación de las células Ascl1<sup>+</sup> y Pkd2l1<sup>+</sup>, construimos histogramas con su distribución en coordenadas ventrales. Como observamos en las figuras 16G-H, la distribución relativa de las células Ascl1<sup>+</sup> en la zona ventricular en E13.5 presenta una notable similitud con la alineación de las neuronas CSF-cN recién generadas en E14.5 (las distribuciones no resultaron significativamente diferentes,  $p=0.84$  prueba de Mann-Whitney).

Adicionalmente, encontramos que el 97±4% de las células Ascl1<sup>+</sup> expresan Nkx6-1 (Figura 16J), lo cual es congruente con que la totalidad de las CSF-cN expresan ese factor de transcripción (Figura 16I, Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016). Detectamos también algunas células Ascl1<sup>+</sup>,Olig2<sup>+</sup> inmersas en el dominio pOL (Figura 16K, punta de flecha), y células Ascl1<sup>+</sup> adyacentes a la placa del piso positivas para Foxa2 (expresado en la placa del piso y la porción más ventral del dominio p3, Figura 16L, puntas de flecha). De esa forma, mostramos que las células Ascl1<sup>+</sup> poseen identidad posicional similar a la de los progenitores de las CSF-cN (Figura 16I), estableciendo una nueva correlación entre la expresión ventral de Ascl1 y la generación de las CSF-cN.

En resumen, encontramos células que expresan Ascl1 en todas las coordenadas dorso-ventrales de la médula espinal que producen CSF-cN: a) el dominio p2 y pOL y b) la frontera entre el dominio p3 y la placa del piso. Esas observaciones sustentan la hipótesis de que las CSF-cN se generan a partir de progenitores que expresan Ascl1 en el neuroepitelio ventral tardío.

Dado que experimentos previos del laboratorio indican que las CSF-cN provienen de progenitores mitóticamente activos en E13-E14 (Petracca *et al.*, 2016), decidimos evaluar el estado proliferativo y carácter progenitor de las células Ascl1<sup>+</sup>. Con ese objetivo, aplicamos BrdU a hembras preñadas (4 pulsos entre E13 y E13.5) y analizamos las células Ascl1<sup>+</sup> en E13.5. Encontramos que el 90±5% de las células Ascl1<sup>+</sup> del tubo neural ventral incorporan el análogo de timidina en esas condiciones, lo que confirma que se trata de progenitores en división (Figura 17A). Adicionalmente, encontramos que las células Ascl1<sup>+</sup> ventrales expresan los marcadores de progenitores neuronales Sox9 (88±14%, Figura 17B, Stolt *et al.*, 2003) y Nestina (no mostrado, Lendahl *et al.*, 1990) y, por otra parte, carecen de la proteína neuronal  $\beta$ III-tubulina (99±3%, Figura 17C). En

conjunto con la coexpresión de *Ascl1* y *Sox2* en E14.5, que ya fue informada en la literatura (Vue *et al.*, 2014), los resultados demuestran el carácter progenitor de las células *Ascl1*<sup>+</sup> en la médula espinal ventral tardía.



**Figura 17. Las células *Ascl1*<sup>+</sup> ventrales tardías son progenitores neurales.**

Inmunohistoquímicas contra *Ascl1* y BrdU (A), *Sox9* (B), o  $\beta$ III-tubulina (C) sobre secciones transversales de tubo neural E13.5. Magnificaciones de la zona ventricular a la altura del dominio p2. En (A), BrdU fue administrado cubriendo las 12hs anteriores a la preparación del tejido (4 pulsos cada 3hs). Las células *Ascl1*<sup>+</sup> son progenitores neurales mitóticamente activos ya que incorporan BrdU ( $90\pm 5\%$ ,  $n=740$  células, 3 embriones), expresan el marcador *Sox9* ( $88\pm 14\%$ ,  $n=181$  células, 1 embrión) y son negativas para  $\beta$ III-tubulina ( $99\pm 3\%$ ,  $n=96$  células, 3 embriones). Barras de escala 10  $\mu$ m.

En resumen, los experimentos presentados muestran que *Ascl1* se expresa en progenitores neurales tardíos ventrales, que coinciden en tiempo y espacio con el origen de las CSF-cN. Eso constituye un primer indicador de que las CSF-cN podrían diferenciarse a partir de esos progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>.

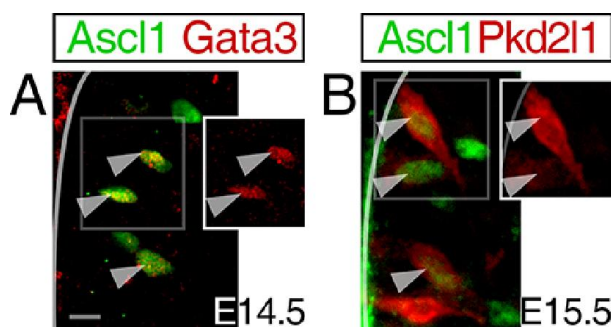
### **Las células *Ascl1*<sup>+</sup> comienzan a expresar marcadores de las neuronas del canal central**

Para analizar si la expresión ventral de *Ascl1* está asociada al linaje de las CSF-cN, investigamos si, conforme progresa el desarrollo, las células *Ascl1*<sup>+</sup> inician la expresión de marcadores que manifiesten esa identidad neuronal. Como fue descrito recientemente, las CSF-cN expresan el canal iónico *Pkd2l1* y los factores de transcripción *Gata2* y *Gata3*, mantienen la expresión de *Nkx6-1* y regulan negativamente *Sox9* a medida que progresa su diferenciación (Petracca *et al.*, 2016).

Los factores de transcripción proneurales, *Ascl1* entre ellos, clásicamente reducen su expresión durante la diferenciación neuronal (Guillemot, 2007; Imayoshi *et al.*, 2014). Por

ese motivo, anticipamos que el grado de coexpresión de *Ascl1* con determinantes neuronales postmitóticos podría ser reducido.

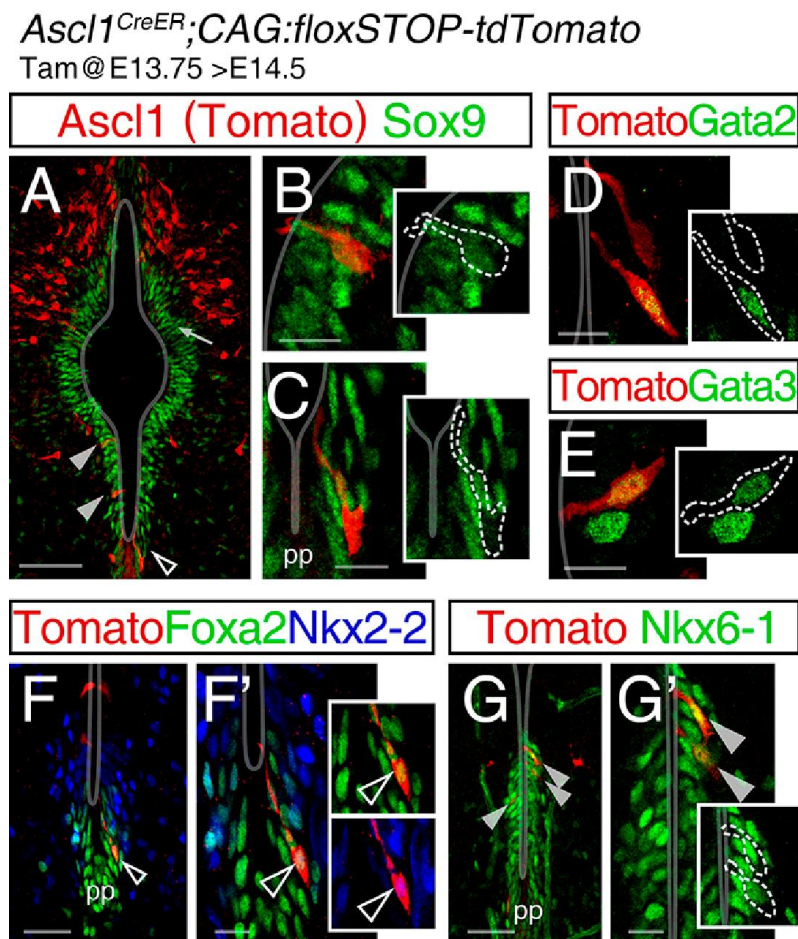
A pesar de esa potencial limitación, en la zona ventricular de embriones E14.5 encontramos células *Ascl1*<sup>+</sup> que coexpresan el factor de transcripción *Gata3* (Figura 18A). Por otro lado, algunas células que aún conservan niveles detectables de *Ascl1* expresan el marcador específico de las CSF-cN, *Pkd2l1*, tanto en E14.5 (no mostrado) como en E15.5 (Figura 18B). Además, cuando marcamos las células en división con BrdU entre E13 y E13.5 encontramos en E14.5 células *Pkd2l1*<sup>+</sup> que retienen la expresión de *Ascl1* e incorporan BrdU (no mostrado). La proporción de CSF-cN que expresa *Ascl1* encontrada ( $43\pm 18\%$ ) sugiere que: el factor de transcripción se extingue con la diferenciación neuronal (como fue demostrado, Guillemot, 2007; Imayoshi *et al.*, 2014), y/o que solo algunas CSF-cN se generan a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> (ver más adelante experimentos de mapeo destino de, Figuras 33-35).



**Figura 18. Células *Ascl1*<sup>+</sup> comienzan a expresar marcadores de CSF-cN.**

A) Inmunohistoquímica contra *Ascl1* y *Gata3* en E14.5 (A) o contra *Ascl1* y *Pkd2l1* en E15.5 (B). Magnificación de la zona ventricular a la altura del dominio p2. Los progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> encienden la expresión de *Gata3* y *Pkd2l1* (puntas de flecha). El  $43\pm 18\%$  de las CSF-cN/*Pkd2l1*<sup>+</sup> ( $n=94$  células, 4 embriones) expresan *Ascl1*. Barras de escala 10  $\mu$ m. Ventrículo a la izquierda.

Para confirmar que las células *Ascl1*<sup>+</sup> del tubo neural ventral tardío se diferencian en CSF-cN, realizamos experimentos de seguimiento de linaje de corto alcance. Utilizamos la línea de ratones *knock in Ascl1<sup>CreER</sup>* junto con el reportero de la recombinación *CAG:floxSTOP-tdTomato* (Figura 10, Kim *et al.*, 2011; Madisen *et al.*, 2011). En esos ratones la expresión de la recombinasa Cre se encuentra bajo el control transcripcional de *Ascl1*. La proteína Cre fusionada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos, es retenida en el citoplasma y solo trasloca al núcleo ante la administración del ligando sintético tamoxifeno. Una vez en el núcleo, la recombinación permite la expresión de la proteína roja fluorescente Tomato. De esa forma, solo las células que expresaron *Ascl1* en el momento de la administración de tamoxifeno se marcan de manera indeleble con Tomato.



**Figura 19. Progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> en E13.75 se diferencian en células con las características de las CSF-cN.**

Embrión E14.5 *Ascl1<sup>CreER</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato;Gata3<sup>LacZ</sup>* en el que se indujo la recombinación en E13.75 (3mg i.p. de Tam por hembra preñada). **A-C)** Inmunohistoquímica sobre una sección transversal de la médula espinal con anticuerpos contra Tomato y Sox9. En la mitad dorsal las células Tomato<sup>+</sup> migran fuera de la zona ventricular Sox9<sup>+</sup> (A), mientras que en la región ventral, permanecen asociadas a la superficie ventricular (puntas de flecha). Se detectan células en la región intermedia (puntas de flechas llenas, B) y en la región adyacente a la placa del piso (pp, puntas de flecha vacías, C). **B-E)** Las células Tomato<sup>+</sup> apagan la expresión de Sox9 (B-C) y encienden la de Gata2 (D) y Gata3 (E, detectado con anticuerpo contra β-Gal), sugiriendo que son CSF-cN. **F-G)** Inmunohistoquímicas contra Tomato, Foxa2 y Nkx2-2 (F) o Tomato y Nkx6-1 (G). Se detectan células Tomato<sup>+</sup> en las dos fuentes de CSF-cN: adyacentes a la placa del piso (F, puntas de flecha vacías), y en el dominio p2/pOL (G, puntas de flecha llenas). Las magnificaciones en F' y G' muestran la colocalización entre Tomato y Foxa2/Nkx2-2 o Nkx6-1, respectivamente. Barras de escala 10 μm excepto 50μm en A.

Administramos una dosis única de tamoxifeno a hembras preñadas entre E13.5 y E13.75, y analizamos la evolución de las células *Ascl1*<sup>+</sup> marcadas un día después, en E14.5 (Figura 19). La dosis de tamoxifeno utilizada fue baja para garantizar la marcación de unas pocas células y el mejor seguimiento de las mismas. El estadio de inducción y la dosis fueron definidos basados en experimentos que serán presentados más adelante en

la tesis. Como se observa en la figura 19A, detectamos proteína Tomato en la mitad dorsal de la médula espinal y en algunas células ventrales, lo que reproduce la expresión endógena de *Ascl1* en E13.5 mostrada en las figuras 15 y 16. Observamos que en el tubo neural dorsal, las células Tomato<sup>+</sup> se encuentran migrando fuera de la zona ventricular, en regiones negativas para *Sox9* (Figura 19A, flecha), lo cual indica que *Ascl1* precede inmediatamente la diferenciación neuronal. Por el contrario, en el tubo neural ventral E14.5 encontramos células Tomato<sup>+</sup> que permanecen ancladas a la superficie ventricular a través de un proceso delgado, que es una morfología reminiscente de las CSF-cN (Figura 19A, puntas de flecha y Figuras 19B-E).

Una inspección más detallada de las células Tomato<sup>+</sup>, muestra que, a pesar de estar embebidas en la zona ventricular Sox9<sup>+</sup>, expresan niveles bajos o nulos de dicho factor de transcripción, consistente con su silenciamiento en el proceso de diferenciación neuronal y la ausencia de *Sox9* en las CSF-cN (Figuras 19B-C). Adicionalmente, las células Tomato<sup>+</sup> comienzan a expresar los genes *Gata3* y *Gata2* (Figuras 19D-E, *Gata3* detectado por inmunohistoquímica contra  $\beta$ -Gal utilizando el alelo reportero *Gata3<sup>LacZ</sup>*). En la figura 19D mostramos dos células Tomato<sup>+</sup> con la morfología característica de las CSF-cN contactando la superficie ventricular, donde una sola de ellas expresa *Gata2* lo que sugiere que su expresión está iniciándose. Por incompatibilidad de los anticuerpos y una insuficiente acumulación de la proteína Tomato para su observación directa, no fue posible analizar la marca de Tomato y *Pkd2l1* de manera de probar irrefutablemente que se trata de CSF-cN. Sin embargo, la ausencia o reducidos niveles de *Sox9*, y la expresión de *Gata2* y *Gata3* son evidencias fuertes de que al menos algunos progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> se diferencian en neuronas del canal central.

La expresión de Tomato fue detectada en células ventrales con morfología CSF-cN tanto en la región intermedia, correspondiente a los dominios p2/pOL (Figuras 19A-B, puntas de flecha llenas), como en el extremo más ventral (Figuras 19A,C, puntas de flecha vacías). Específicamente, detectamos células Tomato<sup>+</sup>, derivadas de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>, en la interfase entre la placa del piso (marcada con *Foxa2*) y el dominio p3 que expresa *Foxa2* y *Nkx2-2*, consistente con el subgrupo CSF-cN'' (Figuras 19F-F', puntas de flecha vacías). Por otro lado, las células Tomato<sup>+</sup> de la región intermedia expresan *Nkx6-1*, característica congruente con su pertenencia al subgrupo CSF-cN' (Figuras 19G-G', puntas de flecha llenas).

En resumen, nuestros experimentos de seguimiento de corto alcance demuestran que progenitores que expresan *Ascl1* entre E13.5-E13.75 se diferencian tanto en CSF-cN'

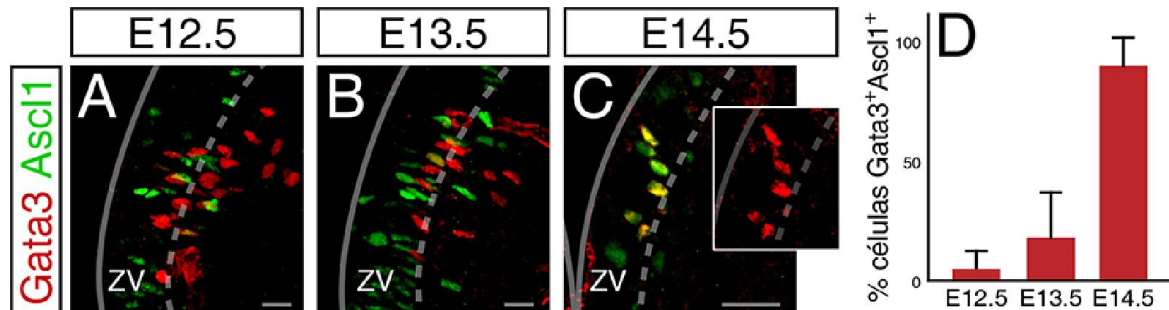
como en CSF-cN". Esos resultados, junto con los presentados anteriormente, señalan que existen progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> tardíos en el neuroepitelio gliogénico y que, al menos algunas de esas células, se diferencian en neuronas del canal central.

### **Las células ventriculares *Gata3*<sup>+</sup> son precursores de las CSF-cN**

Durante la caracterización de los progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> tardíos encontramos que esas células expresan el factor de transcripción *Gata3*. Como fue mencionado en la Introducción, las CSF-cN comparten con las interneuronas V2b la expresión de las proteínas *Gata2* y *Gata3*. Sin embargo, hemos demostrado que las CSF-cN constituyen una población de linaje independiente de las V2b, que se genera en momentos diferentes y su especificación está controlada por mecanismos genéticos distintos (Petracca *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que tanto *Ascl1* como *Gata3* están asociadas al dominio p2 temprano y a la generación de neuronas V2 (Del Barrio *et al.*, 2007; Karunaratne *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2007), evaluamos la relación entre ambas proteínas durante la especificación de las V2b y las CSF-cN.

Con el objetivo de determinar si la coexpresión de *Ascl1* y *Gata3* es específica del linaje de las CSF-cN o si ocurre también en el dominio p2 temprano, realizamos inmunohistoquímicas contra ambos factores de transcripción entre los estadios E12.5 y E14.5 (Figura 20). En embriones E12.5, cuando los progenitores p2 están aún generando neuronas V2, observamos una escasa coexpresión de *Ascl1* y *Gata3*. *Ascl1* se expresa dentro de la zona ventricular, mientras que *Gata3* está presente en células postmitóticas V2b abandonando la zona proliferativa (Figura 20A). Ese patrón se mantiene en E13.5, cuando la neurogénesis temprana se está extinguiendo y los progenitores ventrales cambian su competencia para producir células gliales, ependimocitos y CSF-cN (Figura 20B, Altman *et al.*, 1984; Petracca *et al.*, 2016; Rowitch *et al.*, 2010). Sin embargo, en E14.5, cuando las neuronas V2b *Gata3*<sup>+</sup> han migrado a la región lateral de la médula espinal (comparar las Figuras 21A y D), observamos células *Gata3*<sup>+</sup> inmersas en la región ventricular que coexpresan *Ascl1* (Figuras 20C-D). Esa coexpresión, solo observada en E14.5, es propia de la especificación neuronal tardía de las CSF-cN, y opuesta a lo que ocurre con las neuronas V2b, en cuya secuencia de diferenciación la regulación negativa de *Ascl1* precede la expresión postmitótica de *Gata3* (Peng *et al.*, 2007). Adicionalmente, constituye una nueva evidencia de la independencia de los linajes V2b y CSF-cN. Por último, dado que los progenitores de las CSF-cN proliferan y

expresan *Ascl1* entre los estadios E13.5 y E14, y que solo un día después detectamos expresión de *Gata3* en los mismos, proponemos que *Ascl1* y *Gata3* se expresan secuencialmente en el linaje de las CSF-cN.



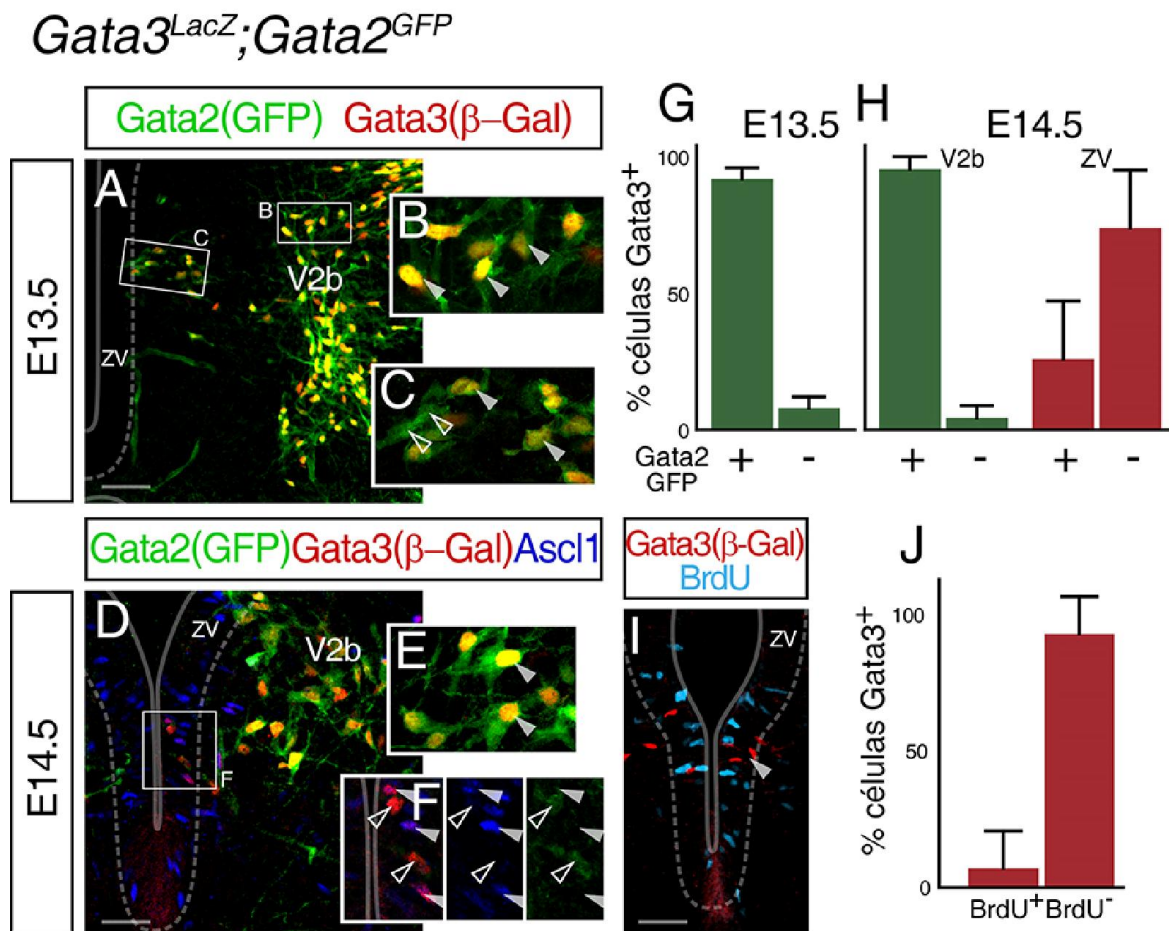
**Figura 20. *Ascl1* y *Gata3* se coexpresan en progenitores tardíos.**

**A-C)** Secciones transversales de tubo neural en estadios E12.5 (A), E13.5 (B) y E14.5 (C) teñidas con anticuerpos contra *Ascl1* y *Gata3*. Magnificaciones de la zona ventricular p2 (ZV), ventrículo a la izquierda. En el estadio neurogénico se observan células *Gata3*<sup>+</sup> saliendo de la ZV y no se detecta coexpresión con *Ascl1* (A). Lo mismo ocurre en E13.5 cuando ya se extinguió la neurogénesis temprana (B). A E14.5 se distinguen células *Gata3*<sup>+</sup> en la zona ventricular que expresan también *Ascl1* (C), asociado a la generación de CSF-cN. **D)** Proporción de células *Gata3*<sup>+</sup> expresando *Ascl1* en la zona ventricular (E12.5: n=264 células, 3 embriones; E13.5: n=394 células, 3 embriones; E14.5: n=182 células, 5 embriones). Barras media+DE. Barras de escala 10  $\mu$ m.

A continuación, nos preguntamos en qué momento del proceso de diferenciación de las CSF-cN comienza la expresión de *Gata3/2*. Analizamos la expresión de los factores *Gata2* y *Gata3*, haciendo uso de las líneas de ratones reporteras *Gata3*<sup>LacZ</sup> y *Gata2*<sup>GFP</sup>, en las que  $\beta$ -Gal y GFP reportan la expresión de *Gata3* y *Gata2* respectivamente (ver Figuras 10-12 en Materiales y Métodos). Ya reportamos que *Gata2* se expresa en las CSF-cN simultáneamente con *Pkd2l1* en el momento en que esas células adquieren su identidad neuronal, a partir de E14.5 (Petracca *et al.*, 2016).

Durante el desarrollo embrionario, los factores de transcripción *Gata2* y *Gata3* presentan un alto grado de coexpresión, tanto en el SN como fuera de él (Deneris *et al.*, 2013; Haugas *et al.*, 2012; Hosoya *et al.*, 2010; Karunaratne *et al.*, 2002; Lahti *et al.*, 2015; Lillevali *et al.*, 2004; Virolainen *et al.*, 2012). En la médula espinal, las interneuronas V2 tempranas no son una excepción. En ellas, *Gata3* coincide con *Gata2*, tanto en las neuronas en la zona del manto como en las células postmitóticas que abandonan la zona ventricular (Figuras 21A-C,G, puntas de flecha llenas, Karunaratne *et al.*, 2002). Se ha reportado incluso que la expresión de *Gata2* en precursores neuronales p2 precede la de

Gata3 (Figuras 12,21C, puntas de flecha vacías, Karunaratne *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2007).

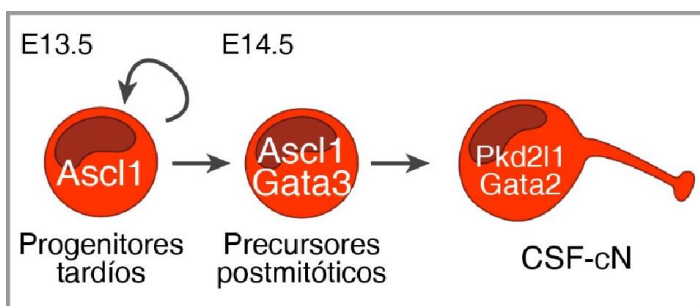


**Figura 21. Gata3 se expresa en precursores postmitóticos de las CSF-cN.**

**A-C)** Médula espinal de embriones E13.5 *Gata3<sup>LacZ</sup>;Gata2<sup>GFP</sup>* teñidas con anticuerpos contra GFP y β-Gal. Se observan células GFP<sup>+</sup>/β-Gal<sup>+</sup> migrando fuera de la zona ventricular (ZV, C) y ubicadas ventrolateralmente (V2b, B). En ambos casos β-Gal siempre colocaliza con GFP (puntas de flecha llenas). En C se observan algunas células GFP<sup>+</sup> saliendo de la ZV que aún no encendieron la expresión de Gata3 (β-Gal, puntas de flecha vacías). **D-F)** Secciones transversales de médula espinal E14.5 de embriones de igual genotipo que en A teñidas contra Ascl1, GFP y β-Gal. En la zona del manto se observan neuronas V2b que coexpresan Gata3/β-Gal y Gata2/GFP (E, puntas de flecha llenas). En la ZV se detectan células Gata3/β-Gal<sup>+</sup> que expresan Ascl1 y son negativas para Gata2/GFP (F, puntas de flecha llenas). Las puntas de flecha vacías señalan células Gata3/β-Gal<sup>+</sup> que ya apagaron Ascl1 y encienden Gata2/GFP. **G-H)** Porcentaje de células Gata3/β-Gal<sup>+</sup> expresando Gata2/GFP en E13.5 o en E14.5, dentro de la ZV o fuera de ella (V2b) (E13.5: n=692 células, 1 embrión; E14.5-ZV: n=61 células, 3 embriones; E14.5-V2b: n=326 células, 2 embriones). **I-J)** Inmunohistoquímica contra β-Gal y BrdU en animales *Gata3<sup>LacZ</sup>* E14.5 a los que se les administró BrdU 6hs antes de la preparación del tejido (2 pulsos cada 3hs a las hembras preñadas). No se detectan células β-Gal<sup>+</sup> en proliferación, sugiriendo que Gata3 se expresa en precursores postmitóticos (n=93 células, 3 embriones). Porcentaje de células marcados en J. Barras media+DE. Barras de escala 30 μm.

En la zona ventricular tardía (E14.5) detectamos células Gata3/ $\beta$ -Gal<sup>+</sup> que expresan Ascl1, lo cual es consistente con la diferenciación que proponemos para las CSF-cN. La mayoría de esas células carece aún de Gata2/GFP (74 $\pm$ 21%, Figuras 21D,F, puntas de flecha llenas, H), a diferencia de las V2b en la zona del manto (Gata2/GFP<sup>+</sup>, Gata3/ $\beta$ -Gal<sup>+</sup>, Figura 21E, puntas de flecha). Por lo tanto, mientras que en las neuronas V2 tempranas la expresión de Gata2 en los precursores es seguida prontamente por Gata3, durante la diferenciación de las CSF-cN la secuencia es la contraria. En la figura 21F observamos además células Gata3<sup>+</sup> que ya no expresan Ascl1 y encendieron la expresión de Gata2 (puntas de flecha vacías), lo que sugiere que la expresión de Gata2 en el proceso de diferenciación neuronal está acompañada por la regulación negativa de Ascl1 (Figura 22).

Por último, nos preguntamos si las células Gata3/ $\beta$ -Gal<sup>+</sup> en la zona ventricular E14.5 retienen capacidad proliferativa. Con ese objetivo administramos BrdU 6 horas antes de la preparación del tejido (2 pulsos cada 3hs) y analizamos la marcación de BrdU en las células Gata3<sup>+</sup>. Las células Gata3<sup>+</sup> no mostraron incorporación de BrdU en esas condiciones (91 $\pm$ 15%, Figuras 21I-J), lo que señala que Gata3 se expresa en precursores postmitóticos comprometidos con el linaje de las CSF-cN que aún no completaron su diferenciación (Figura 22).



**Figura 22. Ascl1 y Gata3 se expresan secuencialmente en la especificación de las CSF-cN.**

Los resultados presentados indican que Ascl1 se expresa en progenitores ventrales en las coordenadas a partir de las cuales se generan las CSF-cN en E13.5. Un día después se enciende

la expresión de Gata3 en precursores postmitóticos, que finalmente encienden Gata2 y Pkd2l1.

Nuestros experimentos nos permiten proponer un modelo en el que Ascl1 se expresa en progenitores tardíos en división en E13.5 y que, una vez abandonado el ciclo celular, encienden la expresión de Gata3 en primer término, seguida luego por Gata2 y Pkd2l1 una vez adquirida identidad neuronal (Petracca *et al.*, 2016).

Es preciso aclarar que nuestros experimentos no garantizan que todos los progenitores Ascl1<sup>+</sup> en E13.5 se diferencian en CSF-cN. Progenitores Ascl1<sup>+</sup> del neuroepitelio ventral en estos estadios también estarían contribuyendo a la generación de oligodendrocitos

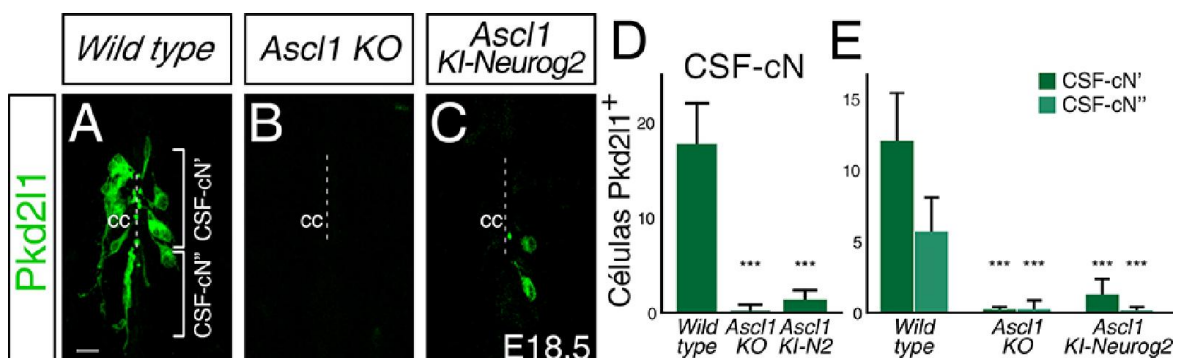
(Sugimori *et al.*, 2008; Vue *et al.*, 2014). Por otra parte, aunque nuestros experimentos sustentan un modelo en el que las CSF-cN se generan a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>, el hecho de que detectáramos expresión de *Ascl1* en un bajo porcentaje de las CSF-cN analizadas (Figura 18B) y observáramos células *Gata3*<sup>+</sup> o *Gata2*<sup>+</sup> negativas para *Ascl1*/Tomato (Figuras 19E, 20D, 21D, y datos no mostrados), no nos permite asegurar, por el momento, que la totalidad de las CSF-cN se diferencien a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>.

## II- ASCL1 CONTROLA LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CSF-CN

### La generación de las CSF-cN depende de *Ascl1*

Los resultados presentados en la sección anterior sugieren que *Ascl1* se expresa en progenitores tardíos que dan lugar a las neuronas del canal central. Para determinar si el factor de transcripción *Ascl1* participa en la diferenciación neuronal tardía en la médula espinal, evaluamos el desarrollo de las CSF-cN en animales mutantes nulos para *Ascl1* (Figura 10, Guillemot *et al.*, 1993b).

La delección de *Ascl1* es letal en estadios perinatales, por lo que realizamos los análisis fenotípicos en E18.5, momento en el que el número de CSF-cN ha alcanzado valores similares a los encontrados en ratones neonatos (Petracca *et al.*, 2016). Mediante inmunohistoquímica, encontramos que los mutantes *Ascl1* carecen de células que expresan *Pkd2l1* (Figuras 23A-B,D). En particular, observamos que ambas subpoblaciones de CSF-cN, las CSF-cN' de ubicación lateral, y las CSF-cN'' ventrales al canal central, están ausentes en los animales *Ascl1*<sup>-/-</sup> (Figura 23E).



**Figura 23. No existen neuronas *Pkd2l1*<sup>+</sup> en mutantes *Ascl1***

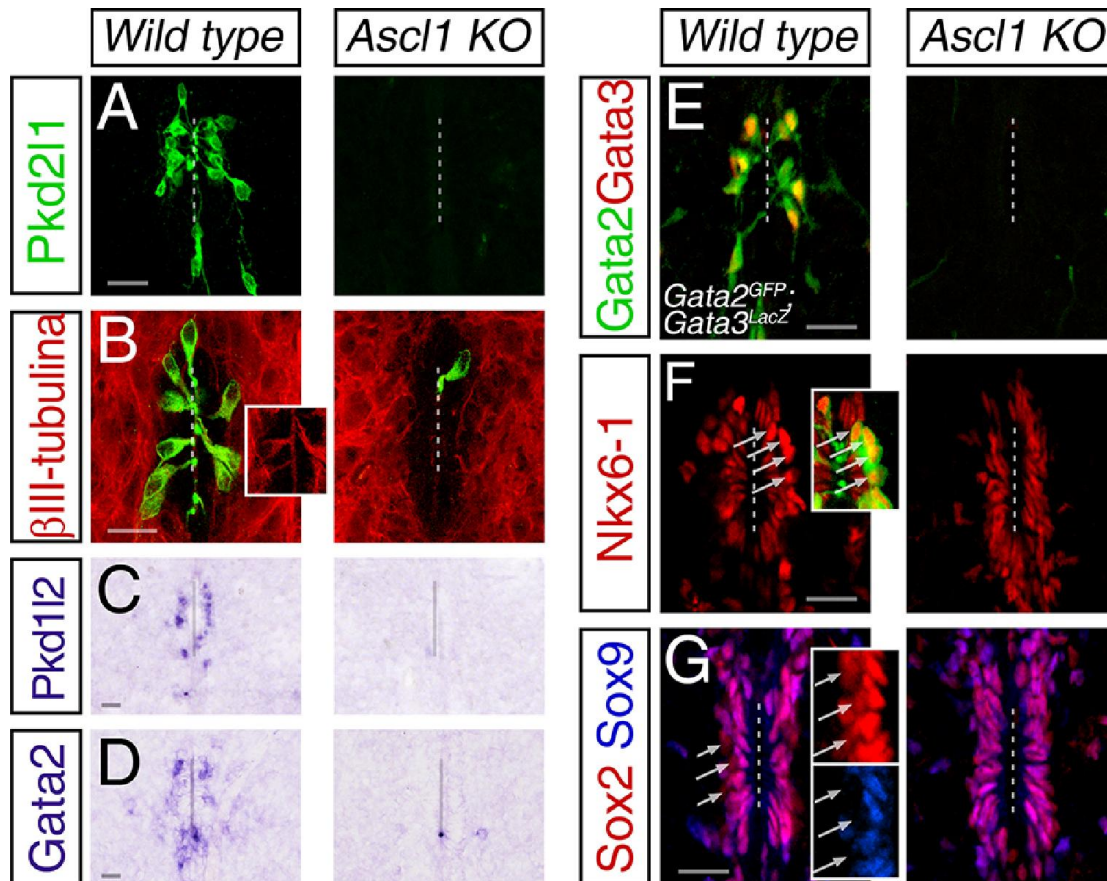
**A-C)** Secciones transversales de médula espinal E18.5 teñidas con anticuerpo contra *Pkd2l1* para detectar las CSF-cN en animales *wild type* (A), *Ascl1* knock out (KO) (B) o *Ascl1*<sup>KI-*Neurog2*</sup> (C). Se señalan los dos subgrupos de CSF-cN. **D-E)** Células *Pkd2l1*<sup>+</sup> por sección. Cuantificación de las CSF-cN totales (D) o según su localización alrededor del canal central (cc, E). No se detectan células *Pkd2l1*<sup>+</sup> en los animales mutantes. El reemplazo por *Neurog2* no rescata el fenotipo (*wt*: 42 secciones, 4 embriones; *Ascl1* KO: 29 secciones, 2 embriones; *Ascl1* KI-*Neurog2*: 29 secciones, 2 embriones). Barras media+DE. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado con el *wild type*, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 10  $\mu$ m.

*Ascl1* es una proteína proneural responsable de la producción de múltiples clases de neuronas (Casarosa *et al.*, 1999; Guillemot *et al.*, 1993b; Helms *et al.*, 2005). Sin embargo, más allá de esa función proneural, compartida con otros factores de

transcripción que contienen bHLH (Neurog1-2, Atoh1, entre otros), también ha sido reconocido como un determinante en la adquisición de identidades neuronales específicas (Fode *et al.*, 2000; Grimaldi *et al.*, 2009; Kriks *et al.*, 2005; Parras *et al.*, 2004; Pattyn *et al.*, 2004; Wildner *et al.*, 2006, entre otros). Para evaluar si la ausencia de células Pkd2l1<sup>+</sup> en los mutantes de *Ascl1* se debe solamente a una alteración en la neurogénesis, analizamos los animales *Ascl1<sup>KI-Neurog2</sup>*, en los cuales la región codificante de *Ascl1* está reemplazada por la de otro gen proneural, *Neurog2* (ver Figura 10 en Materiales y Métodos). Esa línea de ratones ha permitido distinguir entre las funciones neurogénica o de especificación, bajo la premisa de que la función neurogénica es compartida con *Neurog2*, mientras que el rol en la adquisición de identidades es específico para cada una de las proteínas bHLH (Jacob *et al.*, 2009; Parras *et al.*, 2002; Wildner *et al.*, 2006). En los animales homocigotas *Ascl1<sup>KI-Neurog2</sup>* encontramos un fenotipo similar al del mutante *Ascl1*, lo que indica que la capacidad neurogénica de *Neurog2* no es suficiente para suplantar la función de *Ascl1* (Figuras 19C-E). Ese resultado sugiere que *Ascl1*, más allá de su rol neurogénico, cumple un papel esencial en la especificación de las CSF-cN, relacionado con la adquisición de esa identidad.

Dado que la ausencia de células que expresen Pkd2l1 en los mutantes *Ascl1* podría reflejar una regulación negativa de la expresión del canal (Figura 24A) y no necesariamente implicar la ausencia de CSF-cN, evaluamos otros marcadores que caracterizan a las neuronas del canal central espinal. Las CSF-cN expresan también la policistitina Pkd1l2, que se propone como necesaria para formar un canal funcional en la membrana junto con Pkd2l1 (Petracca *et al.*, 2016; Semmo *et al.*, 2014). Mediante hibridación *in situ*, encontramos que los mutantes *Ascl1* no expresan Pkd1l2 en la médula espinal, en contraposición con ratones *wild type* (Figura 24C). Adicionalmente, analizamos la expresión de los factores de transcripción Gata3 y Gata2 en la región del epéndima, indicadores de la identidad de esa clase neuronal. Al igual que para Pkd2l1 y Pkd1l2, no detectamos expresión de Gata2 ni de Gata3 alrededor del canal central en *Ascl1<sup>-/-</sup>* en E18.5 (Figuras 24D-E). Esos ensayos fueron realizados mediante hibridaciones *in situ* y utilizando los alelos reporteros *Gata2<sup>GFP</sup>* y *Gata3<sup>LacZ</sup>*, en los que, como mostramos en las secciones anteriores, las proteínas GFP y  $\beta$ -Gal reproducen la expresión de Gata2 y Gata3 respectivamente. Para probar de manera definitiva la ausencia de neuronas en contacto con el CSF, analizamos la presencia de procesos  $\beta$ III-tubulina<sup>+</sup> atravesando el epéndima del canal central, ya que las CSF-cN son las únicas neuronas con esta característica (Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016; Stoeckel *et al.*, 2003; Vigh *et al.*, 1971). Mientras que en los animales *wild type* se

distinguen los somas de las CSF-cN y sus proyecciones  $\beta$ III-tubulina<sup>+</sup> hacia el lumen a través de la capa endimaria, dichos procesos están mayormente ausentes en el canal central de ratones *Ascl1*<sup>-/-</sup> (Figura 24B).



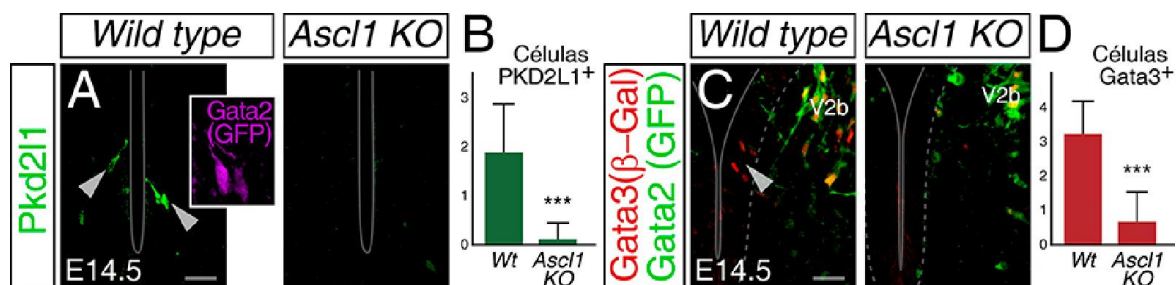
**Figura 24. Ausencia de CSF-cN en mutantes *Ascl1*.**

Secciones transversales de médula espinal E18.5 *wild type* o *Ascl1 KO* en las que se detecta a las CSF-cN mediante inmunohistoquímica contra Pkd2l1 (A),  $\beta$ III-tubulina (B), GFP y  $\beta$ -Gal (animales *Gata2*<sup>GFP</sup>;*Gata3*<sup>LacZ</sup>, E), o mediante hibridación *in situ* con sondas para Pkd1l2 (C) y Gata2 (D). En los mutantes *Ascl1* no se observan células Pkd2l1<sup>+</sup>, ni procesos  $\beta$ III-tubulina<sup>+</sup> atravesando el epéndima (A-B). Tampoco se detecta mRNA de Pkd1l2 ni Gata2 alrededor del canal central (cc, C-D), ni células Gata2/GFP<sup>+</sup>,Gata3/ $\beta$ -Gal<sup>+</sup>. En las tinciones contra Nkx6-1 (F) y Sox2/Sox9 (G) se puede observar que el epéndima alrededor del cc se forma normalmente. En los animales *wild type* se observan células con niveles altos de Nkx6-1 (flechas en F) que coinciden con células Pkd2l1<sup>+</sup> (en verde en el recuadro), mientras que los tejidos mutantes son más homogéneos. Adicionalmente, se señalan células Sox2<sup>+</sup>,Sox9<sup>-</sup> (flechas en G, recuadros), ausentes en los *Ascl1*<sup>-/-</sup>. La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 20  $\mu$ m.

Por último, no observamos diferencias cualitativas importantes en la expresión de los marcadores ventriculares Nkx6-1, Sox2 y Sox9, lo cual sugiere que la arquitectura del canal central no presenta alteraciones notables en los mutantes y que, por lo tanto, la ausencia de las CSF-cN no debe atribuirse a defectos en la formación del canal central (Figuras 24F-G). Adicionalmente, el análisis más detallado de esas proteínas evidencia la

ausencia de las CSF-cN en la médula espinal *Ascl1*<sup>-/-</sup>. En los animales *wild type*, Nkx6-1 se expresa de manera heterogénea, alcanzando niveles más intensos en las CSF-cN que en los endimocitos (Figura 24F, flechas). En los mutantes no observamos células con alto nivel de expresión de Nkx6-1. Por otro lado, en los animales control, la región del epéndima contiene células Sox2<sup>+</sup>/Sox9<sup>-</sup> que corresponden a las CSF-cN y se distinguen de las células endimarias que expresan las dos proteínas (Figura 24G, flechas). Sin embargo, en los mutantes *Ascl1*, todas las células que rodean el canal central expresan ambos factores Sox, lo que interpretamos como una confirmación adicional de que la médula espinal de ratones mutantes para *Ascl1* carece de CSF-cN.

En su conjunto, esos resultados sugieren que *Ascl1* cumple una función esencial en la generación de las CSF-cN de la médula espinal. Sin embargo, es posible que *Ascl1* no controle la especificación de las CSF-cN sino que ese factor de transcripción sea importante para la supervivencia de las neuronas Pkd2l1<sup>+</sup> producidas y no para el inicio de su diferenciación. Para analizar esa posibilidad, observamos el tubo neural de mutantes *Ascl1* E14.5, momento en que las CSF-cN están comenzando a aparecer.



**Figura 25. Las CSF-cN no se generan en los mutantes *Ascl1*.**

**A-B)** Inmunohistoquímica contra Pkd2l1 en tubos neurales E14.5 *wild type* y *Ascl1* KO. Las puntas de flecha señalan CSF-cN Pkd2l1<sup>+</sup> en el *wild type*, no detectadas en el mutante. El recuadro muestra que también expresan Gata2/GFP (embriones *Gata2*<sup>GFP</sup>). **B)** Células Pkd2l1<sup>+</sup> por sección (17 secciones para cada uno). **C-D)** Tinción contra β-Gal y GFP en animales E14.5 *Gata2*<sup>GFP</sup>; *Gata3*<sup>LacZ</sup>; *Ascl1*<sup>+/+</sup> o *Ascl1*<sup>-/-</sup>. En ambos casos se observan células Gata2/GFP<sup>+</sup>, Gata3/β-Gal<sup>+</sup> fuera de la zona ventricular (ZV, señalada con línea punteada) correspondientes a las interneuronas V2b. La punta de flecha en el *wild type* señala células Gata3/β-Gal<sup>+</sup> en la ZV, ausentes en los mutantes *Ascl1*. **C)** Células Gata3<sup>+</sup> por sección (*wild type*: 9 secciones, *Ascl1* KO: 12 secciones, 2 embriones cada uno). Barras media+DE.

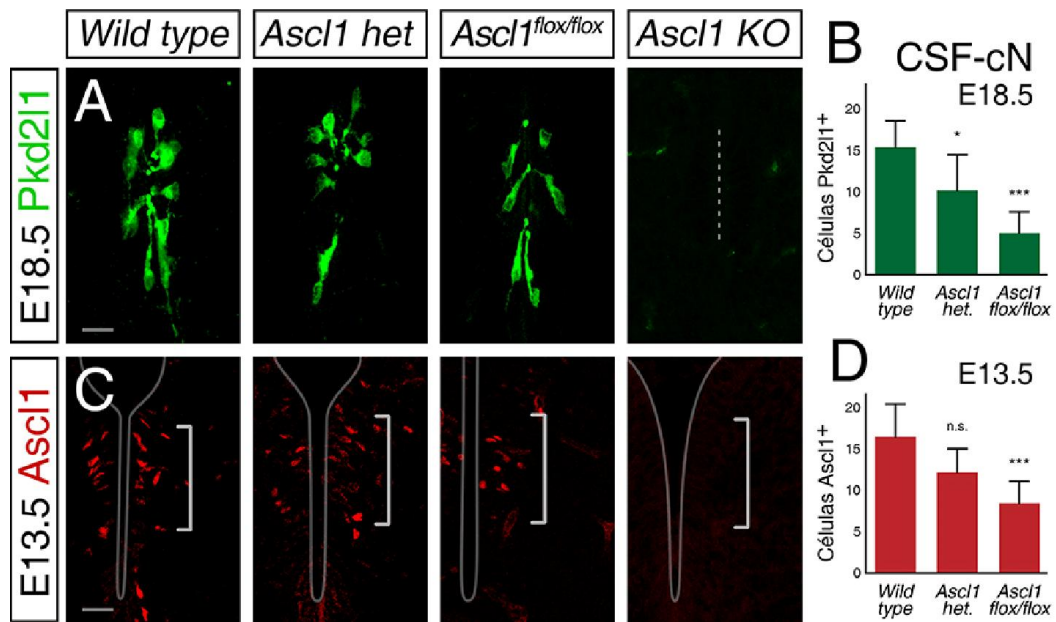
\*\*\* p<0.0005, prueba de Mann-Whitney. Barras de escala 20 μm.

En E14.5, en animales *wild type* conteniendo el alelo *Gata2*<sup>GFP</sup>, detectamos solo unas pocas neuronas Pkd2l1<sup>+</sup>, GFP<sup>+</sup> por sección. Por el contrario, en los embriones *Ascl1*<sup>-/-</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup>, no observamos expresión de Pkd2l1 ni de GFP en células asociadas a la superficie ventricular, lo cual indica que las CSF-cN no se producen en ausencia de

Ascl1 (Figuras 25A-B). Adicionalmente, en los mutantes *Ascl1* E14.5, observamos una menor expresión de Gata3 en la zona ventricular, detectada a través de  $\beta$ -Gal (*Gata3<sup>LacZ</sup>*, Figuras 25C-D). Esos resultados no solo demuestran la función de Ascl1 en el inicio de la especificación de las CSF-cN, sino que también sustentan la idea de que Ascl1 y Gata3 se expresan secuencialmente y que Ascl1 regula la expresión de Gata3 en el curso de la diferenciación de las CSF-cN. De esa manera se refuerza el modelo propuesto en el que Gata3 se encuentra río abajo de Ascl1 en la especificación de las CSF-cN (Figura 18).

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que progenitores Ascl1<sup>+</sup> en E13.5 contribuyen con la generación de las CSF-cN y que Ascl1 es necesario para la neurogénesis tardía en la médula espinal que da origen a esa clase neuronal. Con el objetivo de profundizar el análisis de la relación de Ascl1 con la especificación de las CSF-cN, evaluamos animales con fondos genéticos que presentan distinta actividad de Ascl1. Determinamos en ellos la expresión de Ascl1 en la médula espinal ventral en E13.5 y su relación con el número de CSF-cN encontrado en E18.5.

En primer término, los animales heterocigotas *Ascl1<sup>+/-</sup>* cuentan con una sola copia del gen, lo que, en algunos casos, se traduce en niveles reducidos de la proteína. Adicionalmente, contamos con la línea *Ascl1<sup>fllox</sup>*, que contiene sitios loxp flanqueando la región codificante de Ascl1 (Pacary *et al.*, 2011). Río abajo de los dos exones del gen de *Ascl1* y de la secuencia terminadora de la transcripción, la construcción contiene la proteína fluorescente *Venus* y un *cassette* de resistencia a neomicina bajo el promotor fuerte PGK (Figura 10). Si bien esa línea fue diseñada para eliminar *Ascl1* de manera condicional dependiente de Cre, la modificación introducida en el locus *Ascl1* resultó en menores niveles de expresión debido a la interrupción de *enhancers* o regiones regulatorias, o, más probablemente, al reclutamiento masivo de la maquinaria transcripcional al promotor PGK limitando la expresión de Ascl1 por impedimento estérico o competencia. En particular, se ha observado que el giro dentado del hipocampo de ratones *Ascl1<sup>fllox/fllox</sup>* adultos y juveniles presenta niveles reducidos de Ascl1 (aún en ausencia de la recombinasa Cre), tiene una menor cantidad de progenitores neurales y exhibe neurogénesis adulta disminuida (Andersen *et al.*, 2014). Sin embargo, dada la sobrevivencia de los animales, se asumía que la modificación *Ascl1<sup>fllox</sup>* no afectaba la neurogénesis en el embrión (Andersen *et al.*, 2014).



**Figura 26. Las CSF-cN generadas dependen de la expresión de Ascl1 en E13.5.**

**A-D)** Secciones de médula espinal *wild type*, *Ascl1*<sup>+/-</sup> (heterocigota), *Ascl1*<sup>flox/flox</sup> o *Ascl1*<sup>-/-</sup> E18.5 (A) o E13.5 (C) teñidas con anticuerpos contra Pkd211 o Ascl1 respectivamente. Los corchetes en C señalan el dominio ventral de expresión de Ascl1. B) Número de CSF-cN por sección (*wild type*: 31 secciones, 2 embriones; *Ascl1 het.*: 18 secciones, 3 embriones, *Ascl1*<sup>flox/flox</sup>: 25 secciones, 3 embriones). D) Células Ascl1<sup>+</sup> por hemisección (*wild type*: 33 secciones, 2 embriones; *Ascl1 het.*: 12 secciones, 1 embrión, *Ascl1*<sup>flox/flox</sup>: 38 secciones, 2 embriones). Se observa una correlación entre el número de CSF-cN en E18.5 y progenitores Ascl1<sup>+</sup> en E13.5. Barras media+DE. \*\*\* p<0.001, \* p<0.05, n.s. no significativo comparado con el *wild type*, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 20 μm.

Mediante inmunohistoquímica encontramos, en los embriones heterocigotas *Ascl1*<sup>+/-</sup>, una tendencia (aunque no significativa) hacia un menor número de células Ascl1<sup>+</sup> en el tubo neural ventral E13.5 respecto de los animales control (Figuras 26C-D). Esa tendencia se correlaciona con una menor cantidad de neuronas Pkd211<sup>+</sup> en la médula espinal perinatal (66% respecto de los ratones *wild type*; Figuras 26A-B). De manera más contundente, los animales *Ascl1*<sup>flox/flox</sup>, muestran una reducción importante y significativa del número de células que expresan altos niveles de Ascl1 en E13.5 (Figuras 26C-D) y un número menor de células Pkd211<sup>+</sup> en E18.5 (33% respecto de los embriones control; Figuras 23A-B). Esos resultados establecen una correlación entre la cantidad de progenitores que expresan altos niveles de Ascl1 en la médula espinal ventral E13.5 y la cantidad de CSF-cN generadas a partir del neuroepitelio ventral tardío. Asimismo, este análisis enfatiza la necesidad de expresión de Ascl1 por encima de un umbral (niveles altos) en los progenitores tardíos del neuroepitelio ventral para instruir su diferenciación neuronal e iniciar el programa de especificación de las CSF-cN.

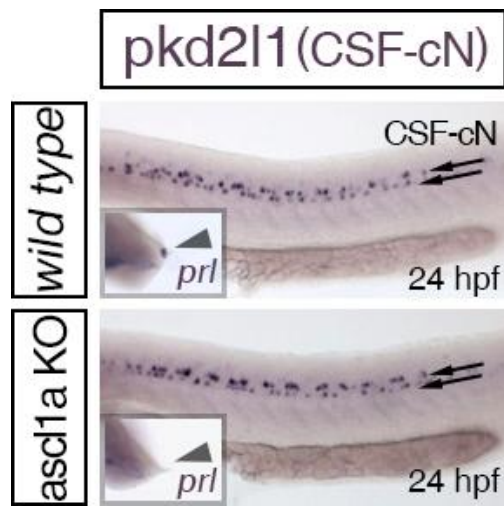
Es posible que la relación funcional entre *Ascl1* y la diferenciación de las CSF-cN se encuentre conservada en otras especies amniotas. En el pollo, por ejemplo, las CSF-cN también aparecen tardíamente durante la etapa gliogénica (Petracca *et al.*, 2016). En esos embriones, la expresión de *Ascl1* se mantiene en estadios tardíos y en los dominios de origen de las CSF-cN, de forma similar a lo encontrado en el ratón (no mostrado).

### **Ascl1 es necesario para generar las CSF-cN tardías de amniotas**

Teniendo en cuenta que las CSF-cN están conservadas en todas las especies de cordados analizadas (Vigh *et al.*, 1998; Vigh *et al.*, 1977), decidimos evaluar si *Ascl1* también es requerido para la especificación de esa clase neuronal en otras especies de vertebrados. Analizamos entonces lo que ocurre en el pez cebra, como ejemplo de vertebrado no amniota.

Como consecuencia de una duplicación génica masiva en el linaje de los teleósteos (Glasauer *et al.*, 2014), el pez cebra tiene dos homólogos de *Ascl1*: *ascl1a* y *ascl1b*. Cada uno de ellos presenta un patrón distintivo de expresión en el eje dorso-ventral del tubo neural, con *ascl1a* presente en la región ventral y *ascl1b* fundamentalmente restringido a la zona ventricular intermedia y dorsal (Allende *et al.*, 1994). Esa distribución sugiere que en el caso de que *Ascl1* controlara la especificación de las CSF-cN (neuronas KA) en pez cebra, dicha regulación sería ejercida por el parálogo *ascl1a*. Gracias a la colaboración de Matthias Hammerschmidt de la Universidad de Colonia, Alemania, que cuenta con la línea deficiente en *ascl1a*, se evaluó la presencia de CSF-cN en embriones de pez cebra. Se trabajó con embriones de la línea *pia*, mutantes para *ascl1a* (Pogoda *et al.*, 2006), y se identificó a las CSF-cN por hibridación *in situ* para *pkd2l1* en embriones 24hpf (horas postfertilización). Los embriones mutantes *ascl1a* fueron identificados mediante la ausencia de señal de *prl* (prolactina, sonda usada simultáneamente junto con *pkd2l1*), ya que el desarrollo de la adenohipófisis depende de *ascl1* (Pogoda *et al.*, 2006). En los embriones mutantes *ascl1a* se observó que las células *pkd2l1*<sup>+</sup> se distribuyen a lo largo del tubo neural de forma similar que en los animales control (Figura 27). Adicionalmente, se reguló negativamente *ascl1b* mediante el uso de un morfolino específico (5'- TCGTAGCGACGACAGTTGCCTCCAT-3', GeneTools LLC). No se observaron diferencias en la disposición de las CSF-cN, en los embriones *wild type* o mutantes *ascl1a* tratados con morfolino, respecto de embriones

control (no mostrado). Esas observaciones demuestran que *ascl1* no controla la diferenciación de las CSF-cN en el pez cebra.



**Figura 27. Ascl1 no controla la generación de CSF-cN en pez cebra.**

Embriones de pez cebra 24 hpf *wild type* o mutantes *ascl1a*. Se realizaron simultáneamente hibridaciones *in situ* contra *pkd2l1* y prolactina (*prl*). *prl* se expresa en la adenohipófisis (recuadros, punta de flecha), ausente en los mutantes *ascl1a*, lo que permite identificar a los mutantes. *prl* no se expresa en la médula espinal. En el tubo neural se observan dos hileras de células *pkd2l1*<sup>+</sup> correspondientes a las CSF-cN' y CSF-cN'' (flechas). La cantidad y distribución de células *pkd2l1*<sup>+</sup> fue similar en los animales control y mutantes.

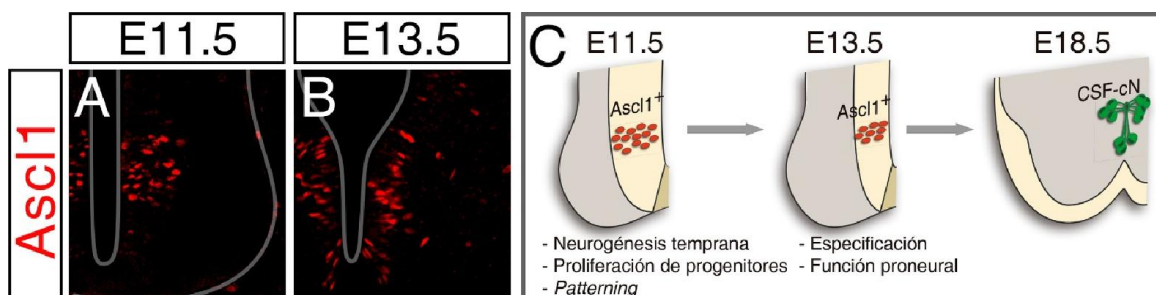
Como fue mencionado en la Introducción, a diferencia de lo que ocurre en ratón y pollo (Petracca *et al.*, 2016), en el pez cebra y en la rana la generación de las CSF-cN es producto de la neurogénesis temprana. En ambas especies se ha descrito que la generación de esas neuronas ocurre simultáneamente con la aparición de las motoneuronas primarias y otras interneuronas, y precede a la especificación glial que ocurre en estadios más avanzados del desarrollo (Binor *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 1987a; Park *et al.*, 2004; Seredick *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2007; Yeo *et al.*, 2007). Eso supone una heterocronía en la secuencia del desarrollo de las neuronas espinales entre los amniotas y los no amniotas, que podría reflejar distintos usos o adaptaciones evolutivas (Smith, 2003).

Hipotetizamos que *Ascl1* está específicamente asociado con el desarrollo de las CSF-cN de amniotas, proceso que ocurre en etapas embrionarias avanzadas. La participación de *Ascl1* en el comienzo del programa genético podría representar un requisito fundamental para la neurogénesis en un entorno gliogénico, con funciones extensivas al proceso de especificación en sí mismo. En base a esas observaciones proponemos que la heterocronía en el desarrollo de las CSF-cN y la función de *Ascl1* en su diferenciación están asociadas. La demostración de una relación causal requerirá de mayor estudio.

## Ascl1 actúa sobre los progenitores ventrales tardíos para dirigir la diferenciación de las CSF-cN

Si nuestra hipótesis de que Ascl1 desencadena la diferenciación neuronal tardía en la médula espinal ventral de amniotas es correcta, predecimos que Ascl1 debe actuar en el comienzo de la especificación de las CSF-cN y no antes. Eso cobra particular relevancia por el hecho de que Ascl1 se expresa en el neuroepitelio ventral desde estadios tempranos (~E10.5, Figuras 15A y 28A-B), por lo que el fenotipo hallado en los mutantes nulos de *Ascl1* podría ser consecuencia de acciones previas al inicio de la especificación de las CSF-cN.

Por ejemplo, es posible que en el neuroepitelio temprano (E10.5-E11.5), Ascl1 regule distintos fenómenos, como la neurogénesis temprana, el balance de progenitores disponibles tardíamente, la proliferación de los progenitores neurales, o el *patterning* del neuroepitelio (Figura 28C). Cualquiera de esos escenarios podría conducir a deficiencias en la diferenciación neuronal posterior que cuestionan nuestra hipótesis de Ascl1 como determinante de la neurogénesis tardía.



**Figura 28. Ascl1 se expresa en el tubo neural ventral desde estadios tempranos.**

**A-B)** Inmunohistoquímica contra Ascl1 en la médula espinal ventral E11.5 (A) o E13.5 (B). Ascl1 se expresa en la médula espinal ventral desde estadios tempranos (E11.5), anteriores al desarrollo de las CSF-cN (E13.5). **C)** Esquema mostrando la expresión de Ascl1 en ambos estadios. En cada uno, Ascl1 cumpliría funciones diferentes en la diferenciación de las CSF-cN. La perturbación de la expresión de Ascl1 de manera controlada en el tiempo permite explorar esas funciones.

Planteamos entonces dos posibilidades, (1) que Ascl1 actúe sobre el neuroepitelio temprano y afecte los progenitores que se diferencian en CSF-cN tardíamente, o (2) que Ascl1 efectivamente actúe en los progenitores tardíos, dirigiendo su especificación en CSF-cN.

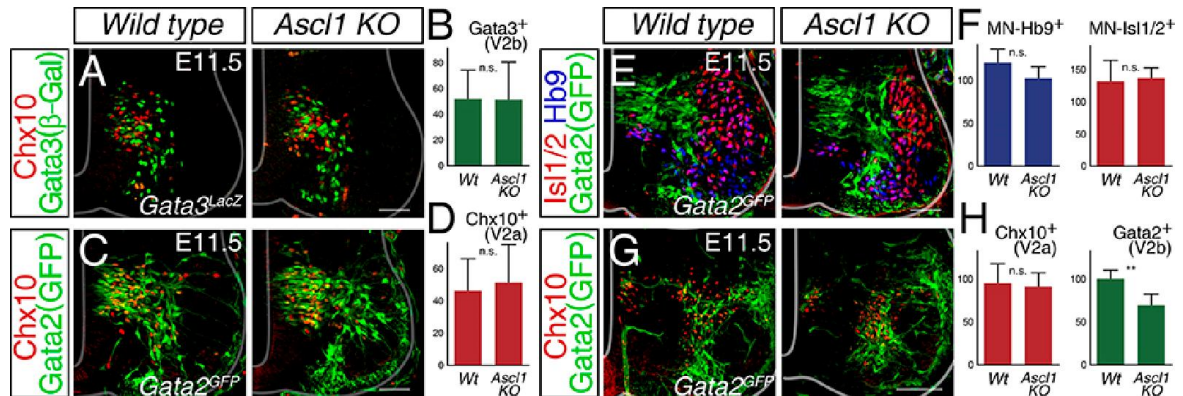
Con el objetivo de distinguir entre esas dos alternativas, en primer lugar analizamos el papel de Ascl1 en la neurogénesis temprana del tubo neural ventral. Teniendo en cuenta que Ascl1 se expresa en el dominio de progenitores p2 (Figura 15A), evaluamos la

producción de neuronas V2 en embriones mutantes *Ascl1* (Figura 29). Las interneuronas V2 se generan simultáneamente con el resto de las interneuronas ventrales V0-V3 y las motoneuronas, durante la etapa neurogénica que abarca los estadios E9.5-E12.5 (Briscoe *et al.*, 2001; Karunaratne *et al.*, 2002; Lundfald *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014). Las V2 son un grupo heterogéneo de neuronas formado principalmente por las interneuronas excitatorias V2a (Chx10<sup>+</sup>) y las inhibitorias V2b (Gata2/3<sup>+</sup>). Ambas poblaciones se diferencian a partir de progenitores p2 en un proceso que depende de la vía de señalización de Notch (Del Barrio *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2009).

En embriones *Ascl1*<sup>-/-</sup> E11.5 encontramos que las neuronas V2a (Chx10<sup>+</sup>) y V2b (Gata3/β-Gal<sup>+</sup> usando el reportero *Gata3*<sup>LacZ</sup>) se distribuyen en la región ventrolateral de la médula espinal de manera similar a lo que ocurre en sus hermanos *wild type* (Figura 29A). El mismo resultado fue observado usando la línea *Gata2*<sup>GFP</sup>, en la que las V2b se identifican por la expresión de altos niveles de GFP (Figuras 29C,E). No encontramos diferencias en la cantidad de neuronas V2a ni V2b entre los animales control y mutantes (Figuras 29B,D). A E13.5, sin embargo, detectamos una disminución del 30% en las neuronas V2b identificadas por GFP en animales *Ascl1*<sup>-/-</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> en comparación con los controles (Figuras 29G-H). Obtuvimos resultados similares en estadios posteriores del desarrollo (E16.5 y E18.5, no mostrado). Ese desbalance entre las neuronas V2a y V2b en ausencia de *Ascl1* es el resultado indirecto de la modulación de la vía de Notch que controla la decisión entre ambos destinos (Li *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2007). Debo remarcar que los resultados de esos experimentos difieren cualitativa y cuantitativamente de lo reportado en la literatura, que establecía una importante reducción de la diferenciación de células V2 (Li *et al.*, 2005; Parras *et al.*, 2002). La repetición de ese análisis en varios estadios (E11.5, E13.5, E16.5 y E18.5) y la utilización de varios marcadores de identidad V2, nos llevan a considerar que las conclusiones publicadas previamente difieren de las de esta tesis, porque se basaron en el análisis de estadios muy tempranos (~E10.5), en los cuales comienza la producción de neuronas V2 y, es posible que, en la médula espinal de mutantes *Ascl1*, el desarrollo neuronal se encuentre unas horas retrasado respecto de los animales *wild type*.

Como control adicional, analizamos en los embriones *Ascl1*<sup>-/-</sup> la producción de motoneuronas (Hb9<sup>+</sup> y Isl1/2<sup>+</sup>) sin encontrar alteraciones (Figuras 29E-F). En conclusión, *Ascl1* modula levemente los destinos neuronales del dominio p2 temprano, con una ligera modificación en la relación entre neuronas excitatorias V2a e inhibitorias V2b en los mutantes *Ascl1*. Debido a su reducida magnitud, consideramos que esos cambios no

tienen consecuencias sobre el número de progenitores disponibles más tardíamente para la diferenciación de las CSF-cN. Incluso si lo tuviesen, generarían un aumento en el número de progenitores disponibles que no explica la ausencia de las CSF-cN.



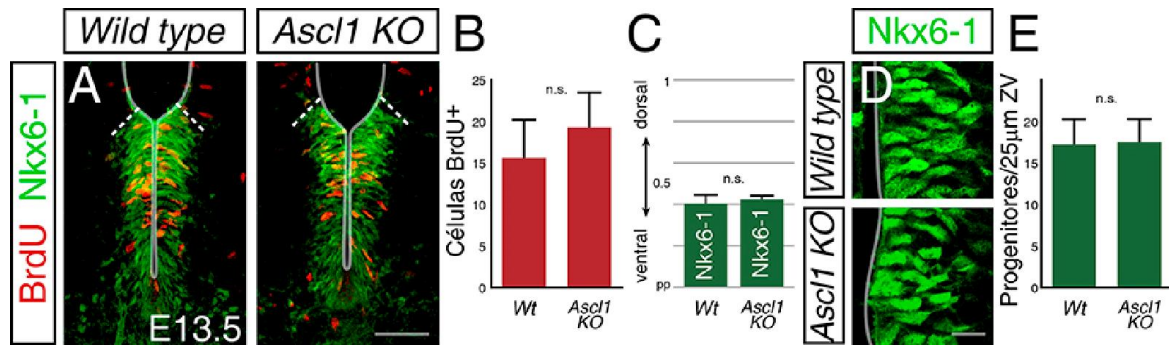
**Figura 29. La ausencia de *Ascl1* afecta solo levemente el desarrollo de las neuronas tempranas.**

**A-B)** Secciones de tubo neural E11.5 *Gata3<sup>LacZ</sup>;Ascl1<sup>+/+</sup>* o *Ascl1<sup>-/-</sup>* teñidas con anticuerpos para Chx10 y  $\beta$ -Gal para identificar a las interneuronas V2a y V2b respectivamente. No se observan diferencias en el número de neuronas por sección (B,D). **C-H)** Secciones E11.5 (C-F) y E13.5 (G-H) *Gata2<sup>GFP</sup>* control o *Ascl1 KO* teñidas contra Chx10 y GFP (C-D, G-H) o Isl1/2, Hb9 y GFP (E-F) para detectar interneuronas V2 y motoneuronas (MN). Solo en E13.5 se observa una disminución en el número de neuronas V2b en los mutantes *Ascl1*. Las motoneuronas no están afectadas. Barras media+DE (células por hemisección, 10 secciones, 2 embriones cada uno). \*\*  $p < 0.01$ , n.s. no significativo, prueba de Mann-Whitney. Barras de escala 50  $\mu$ m.

Además de las funciones clásicas de *Ascl1* relacionadas con su actividad proneural (Guillemot, 2007; Parras *et al.*, 2002; Pattyn *et al.*, 2006), se encontró más recientemente que *Ascl1* regula la proliferación de los progenitores, y que, tanto en el telencéfalo en desarrollo como en el giro dentado adulto, la expresión disminuida de *Ascl1* resulta en un número reducido de progenitores o células madre en división (Andersen *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2011).

En base a esa observación, evaluamos la proliferación en la zona ventricular de animales mutantes *Ascl1* (Figura 30A) mediante la administración de BrdU a hembras preñadas 3hs antes de la disección de los embriones. La marcación en E11.5 (no mostrado) o en E13.5 (Figuras 30A-B) no arrojó diferencias en el número de células que incorporaron BrdU en la zona ventricular ventral. Adicionalmente, la organización dorso-ventral del neuroepitelio, reportada por la expresión del gen *Nkx6-1*, no se encontró afectada en los mutantes (Figuras 30A,C). Por último, cuantificamos la cantidad de progenitores en la zona ventricular ventral, identificados por la expresión de las proteínas *Nkx6-1* y *Sox9* (Figura 30D). No encontramos diferencias en la densidad de células progenitoras en los

mutantes *Ascl1* (Figura 30E). Esos experimentos indican que el número de progenitores disponibles al comienzo de la etapa gliogénica en los mutantes *Ascl1* no difiere del control, sin que se viera afectado por la perturbación en la especificación de las neuronas V2.



**Figura 30. *Ascl1* no controla la proliferación de los progenitores ventrales ni la organización del neuroepitelio.**

**A-C)** Secciones transversales de embriones E13.5 que recibieron BrdU 3hs antes de la preparación, teñidas contra BrdU y Nkx6-1. **B)** Células BrdU<sup>+</sup> por hemisección en la región ventral de la médula espinal (Nkx6-1<sup>+</sup>). No se detectaron diferencias entre los individuos *wild type* y *Ascl1*<sup>-/-</sup>. **C)** Región dorso-ventral del neuroepitelio que expresa Nkx6-1 (señalada con línea punteada en A). No se observaron diferencias en la organización de la zona ventricular *wild type* vs. *Ascl1* KO.

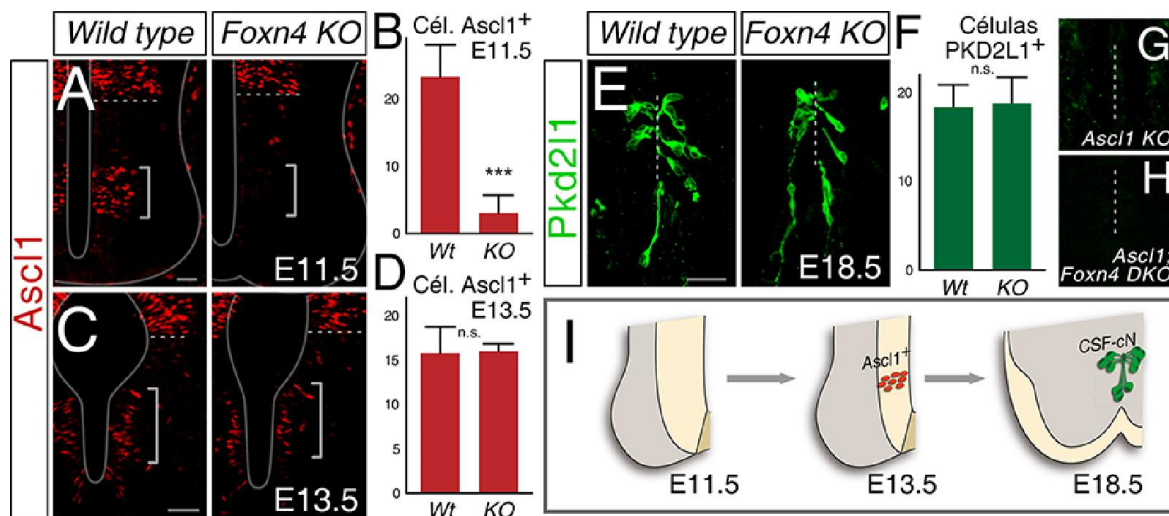
**D-E)** Magnificaciones de la zona ventricular Nkx6-1<sup>+</sup>. Se observó un número similar de progenitores entre genotipos. Cuantificación relativizada a 25µm de apertura ventricular. Barras media+DE (10-20 secciones cada uno). n.s. no significativo, prueba de Mann-Whitney. Barras de escala 50µm en A, 10 µm en D.

Los resultados indican que la proliferación de los progenitores espinales no depende de *Ascl1* y permiten concluir que la diferenciación alterada de las CSF-cN en los embriones *Ascl1*<sup>-/-</sup> no es consecuencia de acciones previas del factor de transcripción que conduzcan a defectos del neuroepitelio ventral.

Para demostrar de manera contundente que la actividad de *Ascl1* en estadios tardíos es la responsable de la ausencia de las CSF-cN en los mutantes *Ascl1*, diseñamos abordajes para eliminar de manera temporal selectiva la expresión de *Ascl1* (Figura 28). Realizamos dos experimentos genéticos complementarios en los cuales la función de *Ascl1* fue afectada solo temprana (E9.5-E12.5) o tardíamente (E12.5-E14.5).

La línea de ratones mutantes *Foxn4* resultó instrumental para analizar el requerimiento de *Ascl1*. *Foxn4* es un factor de transcripción que se expresa en el dominio de progenitores p2, donde regula la generación de las interneuronas V2a/b (Figura 10, Del Barrio *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004). En el laboratorio, demostramos que la diferenciación de las CSF-cN no depende de *Foxn4*, dado que el número de células que expresan

Pkd211 y su organización alrededor del canal central no se altera en la médula espinal de ratones *Foxn4* mutantes (Figuras 31E-F, Petracca *et al.*, 2016). Importantemente, en el contexto *Foxn4*<sup>-/-</sup>, la especificación de las CSF-cN sigue dependiendo de *Ascl1*, ya que los dobles mutantes *Ascl1*;*Foxn4* carecen de células Pkd211<sup>+</sup> en el canal central (Figuras 31G-H). En concordancia con un reporte previo, el neuroepitelio ventral *Foxn4*<sup>-/-</sup> en E11.5 carece de *Ascl1* (Li *et al.*, 2005), como mostramos mediante inmunohistoquímica (Figuras 31A-B). Sin embargo, llamativamente hallamos que la expresión de *Ascl1* en E13.5 se encuentra normalizada en la región ventral de la médula espinal (Figuras 31C-D).



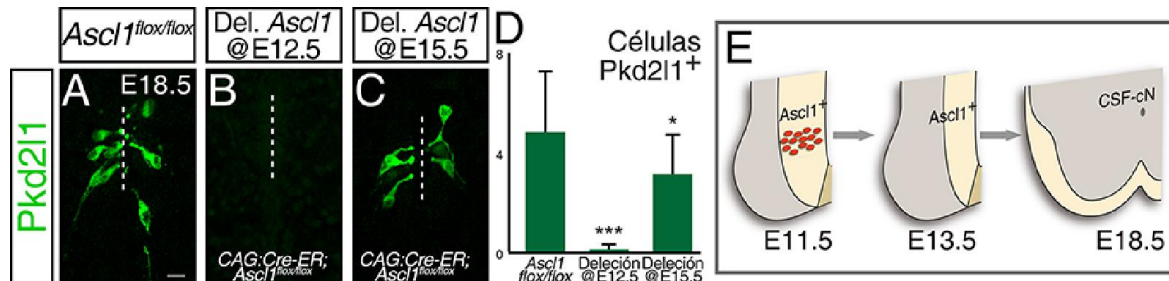
**Figura 31. El desarrollo de las CSF-cN no depende de la expresión temprana de *Ascl1*.**

**A-D)** Tinciones contra *Ascl1* en E11.5 (A-B) y E13.5 (C-D) en animales *wild type* y *Foxn4* mutantes. Los corchetes señalan el dominio de expresión ventral de *Ascl1*. Los embriones *Foxn4*<sup>-/-</sup> carecen de células *Ascl1*<sup>+</sup> en el tubo neural ventral E11.5 (A-B) pero la expresión está recuperada en E13.5 (C-D). La línea de puntos señala el límite del dominio dorsal de *Ascl1*. B, D) Células *Ascl1*<sup>+</sup> por hemisección.

**E-H)** Secciones de médula espinal E18.5 teñidas con un anticuerpo para Pkd211. No se observan diferencias en el número de CSF-cN Pkd211<sup>+</sup> detectadas en los animales *wild type* o *Foxn4*<sup>-/-</sup> (E-F, resultado ya publicado en Petracca *et al.*, 2016). La ausencia de CSF-cN en los animales doble mutantes *Ascl1*;*Foxn4* (H) indica que *Ascl1* es requerido para el desarrollo de las CSF-cN aún en ausencia de *Foxn4*. **I)** Esquema resumiendo las conclusiones del experimento. La expresión de *Ascl1* en E13.5, y no en estadios previos, es suficiente para generar CSF-cN correctamente. Barras media+DE. \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s. no significativo, prueba de Mann-Whitney. La línea de puntos en E-H señala el cc. Barras de escala 30  $\mu$ m.

Por lo tanto, los animales que carecen de *Ascl1* en los progenitores tempranos y expresan *Ascl1* normalmente en el período tardío, producen un número correcto de neuronas Pkd211<sup>+</sup> (Figura 31I). Es decir, la expresión temprana de *Ascl1* en la zona ventricular ventral no es requerida para el mantenimiento de los progenitores de las CSF-cN, ni para la especificación de esa clase neuronal.

A continuación, abordamos la misma pregunta mediante el experimento complementario de delección tardía de *Ascl1*, en el momento en que los progenitores de las CSF-cN se encuentran en proliferación y comienzan su diferenciación.



**Figura 32. La especificación de las CSF-cN depende de la expresión de *Ascl1* en los progenitores tardíos.**

**A-C)** Eliminación de la expresión de *Ascl1* en progenitores tardíos. Secciones transversales de médula espinal E18.5 de embriones *Ascl1*<sup>flx/flx</sup> y embriones *CAG:CreER;Ascl1*<sup>flx/flx</sup> que recibieron tamoxifeno en E12.5 o E15.5, eliminando *Ascl1*. Las secciones fueron teñidas con un anticuerpo anti-Pkd2l1 para detectar CSF-cN. Los animales *Ascl1*<sup>flx/flx</sup> son hipomorfos por lo que presentan menos CSF-cN que los *wild type* (A). No se observaron CSF-cN en los embriones que recibieron tamoxifeno en E12.5 (B). Los animales en los que se administró tamoxifeno más tardíamente (E15.5) presentaron un número solo ligeramente menor de células Pkd2l1<sup>+</sup> (C), indicando que el efecto observado con la delección en E12.5 es específico. **D)** Esquema mostrando que la ausencia de *Ascl1* en estadios embrionarios tardíos (a partir de E12.5) y no antes, es suficiente para que no se generen CSF-cN. Barras media+DE (60-90 secciones, 4-7 embriones por genotipo y tratamiento). \*\*\* p<0.001, \* p<0.05 comparado con el control *Ascl1*<sup>flx/flx</sup>, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 10 µm.

Para eso, generamos ratones mutantes condicionales *CAG:CreER;Ascl1*<sup>flx/flx</sup> (Figura 10), en los que la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno (CreER), de expresión ubicua, es retenida en el citoplasma hasta la administración del ligando estrogénico en E12.5. Luego de su aplicación, la CreER trasloca al núcleo y elimina la región codificante de *Ascl1*. De esa manera, generamos mutantes de manera controlada en el tiempo. Administramos 6 mg de tamoxifeno i.p. a hembras preñadas E12.5 de manera de garantizar que la expresión de *Ascl1* haya sido interrumpida para E13.5. Cuando eliminamos *Ascl1* en ese estadio, encontramos que el número de células Pkd2l1<sup>+</sup> (CSF-cN) en E18.5 se redujo significativamente en comparación con los controles *Ascl1*<sup>flx/flx</sup> (Figuras 32A-B,D). Aun cuando los animales *Ascl1*<sup>flx/flx</sup> presentan un menor número de CSF-cN respecto de animales *wild type* (Figura 26), en los *CAG:CreER;Ascl1*<sup>flx/flx</sup> (inducidos con tamoxifeno) encontramos la ausencia casi completa de células Pkd2l1<sup>+</sup>, fenotipo reminiscente de los *knock out*. De esa forma, demostramos que la expresión de *Ascl1* específicamente en la etapa gliogénica/tardía (~E13.5) es responsable del correcto desarrollo de las CSF-cN (Figura 32E).

Realizamos también una delección más tardía, mediante la administración de tamoxifeno en E15.5. En esa condición, el número de CSF-cN encontradas en E18.5 disminuyó solo levemente (Figura 32C-D). Ese resultado refuerza la conclusión de que *Ascl1* inicia la diferenciación de las CSF-cN y su actividad parece ser dispensable una vez que dicho proceso ha comenzado. La reducción, aunque menor, observada cuando eliminamos *Ascl1* en E15.5, puede deberse a que la génesis de las CSF-cN se expande normalmente hasta E16.5-E17 (Petracca *et al.*, 2016) por lo que la última cohorte se vería afectada en esa situación.

En su conjunto, los resultados indican que *Ascl1* no cumple funciones en la zona ventricular temprana que sean relevantes para la especificación de las CSF-cN. Esos resultados también sugieren que la expresión de *Ascl1* está regulada de manera diferente en las etapas neurogénica, y gliogénica del tubo neural. Temprano en la fase neurogénica, *Ascl1* depende de *Foxn4* para su expresión, mientras que eso no ocurre tardíamente. Especulamos además que la expresión de *Ascl1* en E13.5 en los progenitores de las CSF-cN no es una extensión de la expresión temprana del factor de transcripción, sino un elemento nuevo en las redes transcripcionales que regulan los destinos celulares de progenitores tardíos.

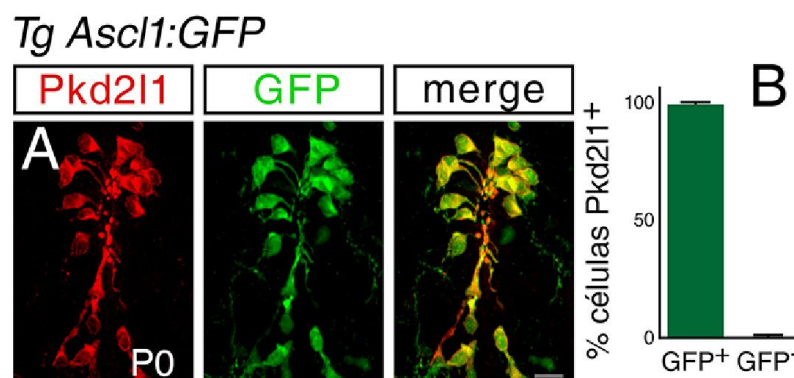
Por último, nuestros experimentos refuerzan la idea de que *Ascl1* está asociado al control de la diferenciación de las CSF-cN en la etapa gliogénica, característica de amniotas. El requerimiento de *Ascl1* en esa etapa avanzada del desarrollo y no más temprano, junto con la ausencia de fenotipo en los mutantes *ascl1* de pez cebra, sugieren que la inclusión de *Ascl1* en la red transcripcional de la diferenciación de las CSF-cN coincide con el desplazamiento temporal en el desarrollo de esas neuronas. No obstante, no podemos asegurar que exista una relación causal entre ese desplazamiento y la actividad de *Ascl1*.

### ***Ascl1* controla la diferenciación de las CSF-cN de manera autónoma de célula**

Los resultados hasta aquí presentados indican que *Ascl1* se expresa en progenitores ventrales tardíos que son luego capaces de producir neuronas del canal central. Sin embargo, como fue establecido en la primera parte de los Resultados, aun no podemos

garantizar que todas las CSF-cN se generen a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> (Figuras 18-21). Asimismo, aunque es sugerido, tampoco se asegura que el factor de transcripción actúe en los progenitores de forma autónoma de célula para instruir su diferenciación en CSF-cN.

La autonomía celular es un componente importante en el estudio del control transcripcional de procesos de diferenciación celular. Un mecanismo es autónomo de célula cuando la proteína en estudio actúa en aquellas células cuyo destino regula. Ejemplos clásicos de eventos no autónomos de célula durante el desarrollo embrionario incluyen mecanismos de comunicación intercelular, como la vía de señalización de Notch (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Dado que *Ascl1* puede ser un efector del sistema Notch-Delta (Guillemot, 2007; Imayoshi *et al.*, 2014), decidimos realizar experimentos tendientes a evaluar si *Ascl1* instruye la diferenciación de las CSF-cN de manera autónoma de célula. La coexpresión entre *Ascl1* y marcadores del linaje CSF-cN (Figuras 18-21), junto con la correlación entre el número de células *Ascl1*<sup>+</sup> en E13.5 y la cantidad de CSF-cN generadas (Figura 26), sugieren que *Ascl1* se expresa en los progenitores de esas neuronas y que actúa en esas mismas células.

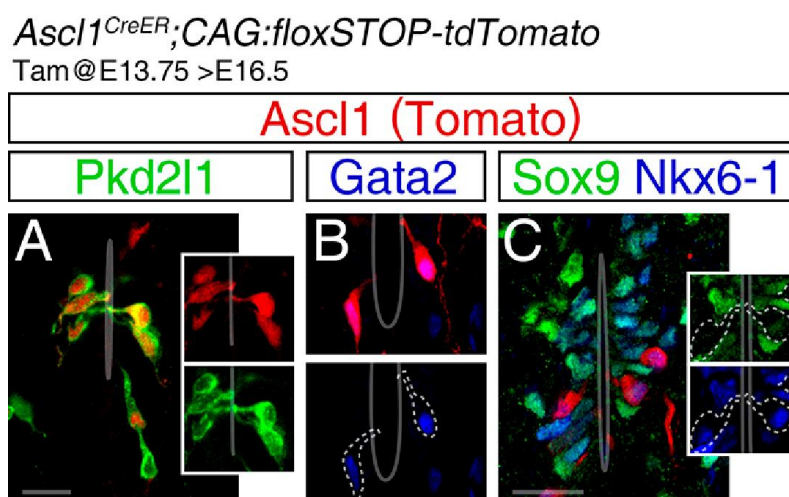


**Figura 33. *Ascl1* se expresa en todo el linaje de las CSF-cN.**

**A-B)** Experimento de seguimiento de linaje de corto alcance realizado con la línea transgénica *Ascl1:GFP*. Secciones de médula espinal perinatal teñida contra Pkd2l1 y GFP (A). El 100% de las CSF-cN es GFP<sup>+</sup> indicando que expresó *Ascl1* en algún momento de su historia (B, 337/337 células analizadas). Barras media+DE. Barras de escala 20  $\mu$ m.

Para determinar con mayor precisión la expresión de *Ascl1* en los progenitores de las CSF-cN, realizamos dos abordajes genéticos de seguimiento de linaje. En primer lugar, utilizamos los animales transgénicos *Ascl1:GFP* (Figura 10), en los que la proteína fluorescente se encuentra bajo elementos regulatorios del gen *Ascl1* contenidos en un BAC (cromosoma artificial de bacteria). La vida media más extendida de GFP, en comparación con la del factor de transcripción, posibilita el seguimiento a mediano plazo

de las células que expresaron *Ascl1*. Si bien esa línea ha sido ampliamente usada en el pasado (MGI ID: 3845062), al tratarse de una línea transgénica no se garantiza la inclusión de todos los elementos regulatorios y, consecuentemente, la recapitulación de la expresión de *Ascl1*. Por otro lado, la durabilidad variable de GFP en esa línea no provee información sobre el momento en que esas células expresaron *Ascl1*. Teniendo en cuenta esas limitaciones, obtuvimos embriones portando el transgen y evaluamos la colocalización entre GFP y *Pkd2l1*, marcador selectivo de las CSF-cN. Tanto en E16.5 (no mostrado) como en animales postnatales (P0) encontramos que todas las células *Pkd2l1*<sup>+</sup> del cordón espinal fueron positivas para GFP, señalando que *Ascl1* se expresa en el linaje completo de las CSF-cN (Figuras 33A-B).



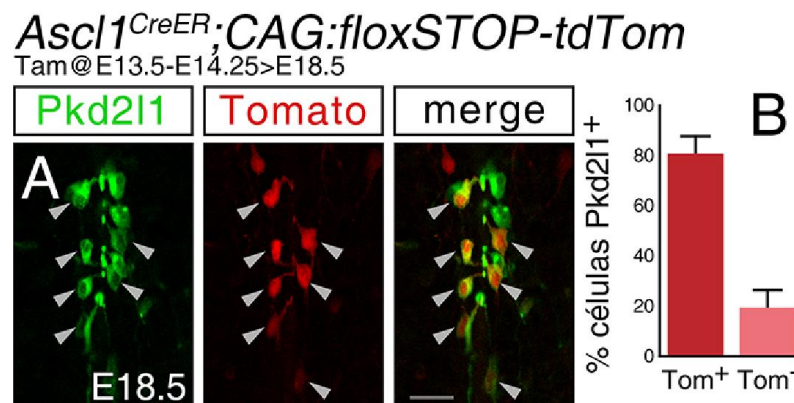
**Figura 34. Progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> en E13.75 generan CSF-cN.**

Secciones transversales de médula espinal E16.5 *Ascl1*<sup>CreER</sup>; *CAG:floxSTOP-tdTomato* en las que se indujo la recombinación en E13.75 (3mg i.p. de Tam/hembra preñada). **A)** Detección de Tomato por fluorescencia directa (sin anticuerpo) junto con inmunohistoquímica para *Pkd2l1*. Los progenitores marcados se diferencian en CSF-cN. **B)** Tinción contra Tomato y *Gata2* muestra que las células Tomato<sup>+</sup> también expresan *Gata2*, confirmando su identidad como CSF-cN. **C)** Tinción con anticuerpos contra Tomato, *Nkx6-1* y *Sox9*. Se detectan células Tomato<sup>+</sup> alrededor del canal central con la morfología característica de las CSF-cN. Las células Tomato<sup>+</sup> derivadas de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> retienen la expresión de *Nkx6-1* y silencian *Sox9*. Barras de escala 20 μm.

Posteriormente, una vez que obtuvimos la línea de ratones *Ascl1*<sup>CreER</sup>, realizamos experimentos de seguimiento de linaje utilizándolos en combinación con los reporteros condicionales *CAG:floxSTOP-tdTomato*. La línea *Ascl1*<sup>CreER</sup> es una construcción *knock in* por lo que la expresión de la recombinasa reproduce fielmente la del factor de transcripción (Figura 19A, Kim *et al.*, 2011). La marcación con la proteína fluorescente depende de la expresión de la recombinasa y de la administración de tamoxifeno, lo que permite además una selección temporal de la progenie de las células *Ascl1*<sup>+</sup>.

Administramos una única dosis de tamoxifeno en E13.75 y evaluamos la colocalización con Pkd2l1 en E16.5. Encontramos que el porcentaje de CSF-cN marcadas con Tomato es del  $66\pm 20\%$  (Figura 34A), lo cual indica que progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> en E13.75 producen las neuronas Pkd2l1<sup>+</sup>.

Confirmamos que las células Tomato<sup>+</sup> en la proximidad del canal central son CSF-cN evaluando otras características de ese grupo de neuronas. Además de expresar Pkd2l1, observamos que las células Tomato<sup>+</sup> expresan el factor de transcripción Gata2 (Figura 34B) y mantienen elevados niveles de Nkx6-1 (Figura 34C), en consistencia con el análisis en E14.5 mostrado en la sección anterior (Figura 19). A diferencia de lo que ocurre con el resto de las células alrededor del canal central, las células Tomato<sup>+</sup> derivadas de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> son negativas para Sox9, ausente en las CSF-cN (Figura 34C). Es también importante indicar que la mayoría de las células Tomato<sup>+</sup> alrededor del canal central son neuronas Pkd2l1<sup>+</sup>. Eso implica que los progenitores que expresan *Ascl1* en E13.75 se diferencian preferentemente en neuronas del canal central ( $86\pm 20\%$  en promedio, entre  $74\pm 12\%$  y  $94\pm 9\%$ , según el experimento).



**Figura 35. Las CSF-cN se diferencian a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> tardíos.**

**A-B)** Seguimiento de linaje inducible en embriones *Ascl1*<sup>CreER</sup>;*CAG:floxSTOP-tdTomato*, inducidos con tamoxifeno entre E13.5 y E14.25 (3 inyecciones). El  $81\pm 7\%$  de las células Pkd2l1<sup>+</sup> fue Tomato<sup>+</sup> (D, 49/61 células analizadas) demostrando no solo que *Ascl1* se expresa en el linaje de las CSF-cN sino también que lo hace en el estadio progenitor, alrededor de E13.5. Barras media+DE. Barras de escala 20  $\mu$ m.

Con el objetivo de marcar una mayor proporción de CSF-cN, administramos un total de 6 mg de tamoxifeno distribuido en 3 dosis a hembras preñadas entre los estadios E13.5 y E14.25 y analizamos la colocalización en E18.5. Con ese protocolo, encontramos que el  $81\pm 7\%$  de las CSF-cN analizadas son Tomato<sup>+</sup> (Figuras 35A-B). El uso de esa línea en otros experimentos realizados en el laboratorio o por colaboradores sugiere que la expresión de Tomato marca fielmente las células que expresan *Ascl1* en el momento de

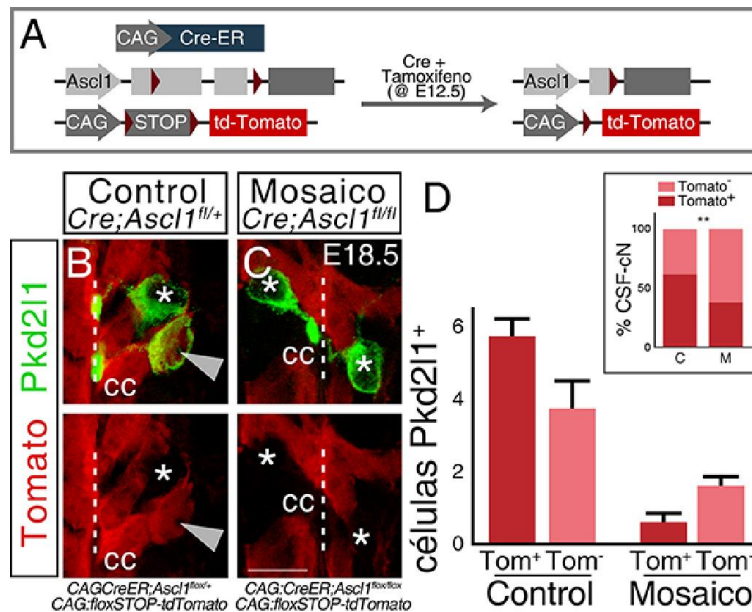
la administración de tamoxifeno con una ventana temporal muy restringida (Carcagno *et al.*, 2014; Temprana *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Consideramos que el 19% de CSF-cN negativas para Tomato es debido a la marcación aguda con la herramienta y a la generación asincrónica de las CSF-cN (Petracca *et al.*, 2016). En resumen, estos experimentos de mapeo de destino celular confirman de manera inequívoca que las CSF-cN se generan a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> en E13.5-E14.25, como fue propuesto en la primera sección de estos Resultados.

Los experimentos de seguimiento de linaje junto con la pérdida de función de *Ascl1* sugieren fuertemente que *Ascl1* está actuando en las mismas CSF-cN, es decir que su función es autónoma de célula. Sin embargo, el experimento por excelencia para demostrar autonomía celular incluye la utilización de animales mosaico en los que solo algunas células carecen de la expresión de *Ascl1* inmersas en un entorno *wild type*.

Con ese objetivo, produjimos animales *CAG:CreER;Ascl1<sup>flox</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato* (Figura 36A). En esos animales la delección de *Ascl1*, dirigida por la expresión de CreER bajo el promotor CAG, depende de la administración de tamoxifeno y de la dosis utilizada. Con dosis bajas de la droga, es posible eliminar *Ascl1* solo de algunas células, generando un mosaico. La inclusión del alelo reportero *CAG:floxSTOP-tdTomato* tuvo el objetivo de identificar a las células en las que fue activada la recombinasa. El experimento se realizó inyectando 0.1mg de tamoxifeno a hembras preñadas E12.5 de manera de asegurar la ausencia de *Ascl1* para el estadio E13.5. Analizamos la proporción de células *Pkd2l1*<sup>+</sup> marcadas con la proteína fluorescente en E18.5.

Los animales control fueron del genotipo *CAG:CreER;Ascl1<sup>flox/+</sup>* donde eliminamos un único alelo de *Ascl1*. En esos animales, aproximadamente el 60% de las CSF-cN fueron positivas para Tomato (Figuras 36B,D). La relación entre células marcadas y no marcadas fue de 1,45. De manera opuesta, los animales experimentales *CAG:CreER;Ascl1<sup>flox/flox</sup>* presentaron un menor número de células *Pkd2l1*<sup>+</sup> marcadas, con una relación inversa de células marcadas/células no marcadas (0,54, Figuras 36C-D). Sin embargo, en los animales mosaico, aún es posible detectar algunas pocas células *Pkd2l1*<sup>+</sup>,*Tomato*<sup>+</sup>, atribuibles a la recombinación diferencial de los tres alelos presentes (dos alelos *Ascl1<sup>flox</sup>* y alelo reportero), sobre todo teniendo en cuenta que el alelo reportero utilizado es muy recombinogénico. La distribución de células *Tomato*<sup>+</sup> y *Tomato*<sup>-</sup> entre animales control y mosaico resultó significativamente diferente ( $p=0.0075$ , prueba exacta de Fisher, recuadro en Figura 36D). Eso indica que en los animales

mutantes mosaico el número de células  $Pkd2l1^{+};Tomato^{+}$ , que son aquellas que presumiblemente han eliminado *Ascl1*, están selectivamente reducidas (Figuras 36B-D). El análisis del mosaico sugiere que *Ascl1* regula la diferenciación de las CSF-cN de manera autónoma de célula.



**Figura 36. *Ascl1* controla la diferenciación de las CSF-cN de manera autónoma de célula.**

**A)** Estrategia utilizada para generar animales mosaico *Ascl1*, en los que *Ascl1* fue eliminado solo en algunas células. Animales *CAG:CreER; CAG:loxSTOP-tdTomato; Ascl1<sup>fl/+</sup>* (control) o *Ascl1<sup>fl/fl</sup>* (mosaico) recibieron 0.1mg de tamoxifeno por hembra preñada en E12.5. De esa manera en algunas células se recombinó *Ascl1* y el STOP en la línea reportera, eliminando la expresión de la proteína proneural

y activando la de Tomato. **B-C)** Detección de la fluorescencia de Tomato directamente junto con un anticuerpo para *Pkd2l1* en E18.5. En ambos genotipos se observan múltiples células marcadas con Tomato. En el control (B) se observa una CSF-cN  $Pkd2l1^{+},Tomato^{+}$  (punta de flecha) y otra CSF-cN  $Pkd2l1^{+},Tomato^{-}$  (asterisco). Se marcan de esa forma el  $61 \pm 15\%$  de las CSF-cN (D). En C se muestran dos CSF-cN  $Pkd2l1^{+},Tomato^{-}$  (asteriscos). La relación entre células marcadas y no marcadas se invierte, con una menor proporción de CSF-cN  $Tomato^{+}$  (D). **D)** Número de células  $Pkd2l1^{+}$  marcadas con Tomato. El inserto muestra las proporciones de células marcadas en cada caso. Barras media+DE. La línea de puntos señala el canal central (cc). \*\*  $p < 0.01$  prueba exacta de Fisher. Barras de escala  $10 \mu m$ .

En resumen, los experimentos presentados en esta sección indican que *Ascl1* se expresa en los progenitores que generan las CSF-cN y que su acción en esos progenitores es necesaria para la especificación de la población, lo cual sugiere que *Ascl1* actúa de manera autónoma de célula.

### ***Ascl1* confiere potencial neurogénico a progenitores espinales tardíos**

Las CSF-cN se generan a partir del neuroepitelio ventral en estadios asociados a la producción de oligodendrocitos, astrocitos y endotelios. Para la adecuada inducción del proceso neurogénico son precisos mecanismos que simultáneamente eviten la

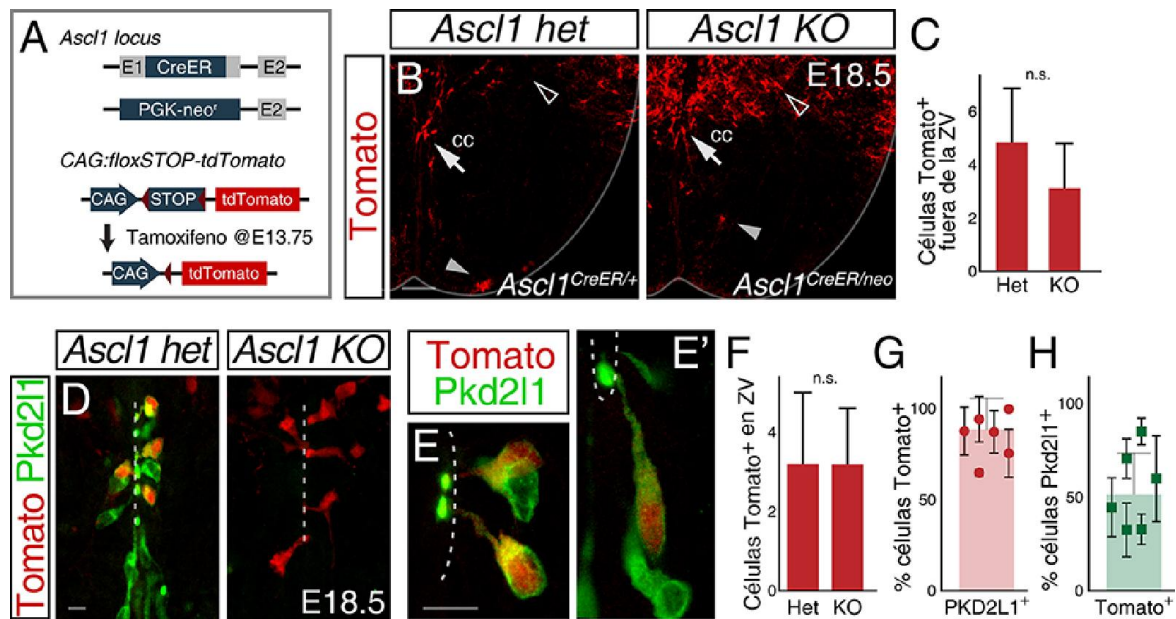
adquisición de características de los otros tipos celulares. Decidimos evaluar cuál es la identidad que los progenitores prospectivos de las CSF-cN adquieren cuando *Ascl1* no está presente.

Diseñamos una estrategia de marcación que permitiera seguir el destino de los progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>, tanto en un contexto control como mutante. Con ese objetivo usamos la línea *Ascl1*<sup>CreER</sup>, en combinación con el reportero condicional *CAG:floxSTOP-tdTomato* para marcar de manera indeleble la progenie de células *Ascl1*<sup>+</sup> (Figura 37A). Para lograr el fondo mutante usamos además el alelo nulo *Ascl1*<sup>Neo</sup>, lo que permitió obtener animales control *Ascl1*<sup>CreER/+</sup> y mutantes *Ascl1*<sup>CreER/-</sup>. Elegimos una dosis de tamoxifeno (3mg/hembra preñada en E13.75) de manera de marcar solo algunas células, condición que permite inspeccionarlas detalladamente en E18.5.

Esa estrategia de marcación resulta en un porcentaje variable de células *Pkd2l1*<sup>+</sup> marcadas en los animales control (entre 32-85%, Figuras 37D,H). Es probable que esa variabilidad se deba a la heterogeneidad en el grado de desarrollo de los embriones dentro de una misma camada y entre camadas, y a que la diferenciación de las CSF-cN no está perfectamente sincronizada, como lo indica la aparición incremental de las mismas (Petracca *et al.*, 2016).

La mayoría de las células *Tomato*<sup>+</sup> ventrales alrededor del canal central corresponden, en los animales heterocigotas control, a CSF-cN con escasa marcación de células negativas para *Pkd2l1* (74-100% según el experimento, Figuras 37D,G), como fue mostrado más arriba (Figura 34A).

Además de en las CSF-cN, encontramos abundante marca en astrocitos dorsales y en escaso número de células ventrales fuera de la región del epéndima, cuya morfología sugiere identidad astrocítica (Figuras 37B-C, puntas de flecha llenas). En los mutantes *Ascl1*<sup>CreER/-</sup>, las células *Tomato*<sup>+</sup> dorsales sufren un cambio importante, alcanzando números mucho más altos (Figura 37B, punta de flecha vacía, Vue *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante remarcar que no se encontraron cambios en la cantidad de las células *Tomato*<sup>+</sup> en la región del epéndima o lámina X (Figuras 37B, flechas, D,F), o por fuera de ella en la médula espinal ventral (Figuras 37B, puntas de flecha llenas, C), lo que sugiere que los progenitores prospectivos de las CSF-cN generan células que permanecen alrededor del canal central tanto en presencia como en ausencia de *Ascl1*. A continuación presentamos su análisis y caracterización.



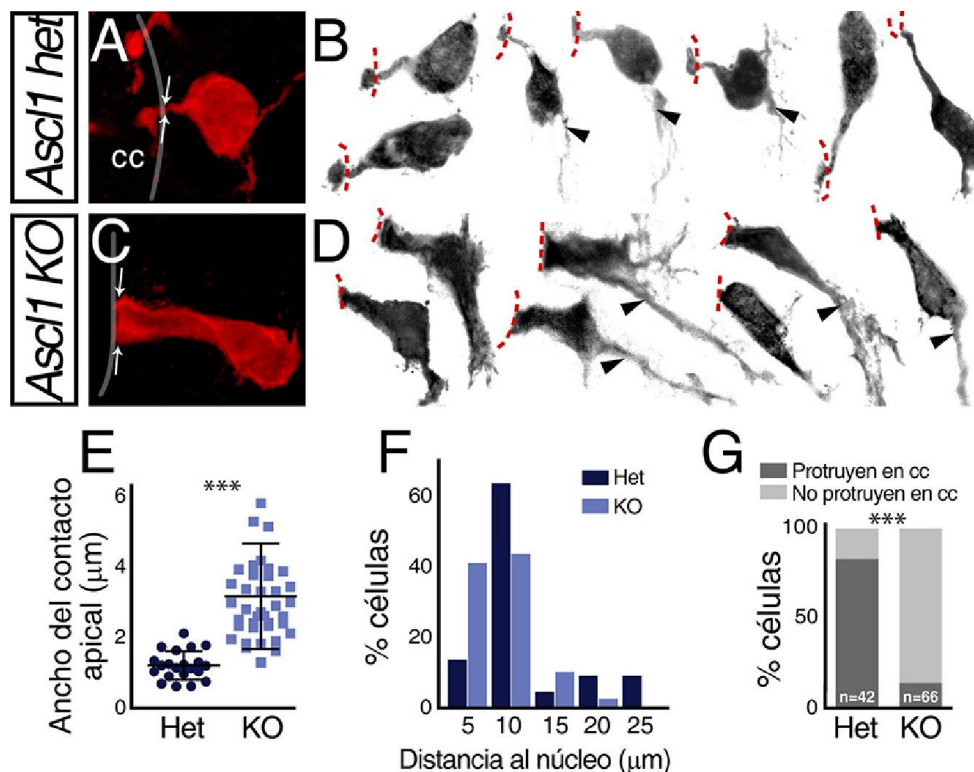
**Figura 37. En ausencia de *Ascl1* los progenitores prospectivos de las CSF-cN permanecen alrededor del canal central.**

**A)** Estrategia de marcación y seguimiento de los progenitores de las CSF-cN. La línea *Ascl1*<sup>CreER</sup> dirige la recombinación del alelo reportero *CAG:loxSTOP-tdTomato* en las células *Ascl1*<sup>+</sup>. La recombinación ocurre ante la administración de tamoxifeno en E13.75. Para generar mutantes se utilizó además el alelo *Ascl1*<sup>Neo</sup>, obteniendo animales *Ascl1*<sup>CreER/+</sup> (heterocigotas control) o *Ascl1*<sup>CreER/-</sup> (*knock out*).

**B-C)** Secciones transversales de médula espinal E18.5 heterocigota o *KO* teñidas contra Tomato. En los control, las células derivadas de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> generan astrocitos dorsales (punta de flecha vacía), CSF-cN alrededor del canal central (cc, flecha) y escasos astrocitos ventrales (punta de flecha llena). En ausencia de *Ascl1*, se generan más células dorsales (punta de flecha vacía). El número de células Tomato<sup>+</sup> ventrales fuera de la zona ventricular (ZV) no cambia (C, células por hemisección ventral). **D-H)** Región del cc heterocigota o mutante teñida contra Tomato y *Pkd2l1*. En ausencia de *Ascl1* se detecta un número similar de células Tomato<sup>+</sup> alrededor del cc (D,F). En animales control, la proteína Tomato se expresa selectivamente en CSF-cN alrededor del cc (G), tanto en CSF-cN' (E) como CSF-cN'' (E'). G) Porcentaje de células Tomato<sup>+</sup> por sección expresando *Pkd2l1*, alrededor del cc de animales heterocigotas. H) Porcentaje de CSF-cN expresando Tomato en embriones control. La marcación es variable entre experimentos (32±14% al 77±15%). En sombreado se presenta la media+DE de varios embriones. Los puntos son media+DE de experimentos diferentes. n.s. no significativo, prueba de Mann-Whitney (10-20 secciones, 3-6 embriones). Barras media+DE. Barras de escala 50 µm (B) y 10 µm (D,E).

En primer lugar, examinamos la morfología de las células Tomato<sup>+</sup> alrededor del canal central en animales heterocigotas (control) y mutantes. En los heterocigotas, las células Tomato<sup>+</sup> presentan una morfología que claramente se corresponde con las CSF-cN (Figuras 38A-B). En los ejemplos de la figura 38B se aprecia que, si bien la morfología de las células puede ser algo variable, presentan características comunes, como el soma redondeado, el proceso delgado que se extiende hacia el canal central y el botón terminal que protruye dentro del lumen, en contacto con el fluido cerebroespinal (Figuras 38A-B,E-

G). Además, detectamos células tanto de localización lateral como ventrales al canal central (ejemplo de la derecha y Figura 37E'), en semejanza con las CSF-cN' y CSF-cN''.



**Figura 38. Los progenitores prospectivos de las CSF-cN adquieren una morfología diferente en ausencia de Ascl1.**

Experimento de seguimiento de linaje en ausencia de *Ascl1* (ver Figura 37A).

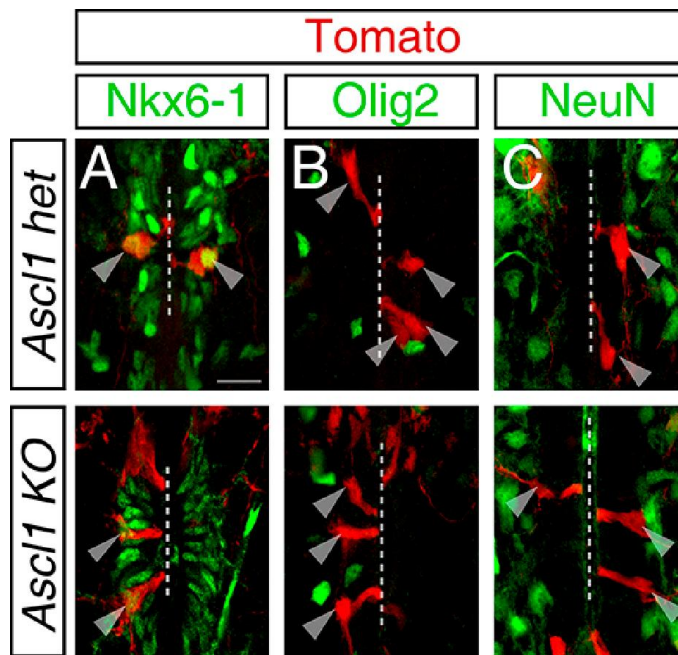
**A-D)** Ejemplos de las morfologías celulares encontradas en animales control (*Ascl1<sup>CreER/+</sup>; CAG:floxSTOP-tdTomato*, A-B) y mutantes (*Ascl1<sup>CreER/-</sup>; CAG:floxSTOP-tdTomato*, C-D). En A,C se muestran tinciones con anticuerpo anti-Tomato. En B,D tinciones similares fueron invertidas en Adobe Photoshop y ordenadas para facilitar su observación. En todos los casos el canal central (cc) se encuentra a la izquierda (línea gris en A,C; línea punteada color rojo en B,D). En los animales control las células Tomato<sup>+</sup> presentan la morfología típica de las CSF-cN (A-B), con un proceso delgado (flechas en A) hacia el cc, que termina en un ensanchamiento que invade la cavidad. Se aprecian procesos axonales delgados extendiéndose en sentido contrario (puntas de flecha en B). En los mutantes, la morfología es más heterogénea (C-D), con un contacto ancho con la superficie del cc (flechas en C) que no protruye dentro del mismo. Los procesos que extienden las células desde su cara basal están más extensamente ramificados y son de mayor calibre. **E-G)** Parámetros morfológicos evaluados. E) Ancho del contacto con la superficie del cc, medido como se indica con las flechas en A,C. Las células Tomato<sup>+</sup> mutantes presentaron un contacto significativamente más ancho. Las líneas son media±DE. \*\*\* p<0.0001, prueba de Mann-Whitney (20-40 células cada uno). F) Distancia del núcleo al borde del cc. El histograma muestra la distribución de las distancias. En el mutante las células Tomato<sup>+</sup> ocupan posiciones más cercanas al cc, no ocupadas por las células Tomato<sup>+</sup> heterocigotas (20-40 células cada genotipo). G) Porcentaje de células Tomato<sup>+</sup> que protruyen dentro del cc. \*\*\* p<0.001, prueba exacta de Fisher (20-40 células, 2-3 embriones cada uno).

Como se puede apreciar en los ejemplos presentados en las figuras 38C y D, en los animales mutantes, las células Tomato<sup>+</sup> presentan morfologías más heterogéneas. El contacto apical con la superficie ventricular aparece ancho, y, en la mayoría de los casos,

formando parte de la pared ventricular (Figuras 38C-D, línea gris y línea discontinua roja respectivamente). La medición del ancho del contacto con la superficie ventricular, realizada a la altura de la pared del canal central como indican las flechas en las figuras 38A y C, indicó que en los animales mutantes, el contacto apical con el canal central es significativamente más ancho que en los animales control (Figura 38E). Adicionalmente, la posición del núcleo (soma) también es variable, con una mayor proporción de células (~40%) ubicadas inmediatamente adyacentes al canal (ver distribución de distancias en Figura 38F; hay más células Tomato<sup>+</sup> a distancias menores a 5µm en los mutantes que en los animales control). Finalmente, las células Tomato<sup>+</sup> mutantes rara vez presentan una protrusión dentro del canal central. Mientras que en el 83% de las células control fue posible observar claramente el proceso invadiendo el canal central, solo el 14% de las células Tomato<sup>+</sup> mutantes mostraron algún proceso celular detectable dentro del lumen (Figura 38G).

El conjunto de características morfológicas de las células Tomato<sup>+</sup> alrededor del canal central en el mutante, es propio de endimocitos. Los endimocitos que recubren el canal central constituyen un epitelio cúbico ciliado que separa al SNC del CSF. Defectos en la movilidad de las cilias tienen consecuencias sobre la circulación del fluido, asociadas a hidrocefalia. Además, se ha propuesto que detoxifican el SNC filtrando moléculas hacia el CSF, lo aíslan de sustancias nocivas y contribuyen a la dispersión de mensajeros (Del Bigio, 1995; Spassky *et al.*, 2005). Por otro lado, los endimocitos son capaces de regenerarse y, ante una lesión, pueden proliferar y contribuir con células gliales (Meletis *et al.*, 2008; Sabelstrom *et al.*, 2013; Sabourin *et al.*, 2009). Entremezclados con los endimocitos existen también otras células, los tanicitos, cuyo extremo apical está en contacto con vasos sanguíneos (Meletis *et al.*, 2008). Molecularmente, los endimocitos se caracterizan por expresar los factores de transcripción Sox2/9, y Foxj1, asociado a la ciliogénesis (Alfaro-Cervello *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2003; Meletis *et al.*, 2008), y los marcadores de superficie CD24 y CD133 (Prominin 1), la proteína de unión a Ca<sup>2+</sup> S100β y el filamento intermedio Vimentina (Alfaro-Cervello *et al.*, 2012; Del Bigio, 1995; Meletis *et al.*, 2008).

Para evaluar mejor la hipótesis de que en ausencia de *Ascl1* los progenitores prospectivos de las CSF-cN se convierten en endimocitos, analizamos la expresión de varios marcadores celulares y también determinamos sus propiedades fisiológicas.



**Figura 39. En ausencia de *Ascl1*, los progenitores de las CSF-cN no se convierten en neuronas ni oligodendrocitos.**

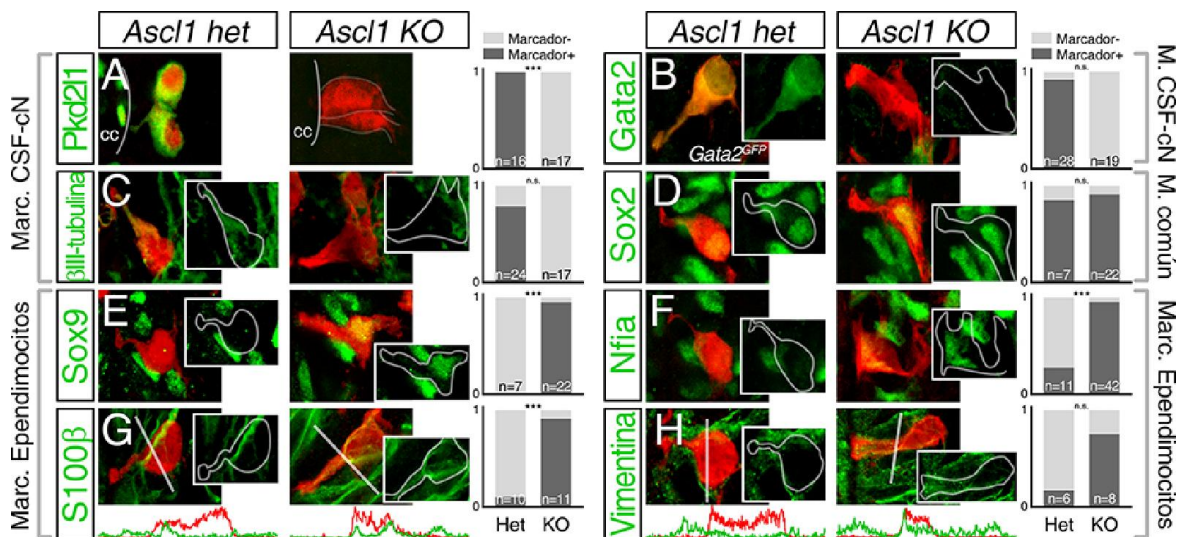
**A-C)** Tinciones sobre secciones E18.5 de los experimentos de seguimiento de linaje de los progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>. Los animales heterocigotas son los controles *Ascl1*<sup>CreER/+</sup>; *CAG:loxSTOP-tdTomato* y los mutantes son del genotipo *Ascl1*<sup>CreER/-</sup>; *CAG:loxSTOP-tdTomato* (ver Figura 37A). Se usaron anticuerpos contra Tomato y Nkx6-1 (A), Olig2 (B) y NeuN (C). En los animales control *Ascl1*<sup>+/+</sup> las células Tomato<sup>+</sup> son NeuN<sup>+</sup>, Olig2<sup>+</sup> y expresan altos niveles de Nkx6-1

(A-C, puntas de flecha), consistente con la caracterización de las CSF-cN. En los mutantes, las células marcadas no expresan NeuN ni Olig2 (A-B, puntas de flecha), indicando que no adquieren identidades neuronales ni oligodendrocíticas, y mantienen la expresión de Nkx6-1, al igual que el resto del epéndima (C, puntas de flecha). La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 20 μm.

En primer lugar, tanto en los animales control *Ascl1*<sup>CreER/+</sup>, como en los mutantes, se encontramos que todas las células Tomato<sup>+</sup> expresan Nkx6-1. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los heterocigotas, en los mutantes los niveles son homogéneos y no observamos células con expresión intensa de Nkx6-1, una característica de las CSF-cN (Figuras 39A y 34C). Adicionalmente, en ninguno de los dos casos (heterocigotas y mutantes) observamos células Tomato<sup>+</sup> que expresen NeuN ni Olig2, lo cual señala que las células no se diferencian en otros tipos neuronales ni en oligodendrocitos aún en ausencia de *Ascl1* (Figuras 39B-C). La ausencia de colocalización entre Tomato y NeuN en los animales control se debe a que las CSF-cN son un tipo neuronal con características inmaduras que, aún en los adultos, son negativas o expresan niveles muy bajos de la proteína nuclear NeuN (Kutna *et al.*, 2014; Marichal *et al.*, 2009; Orts-Del'Immagine *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016).

En la médula espinal E18.5 de animales *Ascl1*<sup>CreER/+</sup>, todas las células Tomato<sup>+</sup> que, como fue explicado más arriba, presentan la morfología característica de las CSF-cN expresan el canal iónico Pkd211 y el factor de transcripción Gata2 (Figuras 40A-B, alelo *Gata2*<sup>GFP</sup>). Los procesos delgados que terminan en contacto con el CSF son positivos para βIII-tubulina (Figuras 40C, 20B). Además, expresan el factor de transcripción Sox2

(Figura 40D), y son negativas para los factores de transcripción Sox9 y Nfia, ambos marcadores de glía radial, epéndimocitos y astrocitos (Figuras 40E-F, Kang *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2010; Stolt *et al.*, 2003) Tampoco expresan los marcadores endimarios S100 $\beta$  ni Vimentina (Figuras 40G-H). Esta colección de marcadores es característica de las CSF-cN y fortalece una vez más nuestra propuesta de que los progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> en E13.5 se diferencian en las neuronas del canal central.



**Figura 40. Las células derivadas de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> expresan marcadores de endimocitos en ausencia de *Ascl1*.**

Tinciones representativas de células derivadas de progenitores *Ascl1* en la médula espinal E18.5 de animales control heterocigotas (*Ascl1*<sup>CreER/+</sup>; *CAG:loxSTOP-tdTomato*) o mutantes (*Ascl1*<sup>CreER/-</sup>; *CAG:loxSTOP-tdTomato*), en los que se indujo la recombinación en E13.75. **A-C)** Inmunohistoquímicas contra Tomato y marcadores de las CSF-cN: Pkd21l1 (A), GFP (animales con el alelo *Gata2*<sup>GFP</sup>), y  $\beta$ III-tubulina (C). Las células Tomato<sup>+</sup> del heterocigota expresan esos marcadores, ausentes en los mutantes. **D)** Tinciones contra Tomato y Sox2. Las células Tomato<sup>+</sup> de los heterocigotas y mutantes son positivas para Sox2. **E-H)** Células teñidas con Tomato y anticuerpos para los marcadores endimarios Sox9 (E), Nfia (F), S100 $\beta$  (G) y Vimentina (H). En los animales *Ascl1*<sup>-/-</sup>, las células derivadas de progenitores que hubiesen expresado *Ascl1* expresan Sox9, Nfia y S100 $\beta$ , ausentes en las células Tomato<sup>+</sup> heterocigotas (E-G). Se observa también un aumento no significativo en la coexpresión de Tomato y Vimentina en los mutantes respecto de los controles (H). En el caso de S100 $\beta$  y Vimentina se muestra la intensidad de la señal de cada anticuerpo en el trazo señalado por la línea blanca (G-H). En todos los casos el canal central (cc) se encuentra a la izquierda. A la derecha, proporción de células Tomato<sup>+</sup> expresando los marcadores respectivos, cantidad de células analizadas indicada sobre las barras (2-3 embriones en cada caso).

\*\*\* p<0.0003, n.s. no significativo, prueba exacta de Fisher.

En contraposición, en los animales mutantes para *Ascl1*, la marcación de los progenitores prospectivos de las CSF-cN y su seguimiento de destino mostró una combinación distinta de marcadores. En principio, y consistente con la ausencia de CSF-cN en los animales *Ascl1*<sup>-/-</sup>, las células marcadas son negativas para Pkd21l1, *Gata2*

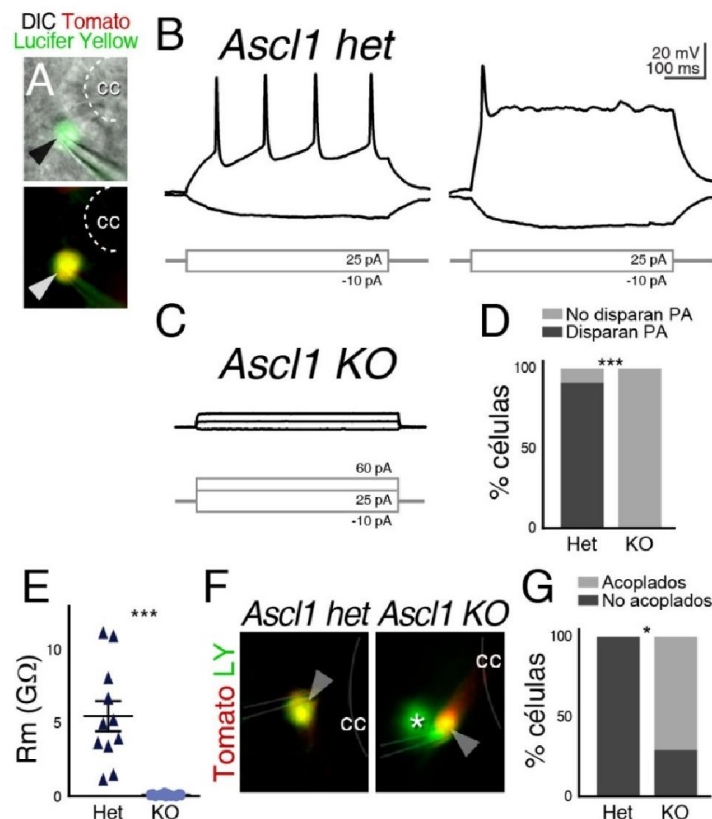
(*Gata2<sup>GFP</sup>*) y  $\beta$ III-tubulina (Figuras 40A-C). Adicionalmente, expresan Sox2, Sox9 y Nfia como se observa en las figuras 40D-F. Finalmente, detectamos la expresión de S100 $\beta$  y Vimentina por dentro de los límites de la célula (Figuras 40G-H), a diferencia de lo que ocurre en los animales control donde solo observamos filamentos positivos rodeando las células Tomato<sup>+</sup> en el epéndima altamente compacto. Ese conjunto de marcadores sugiere que en ausencia de *Ascl1* funcional, los progenitores que normalmente generan CSF-cN, se diferencian en endimocitos.

Por último, evaluamos las propiedades electrofisiológicas de las células Tomato<sup>+</sup> individuales realizando registros *whole cell* en rebanadas agudas de médula espinal E18.5 control o mutante *Ascl1*. Las células fueron identificadas por la expresión de la proteína fluorescente y usamos Alexa488 o Lucifer Yellow en la pipeta de registro para verificar la célula registrada (Figura 41A).

La determinación de las propiedades de membrana de los endimocitos ha mostrado que poseen potenciales de reposo hiperpolarizados y resistencia de membrana baja, reflejando la presencia de canales iónicos de fuga en sus membranas. Además son sensibles a cambios en la concentración de K<sup>+</sup> extracelular y capaces de generar corrientes menores diversas en respuesta al estímulo eléctrico (Bruni, 1998; Marichal *et al.*, 2012).

Las células Tomato<sup>+</sup> en animales heterocigotas analizadas (n=10/11) dispararon potenciales de acción ante inyecciones de corriente. Esos registros fueron realizados en configuración *current clamp*, (10 pulsos de a 10-20pA, partiendo de -70mV, Figura 41B). De manera similar a la heterogeneidad descrita en el laboratorio para los dos subgrupos de CSF-cN (Petracca *et al.*, 2016), encontramos algunas células que dispararon potenciales de acción repetitivos, mientras que otras solo lo hicieron una vez (Figura 41B). Por el contrario, en los animales mutantes ninguna célula Tomato<sup>+</sup> mostró la capacidad de disparar un potencial de acción (n=0/12, se garantizó la despolarización de las células por encima de los -50mV, Figuras 41C-D).

Las neuronas CSF-cN se caracterizan por tener una alta resistencia de membrana asociada a su inmadurez (Marichal *et al.*, 2009; Orts-Del'immagine *et al.*, 2012; Petracca *et al.*, 2016). De acuerdo con eso, las células Tomato control exhibieron valores del orden de los G $\Omega$  (Figura 41E). En contraposición, en los animales nulos para *Ascl1*, las células marcadas presentaron una baja resistencia de membrana, un rasgo propio de los endimocitos (Bruni, 1998; Marichal *et al.*, 2012).

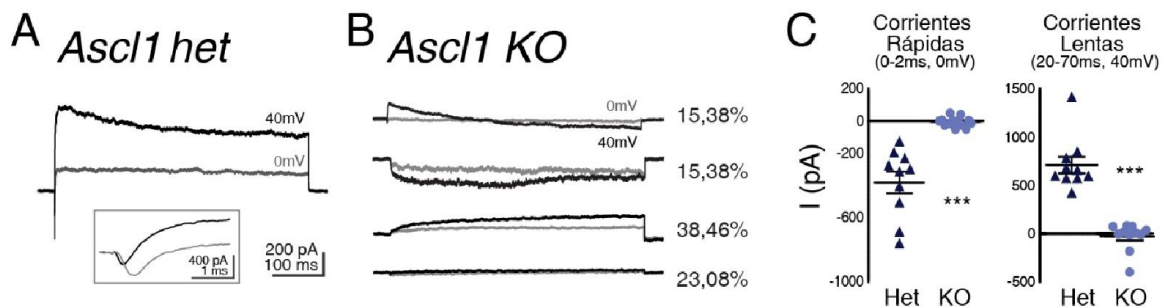


**Figura 41. Los progenitores prospectivos de las CSF-cN se diferencian en endimocitos en ausencia de *Ascl1*.**

Rebanadas agudas de médula espinal E18.5-P1 de animales *Ascl1<sup>CreER/+</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato* (control) o *Ascl1<sup>CreER/-</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato* (mutante), en los que se indujo la recombinación en E13.5. Se registró las propiedades eléctricas de las células Tomato<sup>+</sup>. **A**) Imagen al microscopio de una rodaja control *Ascl1<sup>+/-</sup>* donde se observa una CSF-cN marcada con Tomato, la pipeta de *patch* (puntas de flecha) y la misma célula llena con el colorante Lucifer Yellow. **B-D**) Trazos ejemplos de despolarizaciones de membrana en animales control (B) y mutantes (C) en la configuración *current clamp* ante la inyección de corriente (indicados en la Figura). En los heterocigotas se detectó uno de dos comportamientos: disparos repetitivos o disparo único, mientras que las células mutantes nunca dispararon potenciales de acción. Cuantificación en D (11-13 células, 3 embriones cada uno). \*\*\*  $p < 0.0003$ , prueba exacta de Fisher. **E**) Resistencia de membrana de las células Tomato<sup>+</sup>. En los mutantes la resistencia es baja ( $89 \pm 52 \text{ M}\Omega$ , característico de endimocitos), mientras que en los animales *Ascl1<sup>+/-</sup>* es del orden de los  $\text{G}\Omega$  ( $5.3 \pm 3.3 \text{ G}\Omega$ ), consistente con el fenotipo de las CSF-cN. \*\*\*  $p < 0.0001$ , prueba de Mann-Whitney (11-13 células, 3 embriones cada uno). **F-G**) Fluorescencia de Tomato y Lucifer Yellow (LY) en el microscopio de epifluorescencia durante el *patch*. Se observa que en los animales mutantes el colorante pasa a la célula vecina (célula Tomato<sup>-</sup>, LY<sup>+</sup>, asterisco) indicando acoplamiento, mientras que en el control solo las células registradas presentan el colorante (punta de flecha). Cuantificación en G (4-7 células, 2 embriones cada uno). \*  $p < 0.05$ , prueba exacta de Fisher. cc canal central.

Los endimocitos suelen estar acoplados eléctricamente por uniones del tipo *gap junctions*, además de uniones estrechas que sellan el espacio intercelular (Bruni, 1998; Marichal *et al.*, 2012). Durante los registros electrofisiológicos pueden evidenciarse

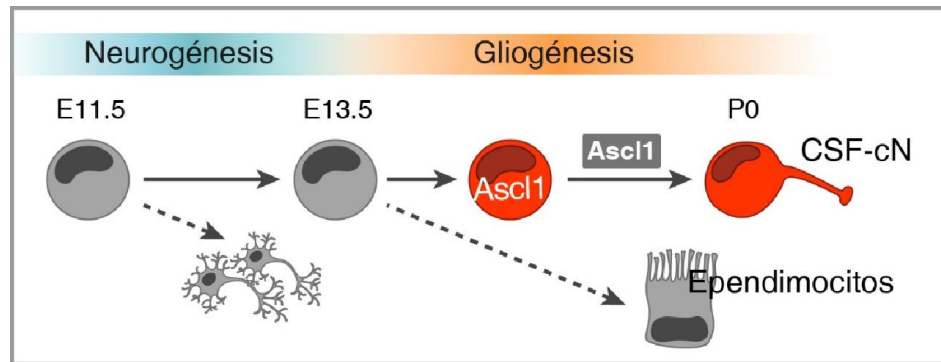
dichas uniones mediante el uso del colorante Lucifer Yellow, que es capaz de atravesar los poros de conexinas formados entre células acopladas. En nuestros experimentos, en el 80% de las células Tomato<sup>+</sup> mutantes evaluadas pudimos distinguir el colorante transmitido a células vecinas (Figura 41F, asterisco, n=5/7), mientras que en los animales control nunca detectamos ese fenómeno (Figuras 41F-G, n=0/4).



**Figura 42. En ausencia de *Ascl1*, las células derivadas de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup> no exhiben corrientes voltaje dependientes neuronales.**

**A-C)** Corrientes registradas en células Tomato<sup>+</sup> en rebanadas agudas de médula espinal E18.5-P1 de animales *Ascl1*<sup>CreER/+</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato (control) o *Ascl1*<sup>CreER/-</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato (mutante), en los que se indujo la recombinación en E13.5. Trazos ejemplos de corrientes evocadas ante pulsos despolarizantes (0mV en gris, 40mV en negro) en configuración *whole cell voltage clamp*. En los animales heterocigotas se observan corrientes rápidas entrantes que nunca son observadas en los animales mutantes (cuantificación en C, izquierda, observar recuadro en A) y corrientes salientes de desarrollo más lento que, incluso cuando están presentes en los mutantes alcanzan valores mucho menores (cuantificación en C, derecha). En los animales mutantes, las células Tomato<sup>+</sup> exhibieron una diversidad de comportamientos ante la despolarización (B, se indican los porcentajes para cada fenotipo, total 13 células). Las cuantificaciones se realizaron ante los pulsos indicados e integrando la señal en los intervalos señalados (10-13 células, 3 embriones cada uno). \*\*\* p<0.0001 prueba de Mann-Whitney. Las líneas se corresponden a la media±DE.

En configuración *voltage-clamp* se midieron las corrientes evocadas en respuesta a escalones de voltaje. Las células Tomato<sup>+</sup> control presentaron corrientes dependientes de voltaje entrantes rápidas (que atribuimos al Na<sup>+</sup>) y salientes más retrasadas (consistentes con corrientes de K<sup>+</sup>), características de neuronas (Figura 42A). En los mutantes, las células Tomato<sup>+</sup> mostraron algunas respuestas a los cambios de potencial y en algunos casos corrientes dependientes de voltaje, aunque de forma variable. En la figura 42B presentamos ejemplos de los distintos tipos de corrientes registradas, que guardan similitud con aquellas previamente descritas para células ependimarias (Marichal *et al.*, 2012). Sin embargo, es importante remarcar que en ningún caso se encontraron corrientes en las células mutantes de la magnitud observada en los animales control, ni tampoco corrientes entrantes rápidas con la cinética característica de las corrientes de Na<sup>+</sup> voltaje dependientes (Figura 42C).



**Figura 43. Ascl1 controla la especificación de las CSF-cN en los progenitores neurales tardíos.**

Después de la fase neurogénica, los progenitores adquieren nuevas competencias. La expresión de Ascl1 en progenitores ventrales tardíos dirige la especificación de las CSF-cN de manera autónoma de célula. Ascl1 le confiere potencial neurogénico a progenitores que de otro modo generarían células ependimarias.

En resumen, la caracterización morfológica, electrofisiológica y de marcadores moleculares, indica que en ausencia de Ascl1, los progenitores del tubo neural que normalmente se diferencian en las neuronas del canal central, se convierten en ependimocitos. Ascl1, entonces, confiere potencial neurogénico a progenitores ventrales tardíos de la médula espinal en desarrollo, e inhibe la generación de células ependimarias en ese linaje.

Para finalizar esta sección, los resultados presentados permiten proponer que Ascl1 actúa de manera autónoma de célula en la especificación de las CSF-cN de amniotas. Su función está acoplada a la generación tardía de ese grupo de neuronas y podría estar asociada a la heterocronía observada entre especies amniotas y no-amniotas. Adicionalmente, demostramos que Ascl1 es responsable de conferir potencial neurogénico a progenitores tardíos de la médula espinal ventral que, de otra forma, generarían ependimocitos (Figura 43)

### III- GATA3 REGULA LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CSF-cN

#### Gata3 controla la diferenciación de un subgrupo de las CSF-cN

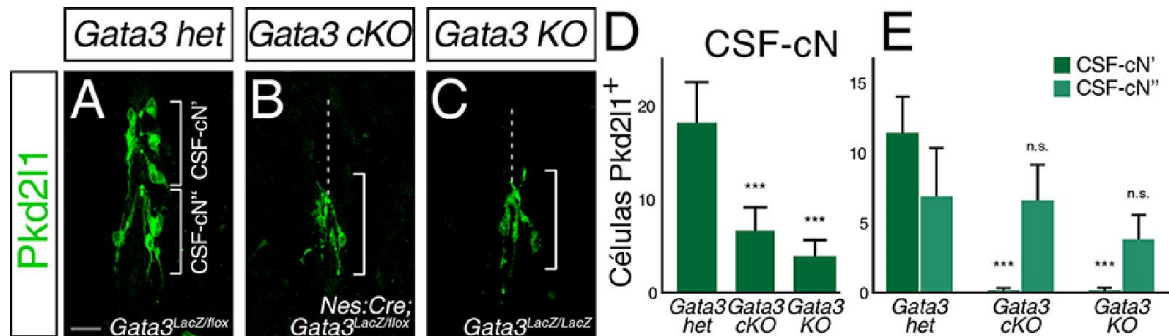
Los resultados presentados en la primera parte muestran que el factor de transcripción Gata3 se expresa en el linaje de las CSF-cN desde estadios tempranos de su diferenciación. Nuestros experimentos nos llevaron a proponer que Gata3 se expresa en los precursores postmitóticos de las CSF-cN, río abajo de *Ascl1* y precediendo la de Gata2 (Figuras 18-21 y 24-25).

En base a esas observaciones, hipotetizamos que Gata3, participa en la red transcripcional que gobierna la especificación de las CSF-cN de la médula espinal del ratón. Para someter a prueba esa hipótesis, analizamos el desarrollo de las CSF-cN en animales deficientes para Gata3.

La ausencia de Gata3 es letal en el embrión (alrededor de E10.5) debido a falla cardíaca por defectos en la producción de norepinefrina en el SN simpático (Lim *et al.*, 2000; Moriguchi *et al.*, 2006; Pandolfi *et al.*, 1995). Para generar animales mutantes nulos para *Gata3*, en estadios posteriores a E10.5 recurrimos a estrategias genéticas que nos permitieran eliminar ese gen exclusivamente en el SN. Obtuvimos animales mutantes condicionales al SN (*Gata3 cKO*, conditional knock out) *Nes:Cre;Gata3<sup>flox</sup>*. En la línea *Gata3<sup>flox</sup>*, el exón 4 de *Gata3*, que contiene el dominio de unión al DNA, está flanqueado por los sitios loxp blancos de la recombinasa. El transgen *Nestin:Cre* fue utilizado para la expresión de Cre en el SN. Luego de la remoción del exón 4, mediada por Cre en el SN, se produce una proteína trunca no funcional (Figuras 10, 13-14, Zhu *et al.*, 2004). Para mejorar la eficiencia de la eliminación del gen, introdujimos el alelo nulo *Gata3<sup>LacZ</sup>*, dado que la heterocigosis para *Gata3* no presenta fenotipo para el desarrollo de las CSF-cN (Figuras 44A,D).

Analizamos la expresión de *Pkd2l1* en la médula espinal E18.5 de animales control (*Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*) y *Gata3 cKO* (*Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*, Figura 44). En los animales *Gata3 cKO* encontramos una importante disminución en el número de células *Pkd2l1<sup>+</sup>*, respecto de los embriones control (Figuras 44A-B,D). En particular, se observó que la ausencia de Gata3 impacta selectivamente en la pérdida de las CSF-cN más dorsales.

Como fue mencionado en la Introducción, en el ratón existen dos subgrupos de CSF-cN, semejantes a los encontrados en el pez cebra: las CSF-cN' de ubicación lateral y las CSF-cN'' posicionadas ventrales al canal central (Park *et al.*, 2004; Petracca *et al.*, 2016). En el mutante *Gata3 cKO* las CSF-cN' están severamente afectadas, mientras que no se registran diferencias en el número de células Pkd211<sup>+</sup> de localización ventral (Figura 44E).



**Figura 44. Los mutantes *Gata3* carecen de neuronas Pkd211<sup>+</sup> laterales al canal central.**

**A-C)** Secciones transversales de médula espinal E18.5 teñidas con anticuerpo contra Pkd211 para detectar las CSF-cN en animales control *Gata3* heterocigotas (*Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*) (A), *Gata3 cKO* (*Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*) (B) o *Gata3 KO* (*Gata3<sup>LacZ/LacZ</sup>*) (C). Las hembras preñadas para generar embriones *Gata3<sup>LacZ/LacZ</sup>* recibieron agonistas adrenérgicos desde el día E7.5 para permitir la sobrevivencia de los mutantes. En A se señalan los dos subgrupos de CSF-cN. En los animales mutantes no se observan CSF-cN', pero permanecen las CSF-cN'' (corchetes en B y C). **D-E)** Cuantificación de las CSF-cN totales (D) o según su localización alrededor del canal central (cc, E) por sección. Se observa una importante disminución en el número de CSF-cN en los animales mutantes *Gata3 cKO* y *KO* (D). No se detectan diferencias en las CSF-cN'' entre genotipos, mientras que las CSF-cN' están completamente ausentes en los mutantes (E). (*wt.*: 33 secciones, 4 embriones; *Gata3 cKO*: 38 secciones, 3 embriones; *Gata3 KO*: 10 secciones, 2 embriones). Barras media+DE. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado con el control, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 20  $\mu$ m.

Para descartar completamente que el fenotipo se debiera a la delección deficiente de *Gata3* debido a defectos en la expresión del línea *Nes:Cre* o a la baja eficiencia de recombinación del alelo *Gata3<sup>flox</sup>*, generamos otros mutantes *Gata3*. Como fue descrito más arriba, los mutantes nulos de *Gata3* mueren en el estadio embrionario E10-E10.5. Sin embargo, la letalidad puede ser rescatada por la administración de agonistas adrenérgicos que compensan la falla en la producción de norepinefrina (Kaufman *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2000). Con el objetivo de obtener embriones *Gata3<sup>-/-</sup>*, establecimos apareos *Gata3<sup>LacZ/+</sup>* x *Gata3<sup>LacZ/+</sup>* y las hembras preñadas recibieron agua fresca conteniendo isoprotenerol (100 $\mu$ g/ml) y fenilefrina (100 $\mu$ g/ml) desde el día 7.5 de preñez. De esa manera fue posible obtener algunos embriones E18.5 *Gata3<sup>-/-</sup>* (*Gata3 KO*), en los que realizamos tinciones contra Pkd211. Los mutantes *Gata3 KO* presentan el mismo fenotipo que los mutantes condicionales, con una marcada reducción del número de

células Pkd2l1<sup>+</sup> por sección, debido a la completa ausencia de CSF-cN', laterales al canal central (Figura 44C). Ese resultado nos permite concluir que, la médula espinal sin Gata3 funcional carece de las CSF-cN', es decir, las neuronas Pkd2l1<sup>+</sup> más dorsales, de ubicación lateral al canal central.

### **Gata3 se expresa en las dos poblaciones de CSF-cN**

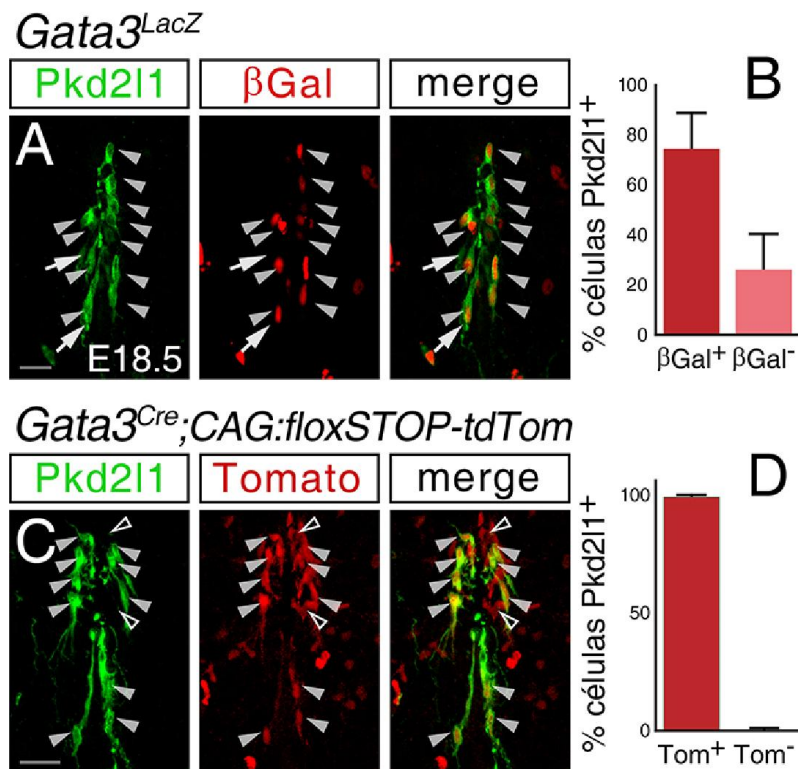
Debido a que solo las CSF-cN' se ven afectadas en el mutante de *Gata3*, realizamos experimentos adicionales para confirmar que Gata3 se expresa en todo el linaje de las neuronas del canal central y que ambos subgrupos, CSF-cN' y CSF-cN'', derivan de precursores Gata3<sup>+</sup>.

La línea reportera *Gata3<sup>LacZ</sup>* permite seguir la expresión del factor de transcripción a través de la detección de la enzima  $\beta$ -Gal. En la médula espinal *Gata3<sup>LacZ</sup>* E18.5, mediante inmunohistoquímica doble para Pkd2l1 y  $\beta$ -Gal, encontramos que el 74 $\pm$ 14% de las células Pkd2l1<sup>+</sup> expresan  $\beta$ -Gal (Figuras 45A-B), lo cual indica que Gata3 se expresa al menos en dicha fracción de la población neuronal. La expresión de la enzima está distribuida de manera similar en ambos grupos, siendo el 73 $\pm$ 22% de las CSF-cN' y el 69 $\pm$ 23% de las CSF-cN'' positivos para Gata3/ $\beta$ -Gal. Además de mostrar que una alta proporción de las CSF-cN expresa Gata3, este resultado indica que el hecho de que las CSF-cN'' no requieran de Gata3, no es consecuencia de que el factor de transcripción no es expresado en ese subgrupo.

Debido a que la marcación en *Gata3<sup>LacZ</sup>* no es indeleble, es posible que se pierda en estadios avanzados del desarrollo, si Gata3 deja de expresarse en algunas células. Por ese motivo realizamos un seguimiento de linaje indeleble de las células que expresan Gata3, utilizando animales *Gata3<sup>Cre</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato*, en los que la recombinasa bajo el control de *Gata3* dirige la expresión de la proteína fluorescente.

En la médula espinal de embriones *Gata3<sup>Cre</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato* E18.5 encontramos que el 100% de las neuronas Pkd2l1<sup>+</sup> expresan la proteína Tomato (Figuras 45C-D, puntas de flecha llenas), lo cual implica que todas las neuronas del canal central expresan Gata3 o derivan de precursores Gata3<sup>+</sup>. En conjunto con las observaciones presentadas en la primera parte, esos experimentos confirman que todas las CSF-cN derivan de precursores Gata3<sup>+</sup> y, por lo tanto, la ausencia selectiva de las CSF-cN' en los

*Gata3 cKO* no se debe a la expresión diferencial del factor de transcripción en ese subgrupo.

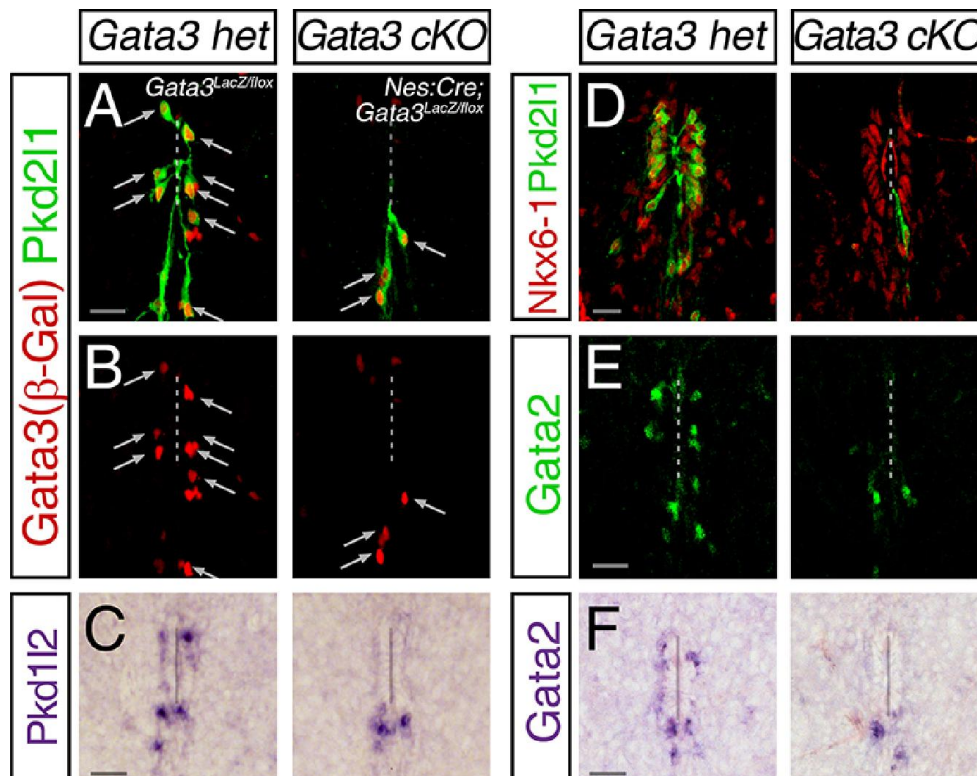


**Figura 45. *Gata3* se expresa en los dos subtipos de CSF-cN.**

**A-B)** Experimento de seguimiento de linaje con la línea *Gata3<sup>LacZ</sup>*. Secciones transversales E18.5 teñidas con anticuerpos para Pkd211 y β-Gal. Las puntas de flecha llenas señalan células Pkd211<sup>+</sup> alrededor del canal central expresando β-Gal. Cuantificación en B (30 secciones, 3 embriones). Tanto las CSF-cN' (73±22%) como las CSF-cN'' (69±23%) son β-Gal<sup>+</sup>, indicando que expresan *Gata3* en algún momento de su desarrollo. Células Pkd211<sup>+</sup>,β-Gal<sup>-</sup> señaladas con flechas. **C-D)** Seguimiento de linaje en *Gata3<sup>Cre</sup>;CAG:floxSTOP-tdTomato* en E185. Inmunohistoquímica para Pkd211 y detección de la fluorescencia directa de Tomato. Cuantificación en D. El 100% de las CSF-cN expresa la proteína fluorescente (puntas de flecha llenas). Las puntas de flecha vacías señalan células Tomato<sup>+</sup> alrededor del canal central que no expresan Pkd211. Esas células presentan la morfología cúbica típica de endimocitos. Barras media+DE. Barras de escala 20 μm

### Las CSF-cN' están ausentes en los mutantes *Gata3 cKO*

Teniendo en cuenta que *Gata3* se expresa en las células postmitóticas, es posible que controle los pasos finales de la diferenciación y regule directamente la expresión de Pkd211. Para evaluar esa posibilidad, analizamos la presencia de CSF-cN en el canal central de ratones *Gata3 cKO* también a través de otros marcadores.



**Figura 46. Las CSF-cN' están ausentes en los mutantes *Gata3*.**

**A-B)** Secciones transversales de médula espinal E18.5 control *Gata3<sup>LacZ/+</sup>* o *Gata3 cKO* (*Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*) teñidas con anticuerpos para Pkd211 y β-Gal. En los animales heterocigotas β-Gal se expresa tanto en CSF-cN' como en las CSF-cN'' (flechas). No se detecta expresión de Pkd211 ni β-Gal lateral al canal central (cc) en los animales *Gata3 cKO*. Por el contrario se observan células Pkd211<sup>+</sup>,β-Gal<sup>+</sup> ventrales correspondientes a las CSF-cN''. **C-F)** Inmunohistoquímicas con anticuerpos para Pkd211, Nkx6-1 (D) y Gata2 (E), e hibridaciones *in situ* con sondas Pkd112 (C) y Gata2 (F). No se detectó señal del mRNA de Pkd112 (C) ni de la proteína (E) o mRNA de Gata2 (F) lateral al cc de los animales mutantes *Gata3*. Sin embargo, la expresión en la región ventral al cc se observó normal comparada con los animales control. En la tinción contra Nkx6-1 (D) se puede observar que el epéndima alrededor del cc no presenta aberraciones notables. La línea de puntos señala el cc. Barras de escala 20 μm y 50 μm en C,F.

Analizamos la expresión de β-Gal que reporta *Gata3* en el *knock in Gata3<sup>LacZ</sup>*. Mientras que en los animales *Gata3<sup>LacZ/flox</sup>* detectamos señal de la enzima β-Gal, tanto lateral al canal central como en la región ventral, en los animales *Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>* solo fue detectada en células ventrales al canal (Figuras 46A-B), en coincidencia con el canal iónico Pkd112 (Figura 46C). Un patrón de expresión similar fue encontrado para el factor de transcripción *Gata2*, tanto a nivel proteico (Figura 46E) como de mRNA (Figura 46F). En todos los casos, los animales *Gata3 cKO* presentan un número menor de CSF-cN, y las remanentes siempre son del tipo CSF-cN'', ventrales al canal central. Adicionalmente, la tinción contra Nkx6-1 reveló que el epéndima no se encuentra alterado en los mutantes

(Figura 46D), descartando la posibilidad de que la falta de CFS-cN se deba a defectos estructurales en el canal central.

En conjunto, los experimentos presentados indican que *Gata3* cumple funciones esenciales en el control del desarrollo de las neuronas del canal central. Llamativamente, a pesar de expresarse en todo el linaje de las CSF-cN, *Gata3* es estrictamente necesario en el subgrupo de las CSF-cN', mientras que es dispensable para la especificación del subgrupo más ventral, las CSF-cN'', que se desarrolla normalmente en ausencia de *Gata3*.

La ausencia de expresión de *Gata2* en los mutantes *Gata3*, además de indicar que no existe diferenciación de CSF-cN en ausencia de *Gata3*, sustenta el modelo presentado en la primera parte, que propone que *Gata3* y *Gata2* se expresan secuencialmente en el linaje de las CSF-cN. De esa forma, sugerimos que *Gata2* actúa río abajo de *Gata3* y que *Gata3* controla su expresión (en las CSF-cN', no así en las CSF-cN'' donde la expresión de *Gata2* es claramente independiente de *Gata3*).

### **Gata3 actúa tempranamente en el proceso de diferenciación**

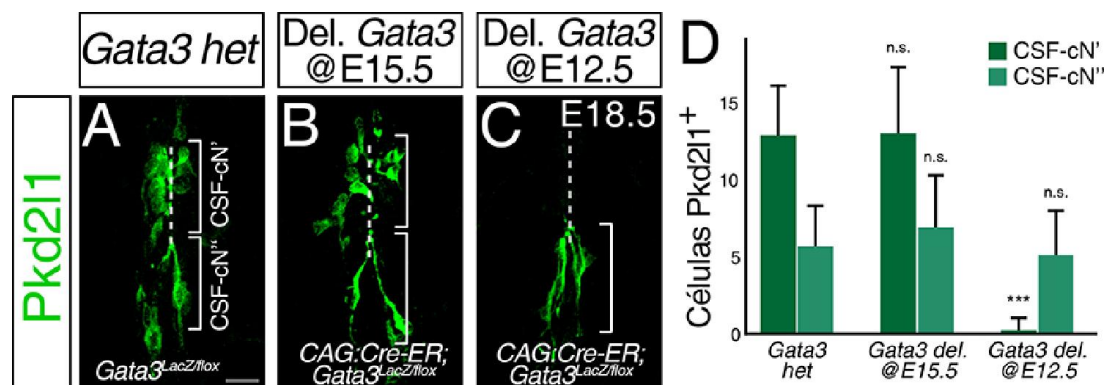
*Gata3* se expresa durante un período extendido en el transcurso del desarrollo de las CSF-cN: empieza en el estadio precursor postmitótico, río abajo de *Ascl1*, pero, previo a su conversión en neuronas (Figuras 20-21), y aún se detecta su transcripción en estadios perinatales, cuando las CSF-cN ya han adquirido su identidad y presentan las características de las neuronas en el adulto (Figura 45).

La expresión postmitótica de *Gata3* es consistente con el rol que tiene el factor de transcripción en otras regiones del SN, donde cumple funciones diversas pero relacionadas con eventos avanzados de la especificación neuronal. Durante la diferenciación serotoninérgica, *Gata3* controla los pasos finales y regula directamente la expresión de las enzimas productoras de serotonina (Deneris *et al.*, 2013). Por otro lado, en el sistema simpático, *Gata3* es necesario para la sobrevida neuronal (Lim *et al.*, 2000; Moriguchi *et al.*, 2006), mientras que, en el rombómero 1 del cerebro medio, *Gata3*, junto con *Gata2*, son controladores de la identidad GABAérgica (Lahti *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la expresión extendida de *Gata3* a lo largo del desarrollo de las CSF-cN, y la variedad de funciones asociadas al factor de transcripción, decidimos

eliminar la expresión de *Gata3* de manera controlada en el tiempo, para obtener información más precisa sobre su papel.

Realizamos entonces deleciones de *Gata3* usando animales *CAG:CreER;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*. En primer lugar, administramos tamoxifeno en E12.5 para eliminar *Gata3* antes de su expresión en las CSF-cN en diferenciación (~E14-E14.5). Consistente con los resultados mostrados más arriba (*Gata3 cKO*) y el modelo propuesto, encontramos que las CSF-cN laterales al canal central están ausentes en los embriones E18.5, mientras que las CSF-cN", ventrales, se desarrollan sin alteración (Figuras 47C-D). Ese fenotipo es similar al de los animales *Gata3 cKO* y *KO*, lo que demuestra que la actividad de *Gata3* posterior a E12.5 está involucrada en el desarrollo de las CSF-cN.

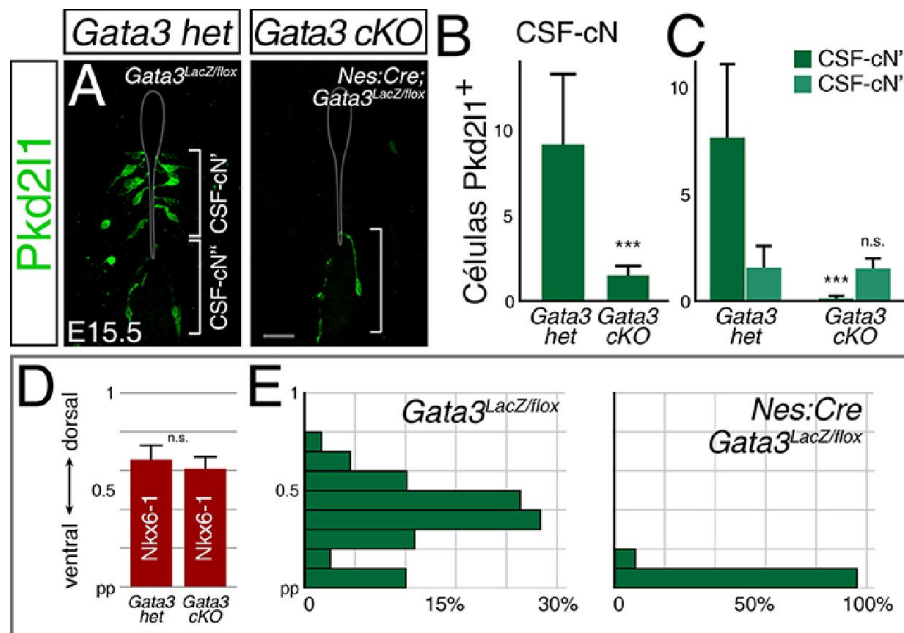


**Figura 47. *Gata3* instruye la diferenciación de las CSF-cN'.**

**A-C)** Secciones transversales de médula espinal E18.5 teñidas con anticuerpo contra Pkd211 para detectar las CSF-cN en animales control *Gata3* heterocigotas (*Gata3<sup>LacZ/+</sup>*) (A), *Gata3* delecionado en E15.5 (*CAG:CreER;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*, 6mg tam E15.5) (B), y *Gata3* delecionado en E12.5 (*CAG:CreER;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*, 6mg tam E12.5; C). Para prevenir la posible letalidad asociada a defectos en el sistema simpático, las hembras preñadas recibieron agonistas adrenérgicos a partir de la administración del tamoxifeno. La activación de Cre se controló por la presencia de proteínas reporteras fluorescentes. En A se señalan los dos subgrupos de CSF-cN. En la deleción en E15.5 no se observaron diferencias. En los animales en que se eliminó *Gata3* a partir de E12.5 no se observan CSF-cN', pero permanecen las CSF-cN'' (corchetes en C). **D)** Cuantificación de las CSF-cN por sección, separadas en CSF-cN' y CSF-cN'' (10-30 secciones, 2 embriones cada uno). Barras media+DE. \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s. no significativo comparado con el control, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. La línea de puntos señala el canal central. Barras de escala 20  $\mu$ m.

En segundo lugar, con el objetivo de discriminar entre una función asociada a los pasos iniciales de la especificación y una función sobre el final de la misma, como por ejemplo, el control de la sobrevida o el mantenimiento de la identidad neuronal, activamos la recombinación en E15.5, cuando parte de las CSF-cN ya completaron su desarrollo. No encontramos diferencias en el número de CSF-cN (células Pkd211+) entre los animales en los cuales se eliminó *Gata3* en E15.5 y los animales control (Figuras 47A-B,D), lo que indica que la actividad de *Gata3* no es necesaria una vez producidas las neuronas. Esos

resultados muestran que *Gata3* no es esencial en el mantenimiento de la identidad neuronal ni en la sobrevivencia de las CSF-cN ya generadas. Por el contrario, *Gata3* cumpliría funciones instructivas en la especificación de las neuronas del canal central, en particular de las CSF-cN'.



**Figura 48. Las CSF-cN' no se generan en ausencia de *Gata3*.**

**A-C)** Secciones transversales de médula espinal E15.5 teñidas con anticuerpo contra Pkd211 en animales control *Gata3* heterocigotas (*Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*) o *Gata3 cKO* (*Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/flox</sup>*) (A). Se señalan los dos subgrupos de CSF-cN. Las CSF-cN', de origen lateral, no son detectadas en los mutantes E15.5, a diferencia de lo que ocurre con las CSF-cN''. **B-C)** Cuantificación de las CSF-cN totales (B) o según su localización alrededor del ventrículo (C) por sección. Se observa una importante disminución en el número de CSF-cN totales en los animales mutantes *Gata3 cKO* (B) que se corresponde con la falla en la generación de las CSF-cN' (C). No se detectan diferencias en las CSF-cN'' entre genotipos (C). **D-E)** La distribución de las CSF-cN a lo largo del eje dorso-ventral confirma que las CSF-cN' no se generan en el mutante *Gata3 cKO*. Se incluye la extensión del territorio Nkx6-1+ como referencia, mostrando además que la organización del neuroepitelio no está afectada. E) Distribución de células Pkd211+ a lo largo del eje dorso-ventral. En los animales control, se observa una distribución similar a la reportada en E14.5 (Figura 16 y Petracca *et al.*, 2016), con un ~15% de las células generándose adyacentes a la placa del piso (pp). En los animales *Gata3 cKO*, las únicas células remanentes tienen esa ubicación, consistente con las CSF-cN''. Barras media+DE (10-15 secciones, 2 embriones cada uno). \*\*\* p<0.001, n.s. no significativo prueba de Mann-Whitney. Barras de escala 20 µm

Para confirmar el rol de *Gata3* en las etapas iniciales de la especificación, analizamos los mutantes *Gata3 cKO* en estadios más tempranos. En E15.5 observamos, mediante inmunohistoquímica, que los *Gata3 cKO* presentan un número menor de células Pkd211+ en comparación con los heterocigotas (Figuras 48A-B). Al igual que en E18.5, encontramos que las células Pkd211+ dorsales están ausentes (Figura 48C), mientras que las de origen y localización ventral (CSF-cN'') no están afectadas. De esa forma,

confirmamos que *Gata3* actúa en el inicio del desarrollo de las CSF-cN' y que, en ausencia de *Gata3*, esas neuronas no se producen, ni siquiera de manera transitoria.

El análisis de la distribución a lo largo del eje dorso-ventral muestra que, en los animales control, aproximadamente el 15% de las células *Pkd2l1*<sup>+</sup> corresponden al subgrupo CSF-cN". En contraste, en los *Gata3 cKO*, debido a la ausencia completa de CSF-cN', las neuronas más ventrales representan el 100% de las CSF-cN remanentes (Figura 48E). El territorio *Nkx6-1*<sup>+</sup> fue incluido como referencia (Figura 48D). La distribución de las CSF-cN en el mutante E15.5 constituye una evidencia adicional de que las CSF-cN', de origen dorsal, son selectivamente afectadas por la ausencia del factor de transcripción.

Los resultados presentados sugieren que *Gata3* actúa en un segundo estadio del desarrollo de las CSF-cN, a continuación de *Ascl1*, e instruye la especificación del subgrupo CSF-cN'. Los experimentos realizados no permitieron determinar el destino de los precursores de las CSF-cN' en ausencia de *Gata3*. Una posibilidad sería que los precursores que no pueden progresar en la diferenciación adquieran identidades alternativas. Teniendo en cuenta que en ausencia de *Ascl1* los progenitores prospectivos de las CSF-cN se diferencian en endimocitos, es probable que algo similar ocurra en ausencia de *Gata3*. Para resolver esto será preciso realizar seguimientos de linaje con la línea *Gata3*<sup>Cre</sup> en ausencia de *Gata3*. Hasta el momento, hemos realizado un experimento preliminar, no mostrado en esta tesis, con animales *Gata3*<sup>Cre/flox</sup>; *CAG:floxSTOP-tdTomato* (estrategia similar de mapeo de destino para *Gata3* en ausencia del factor de transcripción, similar a la Figura 34A). En esa condición, la diferenciación de las CSF-cN' está impedida y encontramos abundantes células *Tomato*<sup>+</sup> de forma cúbica rodeando el canal central, con morfología semejante a la de los endimocitos. De comprobarse esa observación preliminar, indicaría que, en ausencia de *Gata3*, los precursores de las CSF-cN se convierten en endimocitos.

Sin embargo, es posible que los precursores que no logran diferenciarse por la ausencia de *Gata3* entren en apoptosis. En los mutantes *Gata3 cKO* E15.5 y E18.5 no observamos expresión de  $\beta$ -Gal alrededor del canal central (Figura 46 y datos no mostrados) a pesar de que la transcripción del reportero debería haberse iniciado normalmente. Dos escenarios posibles explican esa observación. Por un lado, es posible que los precursores  $\beta$ -Gal<sup>+</sup> entren en apoptosis y desaparezcan, lo que será preciso evaluar

debidamente mediante la detección de Caspasa3 activada o ensayos de TUNEL que indiquen muerte celular en los mutantes E14.5-E15.5.

En segundo lugar, la ausencia de  $\beta$ -Gal podría reflejar mecanismos auto-regulatorios de Gata3, donde Gata3 regularía positivamente su transcripción y sería necesario para mantener su propia expresión en las neuronas postmitóticas CSF-cN. Ese mecanismo regulatorio ha sido propuesto como un motivo común para los genes que controlan la diferenciación terminal (Hobert, 2011). Los factores de transcripción selectores terminales se expresan en las células postmitóticas y coordinan la expresión corregulada de los genes que confieren una identidad neuronal específica, como canales iónicos, enzimas, receptores y otros factores de transcripción. Consideramos que Gata3 podría estar actuando de esa forma, dirigiendo la especificación de las CSF-cN' en los precursores postmitóticos, en un estadio posterior al primer paso coordinado por Ascl1.

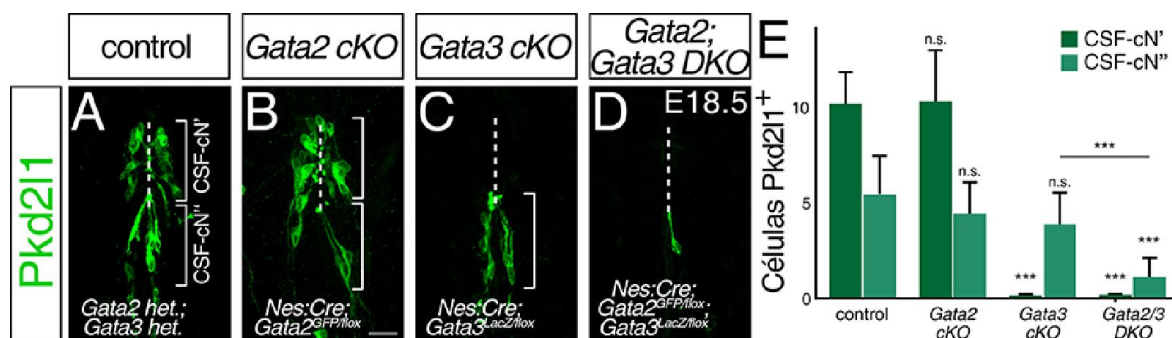
En resumen, nuestros experimentos señalan que Gata3 es necesaria para la diferenciación de las CSF-cN'. Proponemos que Gata3 actúa sobre precursores postmitóticos, en los pasos iniciales del proceso iniciado por Ascl1. Sin embargo, experimentos adicionales serán necesarios para comprender la función de Gata3 y determinar el destino de los precursores que no logran continuar con el programa de especificación.

### **Gata2 cumple funciones redundantes con Gata3 en el desarrollo de las CSF-cN'.**

Por último, comenzamos a evaluar si Gata2, expresado en los pasos finales de la diferenciación de las CSF-cN, es requerido para la especificación de ese grupo de neuronas. En el laboratorio, hemos demostrado que la expresión de Gata2 se inicia de manera simultánea con la de Pkd2l1, hacia el final de la especificación de las CSF-cN (Petracca *et al.*, 2016).

La delección constitutiva de Gata2 es letal en estadios tempranos del desarrollo (E10.5) debido a una severa anemia (Tsai *et al.*, 1994). Generamos entonces animales *Nes:Cre;Gata2<sup>GFP/flox</sup>* mutantes nulos condicionales al SN, en los cuales la recombinasa controlada por *Nestina* (Figura 13) escinde el exón 5 de *Gata2*, produciendo una proteína

trunca incapaz de unirse al DNA (Figura 10, Charles *et al.*, 2006). En E18.5 encontramos que el número de células que expresan Pkd211 en la médula espinal *Gata2* *CKO* es indistinguible del de sus hermanos control (Figuras 49A-B), sin alterarse tampoco la proporción de CSF-cN' y CSF-cN'' (Figura 49E). Sin embargo, no podemos descartar que *Gata2* esté implicado en regulaciones más específicas del fenotipo terminal de las CSF-cN, como la diferenciación del proceso en contacto con el CSF, su conectividad o la síntesis de neurotransmisor, que deberán ser evaluados en el futuro. De hecho, a pesar de que la cantidad de CSF-cN es normal, la ubicación y organización de las neuronas alrededor del canal central parece alterada.



**Figura 49. *Gata2* es redundante con *Gata3* en el desarrollo de las CSF-cN''.**

**A-D)** Especificación de las CSF-cN en ausencia de *Gata2* o de *Gata2* y *Gata3*. Inmunohistoquímicas sobre secciones transversales de médula espinal E18.5 control (*Gata2;Gata3* heterocigotas), *Gata2* *cKO* (*Nes:Cre;Gata2<sup>GFP/lox</sup>*), *Gata3* *cKO* (*Nes:Cre;Gata3<sup>LacZ/lox</sup>*), y *Gata2;Gata3* *DKO* (*Nes:Cre;Gata2<sup>GFP/lox</sup>;Gata3<sup>LacZ/lox</sup>*). Los corchetes señalan los dos grupos de CSF-cN. En los *Gata2* *cKO* se genera el número correcto de CSF-cN' y CSF-cN''. En los *Gata2;Gata3* *DKO* no se distinguen CSF-cN' y la cantidad de CSF-cN'' está muy reducida. El número de CSF-cN'' en el *DKO* fue significativamente diferente del obtenido en el control, *Gata2* *cKO* y *Gata3* *cKO* (\*\*\*) en cada caso). **E)** Número de células Pkd211+ por sección, separadas según su ubicación alrededor del canal central (20-30 secciones, 2-3 embriones cada uno). \*\*\* p<0.001, n.s. no significativo comparado con el control a menos que se indique lo contrario. Prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. La línea de puntos señala el canal central. Barras media+DE. Barras de escala 20 µm.

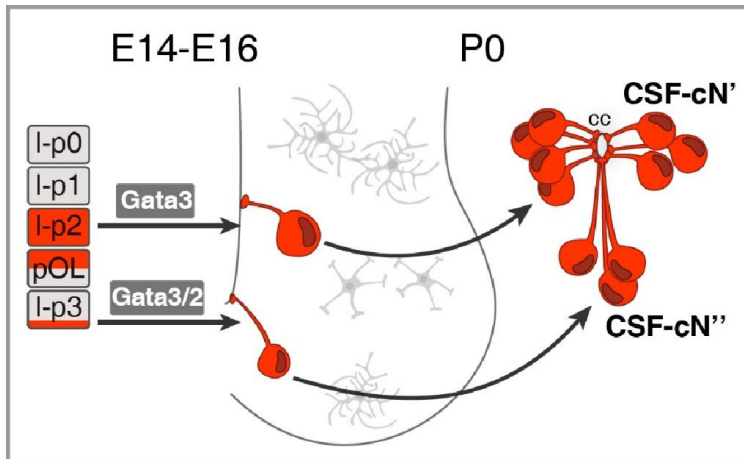
*Gata2* y *Gata3* son parte de la familia *Gata*, y, de entre los 6 miembros, están más filogenéticamente relacionados/cercanos (Lowry *et al.*, 2000). Son coexpresados durante el desarrollo de múltiples poblaciones celulares, tanto en el SN como fuera de él (Deneris *et al.*, 2013; Haugas *et al.*, 2012; Hosoya *et al.*, 2010; Karunaratne *et al.*, 2002; Lahti *et al.*, 2015; Lillevali *et al.*, 2004; Virolainen *et al.*, 2012) y en algunos casos se ha reportado que cumplen funciones redundantes (Lahti *et al.*, 2015). Por ese motivo, decidimos explorar si *Gata3* y *Gata2* son redundantes en la especificación de las CSF-cN''. Como demostramos anteriormente *Gata3* es indispensable para la generación de las neuronas del canal central más dorsales, las CSF-cN' (Figura 44), mientras que el desarrollo de las CSF-cN'' no requiere de la actividad de ninguna de las dos proteínas *Gata* por separado

(Figuras 44 y 49B). En el pez cebra, sin embargo, ambos subgrupos de neuronas dependen de los factores de transcripción Gata. Gata3 controla la especificación de las CSF-cN' y Gata2 la de las CSF-cN'' (Yang *et al.*, 2010). Hipotetizamos que, si los factores de transcripción Gata también cumplen funciones esenciales en la generación de las CSF-cN del ratón, Gata2 y Gata3 podrían ser redundantes en la diferenciación de las CSF-cN'' y, de esa forma, se explicaría la persistencia de las CSF-cN más ventrales en los mutantes *Gata3*.

Para contestar esa pregunta, generamos mutantes dobles, ambos condicionales al SN. Al igual que en los casos anteriores, en los animales *Nes:Cre;Gata2<sup>GFP/flox</sup>; Gata3<sup>LacZ/flox</sup>* la recombinasa elimina los exones 5 y 4 de Gata2 y Gata3 respectivamente, generando proteínas inactivas. La obtención de esos animales es laboriosa ya que requiere varias generaciones y lograr los 5 alelos en un individuo tiene baja probabilidad. Por ese motivo la exploración ha sido limitada. Mediante inmunohistoquímicas contra Pkd2l1, encontramos que los dobles mutantes carecen de CSF-cN laterales al canal central (CSF-cN', Figuras 49D-E), siendo en ese aspecto indistinguibles de los mutantes *Gata3 cKO* (Figura 49C). Respecto de las CSF-cN'', de ubicación ventral, encontramos que en los *Gata3;Gata2 DKO* están significativamente reducidas respecto de los animales control, *Gata2 cKO* y *Gata3 cKO* (Figura 49E; control: 6±2, *Gata2 cKO*: 5±2, *Gata3 cKO*: 4±2, *Gata2/3 DKO*: 1±1), con un gran número de secciones que carecen completamente de CSF-cN. Ese defecto en la generación de las CSF-cN'', exclusivo de los dobles mutantes (pero no detectado en los mutantes simples), sugiere que Gata2 es capaz de compensar la ausencia de Gata3 en la especificación de las CSF-cN'' y que la actividad de los factores de transcripción Gata es esencial para la especificación de las CSF-cN''. Por el contrario, la generación de las CSF-cN' depende indefectiblemente de Gata3 y dicha actividad no puede ser reemplazada por Gata2. De esa forma concluimos que la actividad de los factores de transcripción Gata, cuya expresión comienza en precursores postmitóticos, es esencial para la generación de las CSF-cN en su conjunto.

A modo de resumen, en esta sección presentamos evidencias que sustentan un modelo en el cual la diferenciación de las CSF-cN requiere de la actividad de las proteínas Gata. En el caso de las CSF-cN', Gata3 es necesario e irremplazable en el proceso de especificación donde está implicado en la instrucción del destino río abajo de *Ascl1*. En cambio, el desarrollo de las CSF-cN'' no depende específicamente de Gata3 ni de Gata2,

pero sí precisa de la acción de alguno de los dos factores de transcripción, lo cual indica que pueden actuar de manera redundante (Figura 50).



**Figura 50. Los factores de transcripción Gata son esenciales para la diferenciación de las CSF-cN.**

Gata3 es requerido para la generación de las CSF-cN' en las que instruye su especificación en los pasos iniciales. Las CSF-cN'' no requieren de Gata3, pero su desarrollo se ve afectado en ausencia de Gata3 y Gata2, sugiriendo que las dos proteínas cumplen en este caso funciones redundantes.

# DISCUSIÓN

En esta tesis se identifica parte de la red transcripcional que controla la especificación de las CSF-cN de la médula espinal. Si bien esa clase de neuronas fue descrita hace alrededor de un siglo (Agduhr, 1922; Kolmer, 1921; Studnicka, 1900; Vigh *et al.*, 2004), a diferencia de la mayoría de las neuronas espinales, su ontogenia no había sido aún dilucida. Una de las razones de esta vacancia es el hecho de que las neuronas del canal central son el resultado de eventos neurogénicos en estadios avanzados del desarrollo embrionario, que, hasta recientemente, habían sido considerados exclusivamente gliogénicos. Por lo tanto, los mecanismos genéticos descritos en esta tesis no solo son responsables de la especificación de una clase neuronal notable en cuanto a su morfología, ubicación y funciones posibles, sino también del único evento neurogénico descrito en el tubo neural tardío.

## **ASCL1 Y GATA3/2 DIRIGEN LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CSF-CN**

Los resultados de esta tesis demuestran que los factores de transcripción *Ascl1*, *Gata3* y *Gata2* se expresan secuencialmente en el curso de la diferenciación de las CSF-cN y son componentes importantes de la red transcripcional que gobierna su especificación.

### **Ascl1**

Mediante análisis de expresión y seguimientos de linaje, demostramos que las CSF-cN se diferencian a partir de progenitores *Ascl1*<sup>+</sup>, que proliferan alrededor de E13.5 (Figuras 16-19). El estudio de animales nulos para *Ascl1* indica que *Ascl1* es responsable de iniciar el proceso de diferenciación de las neuronas del canal central (Figuras 23-26). Adicionalmente, la expresión de *Ascl1* en los propios progenitores celulares parece ser necesaria para que las CSF-cN adquieran su identidad, lo que sugiere que *Ascl1* actúa fundamentalmente con autonomía celular (Figuras 33-36).

*Ascl1* se constituye, de esa forma, en el primer factor identificado necesario para el desarrollo de la totalidad de las CSF-cN de ratón. Proponemos que es uno de los elementos iniciales o maestros en el proceso de diferenciación de esa clase neuronal. La ausencia de *Gata3* y *Gata2* en los mutantes *Ascl1* (Figuras 24-25) señala que la expresión de esos factores de transcripción depende de *Ascl1*.

Notablemente, encontramos que, más allá de su rol neurogénico, *Ascl1* instruye la especificación de las CSF-cN, ya que el reemplazo con *Neurog2* no recupera el

desarrollo de las neuronas del canal central (Figura 23C). En la mayoría de los casos a lo largo del SNC, *Ascl1* regula la especificación de neuronas GABAérgicas. Por ejemplo, *Ascl1* dirige la especificación de neuronas inhibitorias en el telencéfalo (Casarosa *et al.*, 1999; Fode *et al.*, 2000), en el diencefalo (Virolainen *et al.*, 2012), en el cerebro medio (Kala *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2015), y en algunos dominios de la médula espinal (Wildner *et al.*, 2006). Con el trabajo presentado en esta tesis, se agregan CSF-cN espinales a las neuronas inhibitorias reguladas por *Ascl1*.

### **Gata3**

Los resultados demuestran que *Gata3* inicia su expresión río abajo de *Ascl1* en los precursores postmitóticos de las CSF-cN que aún no completaron su diferenciación (Figuras 19-21), mientras que *Gata2* se expresa en pasos más avanzados, en coincidencia con la adquisición de la identidad neuronal (Petracca *et al.*, 2016).

*Gata3* se expresa en múltiples clases de neuronas, donde cumple funciones variadas. En el sistema serotoninérgico, *Gata3* actúa en los pasos finales, controlando la síntesis de neurotransmisor (Deneris *et al.*, 2013). Por otro lado, en los ganglios simpáticos del SN autónomo y las células cromafines de la medula adrenal, *Gata3* está involucrado en la diferenciación y supervivencia de las neuronas adrenérgicas (Moriguchi *et al.*, 2006), mientras que, en el cerebro medio y diencefalo, está asociado a la especificación GABAérgica (Kala *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2015; Virolainen *et al.*, 2012).

En el caso de las CSF-cN, *Gata3* actúa en un segundo paso de la especificación, luego de la acción de *Ascl1* (Figura 44). Mediante la delección de *Gata3* en estadios avanzados, descartamos que *Gata3* regule el mantenimiento o la conservación de la identidad de las CSF-cN una vez que alcanzaron el carácter neuronal (Figuras 47-48). Resta elucidar si en ausencia de *Gata3* desde estadios tempranos, los precursores se transdiferencian o si entran en apoptosis y desaparecen. Proponemos que *Gata3* es necesario en los pasos iniciales de la especificación postmitótica, donde instruye la identidad de las CSF-cN. Por otro lado, en los mutantes *Gata3*, no detectamos expresión de *Gata2* (Figura 46), lo cual indica que su expresión está controlada por *Gata3*. De esa forma, validamos la secuencia *Ascl1-Gata3-Gata2*, no solo en cuanto a la temporalidad de expresión, sino también a nivel de regulación génica.

La secuencia *Gata3-Gata2* es atípica. En ninguna de las otras poblaciones neuronales que expresan esos factores de transcripción, *Gata3* precede a *Gata2* (Achim *et al.*, 2013; Kala *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2015; Pattyn *et al.*, 2004; Virolainen *et al.*, 2012), ni siquiera

en la médula espinal ventral durante la fase neurogénica, donde la expresión de Gata2 en precursores p2 antecede la inducción de Gata3 en neuronas V2b (Figura 17, Francius *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2007). Eso refleja la existencia de diferentes estrategias regulatorias de los factores Gata en cada población, que, probablemente, se llevan a cabo a través de *enhancers* específicos para cada tejido (Zhou *et al.*, 2000). Por otro lado, el módulo Gata3-Gata2, que opera en los precursores postmitóticos de las CSF-cN', es semejante al encontrado en pez cebra (Yang *et al.*, 2010), lo que sugiere que el desarrollo de las CSF-cN está parcialmente conservado entre especies amniotas y no amniotas (ver más adelante).

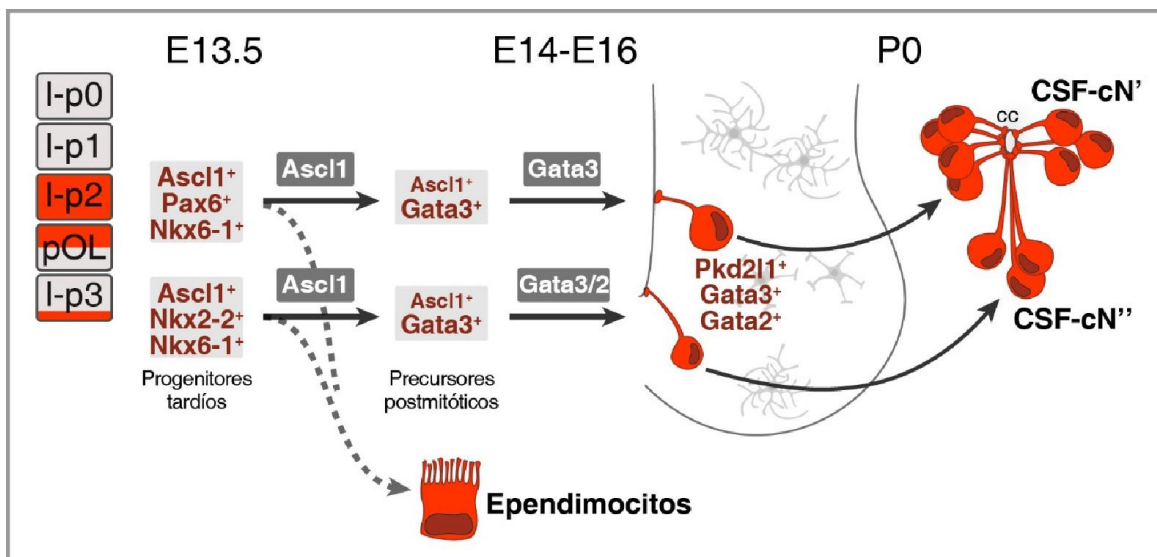
## Gata2

Respecto de Gata2, encontramos que ese factor de transcripción no es estrictamente necesario para el desarrollo de las CSF-cN (Figura 49). Si bien no exploramos en profundidad el fenotipo de los mutantes *Gata2 cKO* (tarea que abordaremos en el futuro), observamos que la expresión de Pkd2l1 y la morfología y ubicación de las neuronas están mayormente conservadas. Entonces, ¿qué función cumple Gata2 en la especificación de las CSF-cN?

Gata2 se coexpresa con Gata3 y Tal1/2 en varias poblaciones neuronales del SNC (Achim *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2009; Kala *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2015; Virolainen *et al.*, 2012) y en el sistema hematopoyético (Bresnick *et al.*, 2012; Hosoya *et al.*, 2010). Salvo las neuronas serotoninérgicas en el cerebro posterior, el resto de las poblaciones Gata2<sup>+</sup> del SNC producen GABA, por lo que se ha propuesto que Gata2 podría funcionar como un selector terminal del destino GABAérgico (Achim *et al.*, 2013; Achim *et al.*, 2014; Hobert, 2011). Se han denominado selectores terminales a los factores de transcripción de expresión postmitótica que regulan genes asociados a una identidad neuronal. Su ausencia suele tener como consecuencia la transformación de las neuronas en identidades alternativas (transformaciones homeóticas, Arlotta *et al.*, 2015). Tal es el caso de los mutantes Gata2 en el cerebro medio y en el diencéfalo, donde la pérdida de Gata2 resulta en un mayor número de neuronas glutamatérgicas, a expensas de células GABAérgicas (Kala *et al.*, 2009; Virolainen *et al.*, 2012).

Gata2 podría cumplir una función similar en la especificación de las CSF-cN, controlando la identidad GABAérgica de esas neuronas. Para validar esto, será necesario evaluar posibles alteraciones en la expresión de marcadores GABAérgicos (como Gad1 y el transportador vesicular Slc32) o la expresión ectópica de los transportadores de

glutamato (Vglut1-3) en las CSF-cN de los mutantes *Gata2*. El inicio de la expresión de *Gata2* en etapas avanzadas del proceso de diferenciación y la generación de las CSF-cN, aún en ausencia de *Gata2*, son consistentes con una acción terminal.



**Figura 51: *Ascl1*, *Gata3* y *Gata2* se expresan secuencialmente en el desarrollo de las CSF-cN y dirigen el proceso de diferenciación.**

Las CSF-cN se generan a partir de dos regiones restringidas del neuroepitelio tardío (marcadas en rojo a la izquierda): el dominio p2/pOL y la porción más ventral del dominio p3, que generan las CSF-cN' y CSF-cN'', respectivamente. Las cajas gris claro muestran los factores de transcripción expresados en los progenitores tardíos o precursores postmitóticos. Las cajas gris oscuro muestran los factores de transcripción involucrados en cada paso y región. Cada subpoblación tiene planes ligeramente diferentes, pero gobernados en todos los casos por *Ascl1*. La especificación postmitótica de las CSF-cN' depende de *Gata3*, mientras que en las CSF-cN'' la acción de *Gata3* y *Gata2* es redundante. En ausencia de *Ascl1*, las CSF-cN adquieren la identidad de ependimocitos. l-p0-3: dominios tardíos (*late*) p0-3.

## ORIGEN DUAL Y MECANISMOS DIFERENCIALES EN EL DESARROLLO DE LAS CSF-cN

En nuestro laboratorio demostramos que las CSF-cN comprenden dos subgrupos diferentes en cuanto a su fisiología y ontogenia, de manera similar a lo que ocurre en el pez cebra (Bernhardt *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010). Las CSF-cN', de ubicación lateral al canal central, se generan a partir de coordenadas más dorsales, correspondientes a los dominios progenitores tardíos p2 y pOL, mientras que las CSF-cN'', que se localizan ventrales al canal central, se diferencian a partir de progenitores ubicados en la frontera entre el dominio p3 y la placa del piso (Figura 8).

## Las CSF-cN' y CSF-cN'' están diferencialmente controladas por Gata3

En esta tesis, encontramos que la secuencia de expresión *Ascl1-Gata3-Gata2* es un despliegue común de los dos subgrupos de CSF-cN. *Ascl1* inicia la diferenciación de esas neuronas (Figuras 23-24), mientras que los factores Gata parecen ser responsables de la especificación terminal, río abajo de *Ascl1* (Figuras 44,49). Demostramos entonces, la existencia de un programa de diferenciación común, en el que las CSF-cN, en su conjunto, son dependientes de *Ascl1* y factores Gata.

Sin embargo, encontramos que solo las CSF-cN' son susceptibles a la ausencia de Gata3. A pesar de que Gata3 se expresa en la totalidad de las neuronas del canal central (Figura 45), solo es necesario para la diferenciación de las células más dorsales, las CSF-cN' (Figuras 44,48), sin alteración de las CSF-cN''. No obstante, nuestros resultados señalan que la diferenciación de las CSF-cN'' también requiere de actividad Gata, como se evidencia en el menor número de CSF-cN'' en los mutantes dobles *Gata2;Gata3* (Figura 49). La acción de los dos factores Gata parece ser redundante, ya que las CSF-cN'' no se encuentran afectadas en los mutantes simples. Esa redundancia entre Gata2 y Gata3 no es muy extendida en el SN (o al menos no ha sido extensamente reportada), salvo en la producción de interneuronas V2 en el rombómero 1 (Lahti *et al.*, 2015).

Esa regulación guarda similitud con lo observado en pez cebra, donde las CSF-cN' dependen de Gata3 para su diferenciación, mientras que, en las CSF-cN'' Gata2 controla la expresión de Gata3 e instruye su identidad neuronal (Yang *et al.*, 2010). ¿Cómo se explican esas diferencias regulatorias en la especificación de cada grupo?

Es posible que exista una relación entre los programas genéticos particulares de las CSF-cN' y CSF-cN'', y las combinaciones de genes tempranos expresados en cada grupo de progenitores. Las CSF-cN' y CSF-cN'' se generan a partir de progenitores que ocupan coordenadas diferentes en el eje dorso-ventral y que, en consecuencia, expresan un conjunto de genes que son específicos para cada posición. Progenitores del dominio p2/pOL, que expresan el factor de transcripción Pax6, se diferencian en CSF-cN', mientras que las CSF-cN'' se generan a partir de progenitores p3 Nkx2-2<sup>+</sup>. Por un lado, la ausencia de Pax6 en animales mutantes impacta selectivamente sobre las CSF-cN' (Petracca *et al.*, 2016), con un fenotipo similar al de los *Gata3 cKO*. Teniendo en cuenta que Pax6 se expresa en progenitores y disminuye durante la diferenciación, proponemos que Pax6 opera río arriba de Gata3 y regula su expresión/actividad. La expresión de

Pax6, a su vez, es resultado del *patterning* del tubo neural en respuesta a la actividad de Shh (Ericson *et al.*, 1997).

En segundo lugar, hipotetizamos que los factores de transcripción Nkx2 (Nkx2-2 y Nkx2-9), expresados en los progenitores de las CSF-cN'', regulan su desarrollo a través del control de proteínas Gata. En el pez cebra, los mutantes de la familia *nkx* carecen de CSF-cN'' (Yang *et al.*, 2010), lo cual es consistente con nuestra hipótesis. Proponemos entonces, que los genes de expresión temprana controlan la actividad diferencial de los factores de transcripción Gata en las CSF-cN' y CSF-cN''. A su vez, Pax6 y Nkx2 se encuentran río abajo de la señalización por Shh y del *patterning* del tubo neural.

En ese contexto, donde las CSF-cN' y CSF-cN'' comparten la expresión de los factores Gata, pero operando de manera diferente, es posible plantear dos escenarios que expliquen esa disparidad. Por un lado, Pax6 y Nkx2 podrían inducir la expresión de combinaciones de proteínas que ensamblan complejos transcripcionales diferentes en las CSF-cN' o CSF-cN'', con participaciones distintas de los factores Gata en cada caso.

Alternativamente, la expresión de Pax6 o Nkx2 podría impactar diferencialmente sobre las secuencias regulatorias de los genes que determinan la identidad CSF-cN (por ej. Pkd2l1, Pkd1l2). De esa forma, en las CSF-cN' solo estarían accesibles los elementos regulatorios blancos de Gata3, mientras que en las CSF-cN'' deberían ser activables tanto los sitios de unión de Gata2 como de Gata3, para así explicar la redundancia entre ambas proteínas. Eso permite proponer que, en el proceso de diferenciación, no solo es importante la combinación de factores de transcripción expresados, sino también la historia previa del linaje (Yang *et al.*, 2010). La gran similitud entre las células finalmente producidas en cada grupo favorece esa visión.

### **¿Fuentes diferentes, células diferentes?**

Nos preguntamos si existe una ventaja adaptativa asociada a tener una clase de neuronas generada a partir de dos fuentes alternativas y por mecanismos diferentes. Se puede suponer que el origen dual de las CSF-cN asegura la distribución de las mismas en el aspecto lateral y ventral del canal central, asumiendo que esa disposición fuese importante para la función de las CSF-cN.

Existen otros casos de poblaciones celulares en el SNC producidas a partir de regiones diferentes del neuroepitelio. Por ejemplo, los oligodendrocitos se generan a partir del dominio pOL ventral y a partir de los dominios dorsales dp3-dp6 (Fogarty *et al.*, 2005;

Richardson *et al.*, 2006; Rowitch *et al.*, 2010; Vallstedt *et al.*, 2005). En ese caso, donde los oligodendrocitos tienen que cubrir grandes áreas, es fácil especular que la multiplicidad de orígenes asegura su distribución. De hecho, se ha observado que, a diferencia de lo que ocurre en el ratón, en el embrión de pollo, los oligodendrocitos se generan solo a partir del neuroepitelio ventral, lo que ha sido relacionado con el volumen cortical y distancias migratorias menores (Richardson *et al.*, 2006). De esa interpretación, se desprende una pregunta interesante: ¿es posible que dos poblaciones de progenitores diferentes, sometidas a distinta información posicional y a la acción de distintas cascadas transcripcionales, converjan en el mismo fenotipo celular final? En ese sentido, el caso de las CSF-cN resulta interesante, ya que dos programas genéticos posicionalmente diferentes convergen en la expresión de los factores de transcripción *Ascl1*, *Gata2* y *Gata3*, aunque con diferencias en sus funciones.

Por otra parte, es probable que el origen dual de las CSF-cN signifique que en realidad se trata de subtipos celulares distintos, con características y funciones particulares. En nuestro laboratorio demostramos que los dos subgrupos de CSF-cN difieren en sus propiedades fisiológicas (Petracca *et al.*, 2016). Adicionalmente, resultados aún no publicados del laboratorio de Claire Wyart, sugieren que las CSF-cN' y CSF-cN'' se comportan diferentemente en la regulación de circuitos locomotores en el pez cebra (comunicación personal, Fidelin *et al.*, 2015; Wyart *et al.*, 2009). El origen dual de las CSF-cN, en este caso, podría contribuir a la generación de dos grupos de neuronas con marcadores moleculares y funciones específicas. Algo similar ocurre con las neuronas Cajal-Retzius, que se generan a partir de al menos tres áreas distintas para distribuirse en regiones corticales específicas donde contribuyen con distintos aspectos del desarrollo cortical (Bielle *et al.*, 2005; Griveau *et al.*, 2010).

## **ASCL1 CONFIERE POTENCIAL NEUROGÉNICO A PROGENITORES TARDÍOS**

Los endimocitos son células epiteliales especializadas que aíslan al SNC del CSF, y atraviesan un proceso de diferenciación que incluye la generación de una superficie ciliada y la expresión de marcadores epiteliales específicos, además del establecimiento de las uniones estrechas que constituyen la barrera epitelial (Alfaro-Cervello *et al.*, 2012; Bruni, 1998; Meletis *et al.*, 2008). Junto con astrocitos y oligodendrocitos, los endimocitos se generan entre ~E14 y E16, a partir de progenitores neurales tardíos de

los dominios ventrales p2 y pOL (Fu *et al.*, 2003; Spassky *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2013), la región que constituye la principal fuente de las CSF-cN.

Sugerimos entonces que, en esos territorios, coexisten los progenitores de las CSF-cN con los de endimocitos. Esto queda demostrado con nuestros experimentos de mapeo de destino de los progenitores prospectivos de las CSF-cN, que, en ausencia del factor de transcripción, adquieren identidades endimarias (Figuras 38-42). Es decir, la expresión de *Ascl1* confiere potencial neurogénico a progenitores ventrales tardíos y es responsable de la generación de neuronas a partir de un epitelio por lo demás gliogénico.

Esa capacidad de *Ascl1* de promover destinos neuronales frente a alternativas no-neuronales, difiere de funciones descritas en estadios puramente neurogénicos donde la expresión de *Ascl1* distingue entre diferentes tipos neuronales o entre la diferenciación neurogénica y la proliferación de los progenitores. Ejemplos de esto son la generación de interneuronas corticales (Casarosa *et al.*, 1999; Fode *et al.*, 2000), de interneuronas dl3, dl5 y dl<sub>A</sub> en la médula espinal dorsal (Helms *et al.*, 2005; Kriks *et al.*, 2005; Wildner *et al.*, 2006) y de neuronas inhibitorias en el cerebelo (Grimaldi *et al.*, 2009). Sin embargo, durante la generación de las CSF-cN, *Ascl1* parece decidir entre un destino neuronal y no-neuronal producidos simultáneamente. El único otro caso, de nuestro conocimiento, en que ocurre algo similar, se da fuera del SNC, durante la diferenciación de los ganglios parasimpáticos del SN autónomo (Dyachuk *et al.*, 2014). En ese caso, *Ascl1* se expresa en los progenitores de las células de Schwann (células mielinizantes en el SNP) presentes en los nervios craneales y torácicos, y su expresión es suficiente para reclutar a esos progenitores gliales y diferenciarlos en neuronas parasimpáticas. De manera similar a lo que ocurre con *Ascl1* en la médula espinal tardía, en su ausencia, esos progenitores se diferencian en células de la glía (Dyachuk *et al.*, 2014). Esos resultados demuestran la capacidad fisiológica de *Ascl1* de conferir potencial neurogénico a progenitores comprometidos con destinos no-neuronales, que está en línea con la utilización de *Ascl1* en las transformaciones neuronales artificiales tanto *in vitro* como *in vivo* (Arlotta *et al.*, 2014; Karow *et al.*, 2012; Torper *et al.*, 2013; Vierbuchen *et al.*, 2010).

Nuestros experimentos sugieren dos funciones de *Ascl1*: por un lado, la inducción del destino neuronal CSF-cN, y, por otro, la inhibición de la diferenciación no-neuronal (glial/endimocítica). De modo especulativo, podemos proponer que *Ascl1* ejerce esa segunda función, al menos en parte, regulando negativamente la expresión de *Sox9* (Scott *et al.*, 2010; Stolt *et al.*, 2003). Mutantes de *Sox9* condicionales al SN analizados en el laboratorio (tesis doctoral Y. Petracca, 2015) presentan un mayor número de

CSF-cN, lo que sugiere que Sox9 previene la diferenciación neuronal en el epitelio gliogénico. Adicionalmente, en nuestros experimentos de seguimiento de linaje, encontramos que, en ausencia de Ascl1, los progenitores prospectivos de las CSF-cN son incapaces de silenciar la expresión de Sox9, como sí ocurre en el contexto *wild type* (Figuras 19,34,40). A partir de esas evidencias, podría existir una suerte de interacción represiva mutua entre Sox9 y Ascl1, donde Ascl1 reprime la expresión de Sox9 a medida que progresa la diferenciación neuronal, y Sox9 reprime a Ascl1 para convertir progenitores en endimocitos y astrocitos.

Especulamos entonces, que Ascl1 controla la diferenciación de las CSF-cN ejerciendo dos acciones principales: induce la expresión de Gata3, que instruye río abajo la especificación, al mismo tiempo que previene la diferenciación endimaria y astrocítica regulando negativamente la expresión de Sox9.

## **SWITCH EN COMPETENCIAS PROGENITORAS**

La expresión de los factores de transcripción que controlan la especificación neuronal a lo largo del SNC está restringida espacial y temporalmente por señales extrínsecas e intrínsecas (Briscoe *et al.*, 2001; Guillemot, 2007; Jessell, 2000). En ese sentido, la expresión de Ascl1 en el tubo neural tardío también depende de restricciones espaciales, impuestas por el *patterning* del SNC, y temporales, después del *switch* que genera el cambio de competencias entre el tubo neural temprano y tardío.

Si bien Ascl1 se expresa de manera continua entre los estadios E10.5-E14.5 en el neuroepitelio ventral, su función cambia radicalmente entre las fases neurogénica y gliogénica. Experimentos presentados en esta tesis evidencian que la expresión tardía de Ascl1 no es una prolongación de la expresión en la zona ventricular temprana, lo que implica una regulación específica en la etapa gliogénica. La expresión temprana de Ascl1, durante la fase neurogénica, depende del factor de transcripción Foxn4 (Figura 27, Li *et al.*, 2005), pero Foxn4 es apenas detectable en la médula espinal en E13.5. Adicionalmente, en los mutantes *Foxn4* E13.5, la expresión de Ascl1 es normal (Figura 27), lo que sugiere que mecanismos independientes de Foxn4 regulan la expresión de Ascl1 en la médula espinal ventral a partir de ~E13. Esto es consistente con que, conforme avanza el desarrollo, la expresión ventral de Ascl1 se vuelve más extendida y menos restringida al dominio p2.

Proponemos que la variación en la regulación de *Ascl1* está asociada a la conversión de competencias que ocurre masivamente en el tubo neural (Bayraktar *et al.*, 2015; Rowitch *et al.*, 2010) y que, probablemente, los mecanismos detrás de ese cambio de competencias son también responsables de las funciones diferentes que *Ascl1* cumple en ambas etapas. Para el *switch* neurogénesis-gliogénesis se han propuesto varios mecanismos diferentes: la vía JAK/STAT (Miller *et al.*, 2007), los factores de transcripción Sox9 (Stolt *et al.*, 2003) y Coup-TFI/II (Naka *et al.*, 2008), cambios en la expresión de ligandos de Notch (Rabadan *et al.*, 2012) y alteraciones en el alcance de Shh mediados por la enzima Sulfatasa 1 (Danesin *et al.*, 2006), entre otros.

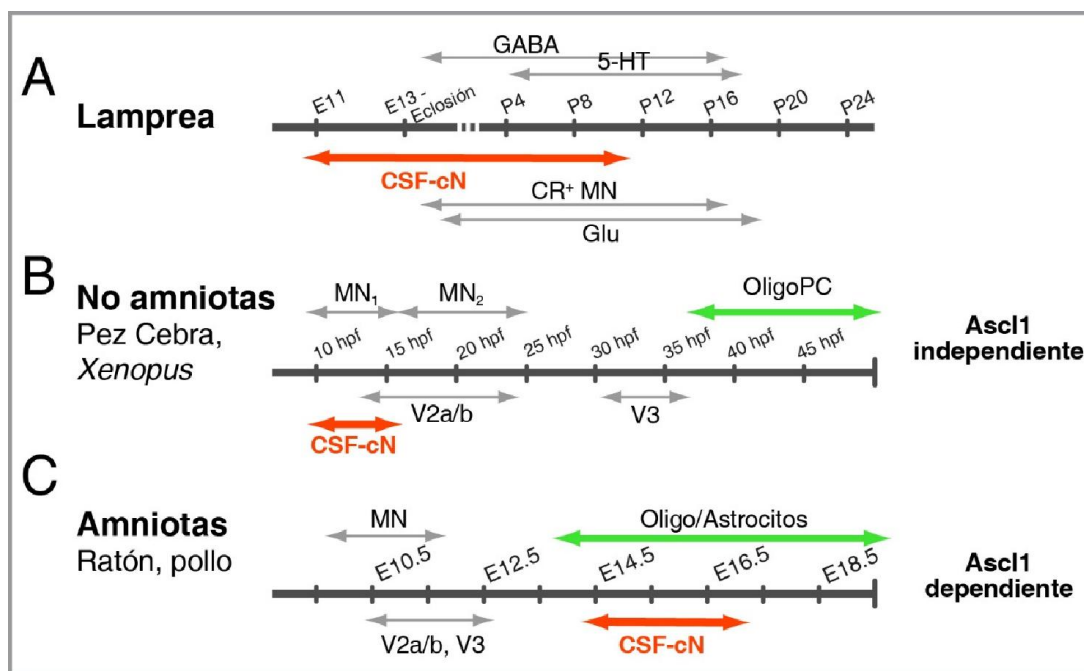
Respecto a eso, la expresión de *Ascl1* en E13.5 es regulada por la vía de Notch/Delta. Experimentos no incluidos en esta tesis, en los que inhibimos farmacológicamente el procesamiento y actividad de Notch, mostraron un aumento de los niveles de *Ascl1*. La expresión aumentada de *Ascl1* en el neuroepitelio tardío coincidió con la de los ligandos *Delta like 1* y *4* (*Dll1*, *Dll4*), lo que sugiere que alguno de ellos podría estar asociado a la regulación de *Ascl1*. Durante la etapa neurogénica, la sobreexpresión de *Ascl1* aumenta los niveles de *Dll4* pero reduce los de *Dll1* (Peng *et al.*, 2007). La relación entre *Ascl1* y *Dll1* podría ser entonces específica del neuroepitelio tardío y contribuir al cambio de competencias de los progenitores.

Alternativamente, pero no en forma excluyente, la función de *Ascl1* podría estar regulada también a nivel postraducciona. Se han reportado sitios de fosforilación de *Ascl1* y otros genes proneurales que modulan su estabilidad (Imayoshi *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que la diferenciación de las CSF-cN depende de los niveles de *Ascl1* expresados (Figura 26), lo cual sugiere un nivel umbral de *Ascl1*, es posible que cambios en la estabilidad y acumulación de la proteína afecten la neurogénesis tardía. Por ejemplo, la fosforilación de una Ser/Thr conservada en la proteína Atonal de *Drosophila* o en Neurog2 de ratón inactiva a los factores de transcripción, y esas perturbaciones en la dinámica de expresión afectan las proporciones de tipos neuronales producidos (Quan *et al.*, 2016). Otro ejemplo es la fosforilación de Neurog2 mediada por Gsk3, que inhibe la dimerización de Neurog2 y previene su actividad (Li *et al.*, 2012). En el caso de *Ascl1*, se ha demostrado que la fosforilación de la Ser152 es necesaria para estabilizar a la proteína (Vinals *et al.*, 2004).

## ASCL1 Y LA HETEROCRONÍA DE LAS CSF-cN

### El desarrollo heterocrónico de las CSF-cN en vertebrados

Como fue mencionado en la Introducción, existe una heterocronía en los vertebrados respecto del momento en que se diferencian las CSF-cN. En el ratón, las CSF-cN son producto de eventos neurogénicos tardíos (Kutna *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016). Aparecen y se diferencian al mismo tiempo que astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos, varios días después que las motoneuronas y que todas las interneuronas espinales (Jessell, 2000; Rowitch *et al.*, 2010). Lo mismo ocurre en los embriones de pollo y rata, lo cual sugiere que es un fenómeno conservado en vertebrados amniotas (Kutna *et al.*, 2014; Petracca *et al.*, 2016).



**Figura 52: La heterocronía en el desarrollo de las CSF-cN está asociada a la regulación por Ascl1.**

**A)** En la lamprea, vertebrado ancestral, las CSF-cN se generan simultáneamente con el resto de las neuronas espinales. Se muestran las ventanas en las que se generan las neuronas GABAérgicas (GABA), serotoninérgicas (5-HT), glutamatérgicas (Glu) y motoneuronas calcitonina<sup>+</sup> (CR<sup>+</sup> MN). E: días embrionarios, P: días prolarvales. **B)** En no amniotas como el pez cebra y *Xenopus*, las CSF-cN se generan simultáneamente con las motoneuronas primarias (MN<sub>1</sub>) y antes de la generación de precursores oligodendrocíticos (OligoPC). En pez cebra, encontramos que el desarrollo de las CSF-cN no depende de Ascl1. hpf: hs postfertilización. **C)** En amniotas (ratón y pollo), las CSF-cN aparecen alrededor de dos días después de que se generaron las motoneuronas (MN) y el resto de las interneuronas espinales. Las CSF-cN aparecen simultáneamente con los oligodendrocitos y astrocitos y, en el ratón, su producción depende de Ascl1.

Por el contrario, en pez cebra, la producción de las CSF-cN' se da simultáneamente con las motoneuronas primarias entre 9 y 15 hpf (horas postfertilización, Park *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2007), y las CSF-cN'' se generan entre 12 y 18 hpf (Yeo *et al.*, 2007). Las interneuronas VeLD y CiD (homólogas de las neuronas V2a y V2b) se diferencian alrededor de 17 hpf, cuando las CSF-cN ya se generaron (Batista *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2008). Tanto las CSF-cN' como las CSF-cN'' de pez cebra se producen en estadios anteriores a la generación de neuronas V3 (~30 hpf, Schafer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010) y de precursores oligodendrocíticos (~30 hpf, Kirby *et al.*, 2006). En *Xenopus*, se observa la misma secuencia, con las CSF-cN apareciendo al mismo tiempo que las neuronas primarias (Binor *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 1987a).

Esa heterocronía entre especies amniotas y no amniotas indica que la génesis de las CSF-cN sufrió un adelantamiento (desplazamiento anterior) o un retraso (desplazamiento posterior) respecto del ancestro común (Smith, 2003).

La observación del desarrollo en lamprea arroja luz sobre esas posibilidades. La lamprea de mar (*Petromyzon marinus*) es considerada la especie más ancestral de los vertebrados existentes. En neurociencias, ha sido un modelo animal muy usado para el estudio de los centros generadores de patrones (CPG) que controlan la locomoción (Grillner, 1985; Grillner *et al.*, 2009). El estudio de su desarrollo embrionario ha sido relegado debido a su ciclo largo y complejo que comprende un período embrionario (~13 días), prolarval (~24 días) y larval (3-8 años), seguido por la metamorfosis y vida adulta (Osorio *et al.*, 2008).

En los embriones día 10 se detectan las primeras neuronas GABAérgicas, que continúan produciéndose en la prolarva temprana y se encuentran en la médula espinal ventral, adyacentes al ventrículo (Melendez-Ferro *et al.*, 2003). Su morfología indica que se trata de las CSF-cN y que se generan simultáneamente con las neuronas serotoninérgicas y motoneuronas espinales calretinina<sup>+</sup> (Abalo *et al.*, 2007; Vilorio *et al.*, 2008).

Eso sugiere que en el ancestro común de los vertebrados, las CSF-cN se generaban temprano junto con el resto de las neuronas espinales, y que en el curso evolutivo ocurrió un desplazamiento posterior en las especies amniotas.

## **La relación entre *Ascl1* y la heterocronía de las CSF-cN**

En esta tesis presentamos evidencias de que *Ascl1* no es necesario para el desarrollo de las CSF-cN en el pez cebra (Figura 27), y demostramos que, en el ratón, *Ascl1* actúa en

la generación tardía de las neuronas del canal central (Figuras 28-32). Proponemos entonces, que el reclutamiento de *Ascl1* a la red transcripcional que controla el destino de las CSF-cN en amniotas, ocurrió simultáneamente con el desplazamiento posterior de su generación. Para reforzar esa idea sería preciso evaluar la participación de *Ascl1* en el desarrollo de las CSF-cN en más especies de vertebrados, para así poder sustentar nuestra hipótesis.

Es interesante preguntarse si existen ventajas adaptativas asociadas a esa heterocronía. En ese sentido, podemos especular que el momento embrionario del desarrollo de las CSF-cN guarda relación con las funciones que cumplen. Sin embargo, el desplazamiento posterior en los amniotas pudo haber estado asociado a la posibilidad de generar una mayor cantidad de neuronas ventrales en los estadios neurogénicos tempranos, que constituyen los CPG de mayor complejidad de mamíferos, por ejemplo.

## **SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CSF-cN**

La extensa conservación de las CSF-cN espinales en todas las especies de vertebrados analizadas sugiere que cumplen una función relevante para los organismos (Vigh *et al.*, 2004; Vigh *et al.*, 1998). Dada su ubicación en la interfase entre el SNC y el CSF y sus características anatómicas, se han propuesto esencialmente dos tipos de funciones para las CSF-cN. En distintas especies recientemente se han encontrado evidencias que soportan una actividad mecanorreceptora o quimiorreceptora, en algunos casos de forma no excluyente.

### **Mecanorrecepción vs. quimiorrecepción**

Las CSF-cN se caracterizan por expresar el canal iónico *Pkd2l1*, que contribuye a su sensibilidad a cambios en el pH extracelular (Huang *et al.*, 2006; Orts-Del'immagine *et al.*, 2012) y a alteraciones en la osmolaridad (Orts-Del'immagine *et al.*, 2012), lo que permite proponer una función homeostática de monitoreo de la calidad del CSF. Recientemente se ha demostrado que la apertura de los canales *Pkd2l1* en las CSF-cN de ratón es capaz de generar despolarizaciones suficientes para disparar potenciales de acción (Orts-Del'immagine *et al.*, 2016). Esas evidencias, junto con el hecho de que las CSF-cN proyectan rostralmente, permiten proponer que las CSF-cN sensan cambios en el pH del

CSF en respuesta a acidosis e hipercapnia y actúan sobre, por ejemplo, centros del tallo cerebral que controlan respuestas homeostáticas (Orts-Del'immagine *et al.*, 2012).

Por otro lado, en lamprea y teleósteos se ha demostrado que las CSF-cN modulan circuitos locomotores. En la larva del pez cebra, la activación optogenética de las CSF-cN, modula la actividad natatoria, estimulando el movimiento cuando la larva está en reposo o reduciendo la locomoción si disparan durante un período activo (Fidelin *et al.*, 2015; Wyart *et al.*, 2009). En la lamprea, las CSF-cN establecen un plexo alrededor de las dendritas de las denominadas *edge cells*, sensibles al estiramiento. Las *edge cells* detectan el movimiento del cuerpo durante la locomoción y remiten esa información a los CPG del nado. Las CSF-cN regulan la sensibilidad de esas células y, por lo tanto, la integración de la información propioceptiva y motora (Alford *et al.*, 1990; Christenson *et al.*, 1991; Jalalvand *et al.*, 2014). Recientemente, se ha demostrado que las CSF-cN de la lamprea son neuronas sensoriales bimodales. El terminal en contacto con el CSF es capaz de detectar el movimiento del fluido, cambios en el pH y el movimiento del cuerpo de la lamprea, integrando así varias modalidades sensoriales diferentes (Jalalvand *et al.*, 2016). La expresión de Pkd2l1 en las CSF-cN de pez cebra sugiere que también en los teleósteos podrían funcionar como receptores bimodales (Djenoune *et al.*, 2014; Fidelin *et al.*, 2015).

En los mamíferos, aún es aventurado decir que las CSF-cN regulen la locomoción, en el contexto de los elementos neuronales identificados en los modelos actuales de los CPG (Goulding, 2009; Grillner *et al.*, 2009; Kiehn, 2016). De todas formas, las CSF-cN podrían actuar como mecanorreceptores del movimiento del CSF, e integrar esa información en otros *outputs*.

### **Función de las CSF-cN y heterocronía en su desarrollo**

Finalmente, es tentador especular sobre la relación entre las funciones tempranas de las CSF-cN y el momento de su desarrollo.

Teniendo en cuenta que las CSF-cN modulan la locomoción en los estadios larvales de pez cebra (Fidelin *et al.*, 2015; Wyart *et al.*, 2009), es posible imaginar que animales no amniotas contaron con una presión de selección para mantener la generación de las CSF-cN en las etapas iniciales del desarrollo. La posibilidad de contar tempranamente con circuitos motores completamente funcionales pudo ser fundamental para la supervivencia de la larva y ejercer presión de selección para el desarrollo de las CSF-cN en simultáneo con motoneuronas e interneuronas premotoras.

Por otro lado, si bien la función de las CSF-cN aún no ha sido completamente dilucidada, es claro que la locomoción no es importante durante el desarrollo embrionario de los amniotas. Adicionalmente, siguiendo la hipótesis quimiorreceptora, la producción de CSF por las células del plexo coroideo no comienza sino después de E12.5-E14.5 en el teléncefalo y cerebro posterior respectivamente (Lun *et al.*, 2015), por lo que recién a partir de esos estadios sería necesaria la función de monitoreo llevada a cabo por las CSF-cN. Eso podría constituir una relajación en la presión de selección para la generación temprana de las CSF-cN, permitiendo que se desplazara temporalmente la generación de las CSF-cN hacia estadios posteriores en el desarrollo de amniotas.

## CONCLUSIONES

La diferenciación celular en el SNC está clásicamente dividida en una primera etapa neurogénica, seguida por una fase gliogénica. Hemos identificado un evento neurogénico en estadios avanzados del desarrollo. La diferenciación de las CSF-cN en el contexto de un epitelio predominantemente comprometido con destinos gliales y endimarios implica la existencia de mecanismos dedicados que promueven la especificación neuronal y previenen la diferenciación glial. En esta tesis, identificamos que los factores de transcripción *Ascl1*, *Gata3* y *Gata2* se expresan secuencialmente en el curso del desarrollo de las CSF-cN. Los factores *Gata* controlan los pasos finales de la especificación, presentando diferencias en sus mecanismos entre los dos subtipos de CSF-cN, lo que refleja programas genéticos dedicados a cada uno. Por otra parte, *Ascl1* gobierna el proceso de diferenciación de las CSF-cN, poniendo en evidencia la existencia de un plan común a ambas subpoblaciones. Demostramos que *Ascl1* es clave en la asignación de una identidad neuronal a los progenitores tardíos de la médula espinal amniota. De esa forma, contribuimos a la comprensión de los mecanismos genéticos que controlan la diferenciación neuronal, aún en estadios predominantemente gliogénicos. El estudio de la conectividad de estas células asistirá al entendimiento del rol que estas neuronas cumplen en la médula espinal de mamíferos.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abalo XM, Villar-Cheda B, Melendez-Ferro M, Perez-Costas E, Anadon R y Rodicio MC (2007). *Development of the serotonergic system in the central nervous system of the sea lamprey*. Journal of chemical neuroanatomy 34, 29-46.
- Achim K, Peltopuro P, Lahti L, Tsai HH, Zachariah A, Astrand M, Salminen M, Rowitch D y Partanen J (2013). *The role of Tal2 and Tal1 in the differentiation of midbrain GABAergic neuron precursors*. Biology open 2, 990-997.
- Achim K, Salminen M y Partanen J (2014). *Mechanisms regulating GABAergic neuron development*. Cellular and molecular life sciences : CMLS 71, 1395-1415.
- Agduhr E (1922). *Über ein zentrales Sinnesorgan bei den Vertebraten*. . Z Anat Entwickl-Gesch 66, 223- 360.
- Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A y Garcia-Verdugo JM (2012). *Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth*. J Comp Neurol 520, 3528-3552.
- Alford S, Sigvardt KA y Williams TL (1990). *GABAergic control of rhythmic activity in the presence of strychnine in the lamprey spinal cord*. Brain research 506, 303-306.
- Altman J y Bayer SA (1984). *The development of the rat spinal cord*. Adv Anat Embryol Cell Biol 85, 1-164.
- Allende ML y Weinberg ES (1994). *The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant*. Dev Biol 166, 509-530.
- Andersen J, Urban N, Achimastou A, Ito A, Simic M, Ullom K, Martynoga B, Lebel M, Goritz C, Frisen J, et al. (2014). *A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells*. Neuron 83, 1085-1097.
- Arlotta P y Berninger B (2014). *Brains in metamorphosis: reprogramming cell identity within the central nervous system*. Curr Opin Neurobiol 27, 208-214.
- Arlotta P y Hobert O (2015). *Homeotic Transformations of Neuronal Cell Identities*. Trends Neurosci 38, 751-762.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD y Lake RJ (1999). *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science 284, 770-776.
- Balaskas N, Ribeiro A, Panovska J, Dessaud E, Sasai N, Page KM, Briscoe J y Ribes V (2012). *Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube*. Cell 148, 273-284.
- Barnabe-Heider F, Wasylnka JA, Fernandes KJ, Porsche C, Sendtner M, Kaplan DR y Miller FD (2005). *Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1*. Neuron 48, 253-265.
- Barth KA, Kishimoto Y, Rohr KB, Seydler C, Schulte-Merker S y Wilson SW (1999). *Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate*. Development 126, 4977-4987.

- Batista MF, Jacobstein J y Lewis KE (2008). *Zebrafish V2 cells develop into excitatory CiD and Notch signalling dependent inhibitory VeLD interneurons*. Dev Biol 322, 263-275.
- Battiste J, Helms AW, Kim EJ, Savage TK, Lagace DC, Mandyam CD, Eisch AJ, Miyoshi G y Johnson JE (2007). *Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord*. Development 134, 285-293.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A y Rowitch DH (2015). *Astrocyte development and heterogeneity*. Cold Spring Harbor perspectives in biology 7, a020362.
- Bernhardt RR, Patel CK, Wilson SW y Kuwada JY (1992). *Axonal trajectories and distribution of GABAergic spinal neurons in wildtype and mutant zebrafish lacking floor plate cells*. J Comp Neurol 326, 263-272.
- Bertrand N, Castro DS y Guillemot F (2002). *Proneural genes and the specification of neural cell types*. Nature reviews Neuroscience 3, 517-530.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M y Pierani A (2005). *Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium*. Nature neuroscience 8, 1002-1012.
- Binor E y Heathcote RD (2001). *Development of GABA-immunoreactive neuron patterning in the spinal cord*. J Comp Neurol 438, 1-11.
- Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson KD y Perkins AS (2012). *Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies*. Nucleic acids research 40, 5819-5831.
- Briscoe J y Ericson J (2001). *Specification of neuronal fates in the ventral neural tube*. Curr Opin Neurobiol 11, 43-49.
- Briscoe J y Novitsch BG (2008). *Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube*. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 363, 57-70.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM y Ericson J (2000). *A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube*. Cell 101, 435-445.
- Briscoe J y Small S (2015). *Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning*. Development 142, 3996-4009.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL y Ericson J (1999). *Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling*. Nature 398, 622-627.
- Brodbelt A y Stoodley M (2007). *CSF pathways: a review*. British journal of neurosurgery 21, 510-520.
- Brown JM y Storey KG (2000). *A region of the vertebrate neural plate in which neighbouring cells can adopt neural or epidermal fates*. Curr Biol 10, 869-872.
- Bruni JE (1998). *Ependymal development, proliferation, and functions: a review*. Microscopy research and technique 41, 2-13.

- Cai L, Morrow EM y Cepko CL (2000). *Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival*. *Development* 127, 3021-3030.
- Carcagno AL, Di Bella DJ, Goulding M, Guillemot F y Lanuza GM (2014). *Neurogenin3 restricts serotonergic neuron differentiation to the hindbrain*. *J Neurosci* 34, 15223-15233.
- Casarosa S, Fode C y Guillemot F (1999). *Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon*. *Development* 126, 525-534.
- Castro DS, Martynoga B, Parras C, Ramesh V, Pacary E, Johnston C, Drechsel D, Lebel-Potter M, Garcia LG, Hunt C, et al. (2011). *A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets*. *Genes Dev* 25, 930-945.
- Cepko C (2014). *Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny*. *Nature reviews Neuroscience* 15, 615-627.
- Cohen M, Briscoe J y Blassberg R (2013). *Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning*. *Curr Opin Genet Dev* 23, 423-428.
- Crone SA, Quinlan KA, Zagoraiou L, Droho S, Restrepo CE, Lundfald L, Endo T, Setlak J, Jessell TM, Kiehn O, et al. (2008). *Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord*. *Neuron* 60, 70-83.
- Charles MA, Saunders TL, Wood WM, Owens K, Parlow AF, Camper SA, Ridgway EC y Gordon DF (2006). *Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function*. *Mol Endocrinol* 20, 1366-1377.
- Christenson J, Alford S, Grillner S y Hokfelt T (1991). *Co-localized GABA and somatostatin use different ionic mechanisms to hyperpolarize target neurons in the lamprey spinal cord*. *Neuroscience letters* 134, 93-97.
- Dale N, Roberts A, Ottersen OP y Storm-Mathisen J (1987a). *The development of a population of spinal cord neurons and their axonal projections revealed by GABA immunocytochemistry in frog embryos*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232, 205-215.
- Dale N, Roberts A, Ottersen OP y Storm-Mathisen J (1987b). *The morphology and distribution of 'Kolmer-Agduhr cells', a class of cerebrospinal-fluid-contacting neurons revealed in the frog embryo spinal cord by GABA immunocytochemistry*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232, 193-203.
- Danesin C, Agius E, Escalas N, Ai X, Emerson C, Cochard P y Soula C (2006). *Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord*. *J Neurosci* 26, 5037-5048.
- Dasen JS, De Camilli A, Wang B, Tucker PW y Jessell TM (2008). *Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1*. *Cell* 134, 304-316.
- Dasen JS, Liu JP y Jessell TM (2003). *Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity*. *Nature* 425, 926-933.
- de Castro F, Lopez-Mascaraque L y De Carlos JA (2007). *Cajal: lessons on brain development*. *Brain research reviews* 55, 481-489.
- Del Barrio MG, Taveira-Marques R, Muroyama Y, Yuk DI, Li S, Wines-Samuelson M, Shen J, Smith HK, Xiang M, Rowitch D, et al. (2007). *A regulatory network involving Foxn4, Mash1 and*

*delta-like 4/Notch1 generates V2a and V2b spinal interneurons from a common progenitor pool.* Development 134, 3427-3436.

Del Bigio MR (1995). *The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid.* Glia 14, 1-13.

Deneen B, Ho R, Lukaszewicz A, Hochstim CJ, Gronostajski RM y Anderson DJ (2006). *The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord.* Neuron 52, 953-968.

Deneris ES y Wyler SC (2013). *Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health.* Nature neuroscience 15, 519-527.

Dessaud E, Ribes V, Balaskas N, Yang LL, Pierani A, Kicheva A, Novitsch BG, Briscoe J y Sasai N (2010). *Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog.* PLoS Biol 8, e1000382.

Djenoune L, Khabou H, Joubert F, Quan FB, Nunes Figueiredo S, Bodineau L, Del Bene F, Burckle C, Tostivint H y Wyart C (2014). *Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates.* Frontiers in neuroanatomy 8, 26.

Dougherty KJ, Zagoraiou L, Satoh D, Rozani I, Doobar S, Arber S, Jessell TM y Kiehn O (2013). *Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons.* Neuron 80, 920-933.

Dyachuk V, Furlan A, Shahidi MK, Giovenco M, Kaukua N, Konstantinidou C, Pachnis V, Memic F, Marklund U, Muller T, et al. (2014). *Neurodevelopment. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors.* Science 345, 82-87.

Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H y Jessell TM (1996). *Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity.* Cell 87, 661-673.

Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM y Briscoe J (1997). *Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling.* Cell 90, 169-180.

Fidelin K, Djenoune L, Stokes C, Prendergast A, Gomez J, Baradel A, Del Bene F y Wyart C (2015). *State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons.* Current Biology 25, 3035-3047.

Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ y Guillemot F (2000). *A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons.* Genes Dev 14, 67-80.

Fogarty M, Richardson WD y Kessar N (2005). *A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord.* Development 132, 1951-1959.

Fortini ME (2009). *Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation.* Developmental cell 16, 633-647.

Francius C, Harris A, Rucchin V, Hendricks TJ, Stam FJ, Barber M, Kurek D, Grosveld FG, Pierani A, Goulding M, et al. (2013). *Identification of multiple subsets of ventral interneurons and differential distribution along the rostrocaudal axis of the developing spinal cord.* PLoS ONE 8, e70325.

- Francius C, Ravassard P, Hidalgo-Figueroa M, Mallet J, Clotman F y Nardelli J (2015). *Genetic dissection of Gata2 selective functions during specification of V2 interneurons in the developing spinal cord*. *Developmental neurobiology* 75, 721-737.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Hu X, Liu Z, Jensen J y Qiu M (2003). *Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells: evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1+ ventral neural progenitor cells*. *J Comp Neurol* 456, 237-244.
- Ge W, He F, Kim KJ, Blanchi B, Coskun V, Nguyen L, Wu X, Zhao J, Heng JI, Martinowich K, et al. (2006). *Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1319-1324.
- Glasauer SM y Neuhauss SC (2014). *Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 289, 1045-1060.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, et al. (2003). *A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes*. *Nature* 425, 917-925.
- Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O y Goulding M (2006). *V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs*. *Nature* 440, 215-219.
- Goulding M (2009). *Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction*. *Nature reviews Neuroscience* 10, 507-518.
- Goulding M y Lamar E (2000). *Neuronal patterning: Making stripes in the spinal cord*. *Curr Biol* 10, R565-568.
- Goulding M, Lanuza G, Sapir T y Narayan S (2002). *The formation of sensorimotor circuits*. *Curr Opin Neurobiol* 12, 508-515.
- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR y Gruss P (1991). *Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis*. *The EMBO journal* 10, 1135-1147.
- Gouti M, Metzis V y Briscoe J (2015). *The route to spinal cord cell types: a tale of signals and switches*. *Trends in genetics* : TIG 31, 282-289.
- Gratzner HG (1982). *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication*. *Science* 218, 474-475.
- Grillner S (1985). *Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates*. *Science* 228, 143-149.
- Grillner S y Jessell TM (2009). *Measured motion: searching for simplicity in spinal locomotor networks*. *Current opinion in neurobiology* 19, 572-586.
- Grimaldi P, Parras C, Guillemot F, Rossi F y Wassef M (2009). *Origins and control of the differentiation of inhibitory interneurons and glia in the cerebellum*. *Dev Biol* 328, 422-433.
- Griveau A, Borello U, Causeret F, Tissir F, Boggetto N, Karaz S y Pierani A (2010). *A novel role for Dbx1-derived Cajal-Retzius cells in early regionalization of the cerebral cortical neuroepithelium*. *PLoS Biol* 8, e1000440.

- Gross MK, Dottori M y Goulding M (2002). *Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord*. *Neuron* 34, 535-549.
- Gross MK, Moran-Rivard L, Velasquez T, Nakatsu MN, Jagla K y Goulding M (2000). *Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb*. *Development* 127, 413-424.
- Guillemot F (2007). *Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes*. *Development* 134, 3771-3780.
- Guillemot F y Joyner AL (1993a). *Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system*. *Mechanisms of development* 42, 171-185.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ y Joyner AL (1993b). *Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons*. *Cell* 75, 463-476.
- Hargrave M, Karunaratne A, Cox L, Wood S, Koopman P y Yamada T (2000). *The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog*. *Dev Biol* 219, 142-153.
- Harper CE y Roberts A (1993). *Spinal cord neuron classes in embryos of the smooth newt Triturus vulgaris: a horseradish peroxidase and immunocytochemical study*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 340, 141-160.
- Haugas M, Lillevali K y Salminen M (2012). *Defects in sensory organ morphogenesis and generation of cochlear hair cells in Gata3-deficient mouse embryos*. *Hearing research* 283, 151-161.
- Hayashi S y McMahon AP (2002). *Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse*. *Dev Biol* 244, 305-318.
- Helms AW, Battiste J, Henke RM, Nakada Y, Simplicio N, Guillemot F y Johnson JE (2005). *Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons*. *Development* 132, 2709-2719.
- Henrique D, Abranches E, Verrier L y Storey KG (2015). *Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord*. *Development* 142, 2864-2875.
- Hobert O (2011). *Regulation of terminal differentiation programs in the nervous system*. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 681-696.
- Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q y Anderson DJ (2008). *Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code*. *Cell* 133, 510-522.
- Hosoya T, Maillard I y Engel JD (2010). *From the cradle to the grave: activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation*. *Immunological reviews* 238, 110-125.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ y Zuker CS (2006). *The cells and logic for mammalian sour taste detection*. *Nature* 442, 934-938.

- Huang T, You Y, Spoor MS, Richer EJ, Kudva VV, Paige RC, Seiler MP, Liebler JM, Zabner J, Plopper CG, et al. (2003). *Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells*. *Journal of cell science* 116, 4935-4945.
- Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, Kawaguchi K, Kori H, Miyachi H, Fujiwara T, Ishidate F y Kageyama R (2013). *Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors*. *Science* 342, 1203-1208.
- Imayoshi I y Kageyama R (2014). *bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells*. *Neuron* 82, 9-23.
- Imayoshi I, Shimogori T, Ohtsuka T y Kageyama R (2008). *Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline*. *Development* 135, 2531-2541.
- Inada H, Kawabata F, Ishimaru Y, Fushiki T, Matsunami H y Tominaga M (2008). *Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3–PKD2L1*. *EMBO Reports* 9, 690-697.
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M y Matsunami H (2006). *Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12569-12574.
- Jacob J, Storm R, Castro DS, Milton C, Pla P, Guillemot F, Birchmeier C y Briscoe J (2009). *Insm1 (IA-1) is an essential component of the regulatory network that specifies monoaminergic neuronal phenotypes in the vertebrate hindbrain*. *Development* 136, 2477-2485.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallen P y Grillner S (2016). *Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3*. *Nature communications* 7, 10002.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallen P, Hill RH y Grillner S (2014). *Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types*. *J Comp Neurol* 522, 1753-1768.
- Jessell TM (2000). *Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes*. *Nature reviews* 1, 20-29.
- Jessell TM y Goodman CS (1996). *Development: neural development: are there any surprises left?* *Curr Opin Neurobiol* 6, 1-2.
- Jessell TM y Sanes JR (2000). *The induction and patterning of the nervous system*. In *Principles of neural science*, ER Kandel, JH Schwartz, yTM Jessell, eds. (McGraw-Hill Companies), pp. 1020-1041
- Johnson JE, Birren SJ y Anderson DJ (1990). *Two rat homologues of Drosophila achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors*. *Nature* 346, 858-861.
- Joshi K, Lee S, Lee B, Lee JW y Lee SK (2009). *LMO4 controls the balance between excitatory and inhibitory spinal V2 interneurons*. *Neuron* 61, 839-851.
- Joyner AL y Zervas M (2006). *Genetic inducible fate mapping in mouse: establishing genetic lineages and defining genetic neuroanatomy in the nervous system*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235, 2376-2385.

- Kala K, Haugas M, Lillevali K, Guimera J, Wurst W, Salminen M y Partanen J (2009). *Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons*. *Development* 136, 253-262.
- Kang P, Lee HK, Glasgow SM, Finley M, Donti T, Gaber ZB, Graham BH, Foster AE, Novitsch BG, Gronostajski RM, et al. (2012). *Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis*. *Neuron* 74, 79-94.
- Karow M, Sanchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, Heinrich C, Gascon S, Khan MA, Lie DC, Dellavalle A, et al. (2012). *Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells*. *Cell Stem Cell* 11, 471-476.
- Karunaratne A, Hargrave M, Poh A y Yamada T (2002). *GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord*. *Dev Biol* 249, 30-43.
- Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML y Fuchs E (2003). *GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin*. *Genes Dev* 17, 2108-2122.
- Kaufman MH (1992). *The Atlas of Mouse Development* (Academic Press).
- Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Maruyama Y, Yanagawa Y, Murakami S y Tominaga M (2010). *Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 17277-17281.
- Kicheva A y Briscoe J (2015). *Developmental Pattern Formation in Phases*. *Trends Cell Biol* 25, 579-591.
- Kiehn O (2006). *Locomotor circuits in the mammalian spinal cord*. *Annual Review of Neuroscience* 29, 279-306.
- Kiehn O (2016). *Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion*. *Nature reviews Neuroscience*.
- Kiehn O y Butt SJ (2003). *Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord*. *Progress in neurobiology* 70, 347-361.
- Kim EJ, Ables JL, Dickel LK, Eisch AJ y Johnson JE (2011). *Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain*. *PLoS One* 6, e18472.
- Kimura Y, Satou C y Higashijima S (2008). *V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord*. *Development* 135, 3001-3005.
- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN y Appel B (2006). *In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development*. *Nature neuroscience* 9, 1506-1511.
- Kolmer W (1921). *Das "Sagittalorgan" der Wirbeltiere*. *Z Anat Entwickl-Gesch* 60, 652-717.
- Kriks S, Lanuza GM, Mizuguchi R, Nakafuku M y Goulding M (2005). *Gsh2 is required for the repression of Ngn1 and specification of dorsal interneuron fate in the spinal cord*. *Development* 132, 2991-3002.
- Kutna V, Sevc J, Gombalova Z, Matiasova A y Daxnerova Z (2014). *Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during*

*embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. Acta histochemica* 116, 278-285.

Lahti L, Haugas M, Tikker L, Airavaara M, Voutilainen MH, Anttila J, Kumar S, Inkinen C, Salminen M y Partanen J (2015). *Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. Development.*

LaMotte CC (1987). *Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. J Comp Neurol* 258, 527-541.

Landolt E (1871). *Beitrag zur Anatomie der Retina vom Frosch, Salamander und Triton. Archiv f mikrosk Anatomie* 7, 81-100.

Lanuza GM, Gosgnach S, Pierani A, Jessell TM y Goulding M (2004). *Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. Neuron* 42, 375-386.

Lendahl U, Zimmerman LB y McKay RD (1990). *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell* 60, 585-595.

Li S, Mattar P, Zinyk D, Singh K, Chaturvedi CP, Kovach C, Dixit R, Kurrasch DM, Ma YC, Chan JA, et al. (2012). *GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. J Neurosci* 32, 7791-7805.

Li S, Misra K, Matisse MP y Xiang M (2005). *Foxn4 acts synergistically with Mash1 to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10688-10693.

Li S, Misra K y Xiang M (2010). *A Cre transgenic line for studying V2 neuronal lineages and functions in the spinal cord. Genesis* 48, 667-672.

Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM y Xiang M (2004). *Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. Neuron* 43, 795-807.

Liem KF, Jr., Tremml G, Roelink H y Jessell TM (1995). *Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. Cell* 82, 969-979.

Lillevali K, Matilainen T, Karis A y Salminen M (2004). *Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 231, 775-781.

Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F y Engel JD (2000). *Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. Nat Genet* 25, 209-212.

Litingtung Y y Chiang C (2000). *Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. Nature neuroscience* 3, 979-985.

Liu A y Niswander LA (2005). *Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. Nature reviews Neuroscience* 6, 945-954.

Livesey FJ y Cepko CL (2001). *Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. Nature reviews Neuroscience* 2, 109-118.

- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T y Anderson DJ (1991). *Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells*. *Genes Dev* 5, 1524-1537.
- Lopez-Munoz F, Boya J y Alamo C (2006). *Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramon y Cajal*. *Brain research bulletin* 70, 391-405.
- Lowry JA y Atchley WR (2000). *Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain*. *Journal of molecular evolution* 50, 103-115.
- Lun MP, Monuki ES y Lehtinen MK (2015). *Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system*. *Nature reviews Neuroscience* 16, 445-457.
- Lundfald L, Restrepo CE, Butt SJ, Peng CY, Droho S, Endo T, Zeilhofer HU, Sharma K y Kiehn O (2007). *Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord*. *Eur J Neurosci* 26, 2989-3002.
- Maden M (2006). *Retinoids and spinal cord development*. *Journal of neurobiology* 66, 726-738.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, et al. (2011). *A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain*. *Nature neuroscience* 13, 133-140.
- Marichal N, Garcia G, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O y Russo RE (2009). *Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"?* *J Neurosci* 29, 10010-10024.
- Marichal N, Garcia G, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O y Russo RE (2012). *Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord*. *Stem Cells* 30, 2020-2031.
- Martin SC, Heinrich G y Sandell JH (1998). *Sequence and expression of glutamic acid decarboxylase isoforms in the developing zebrafish*. *J Comp Neurol* 396, 253-266.
- Melendez-Ferro M, Perez-Costas E, Villar-Cheda B, Rodriguez-Munoz R, Anadon R y Rodicio MC (2003). *Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rhombencephalon and spinal cord of the sea lamprey*. *J Comp Neurol* 464, 17-35.
- Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O y Frisen J (2008). *Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells*. *PLoS Biol* 6, e182.
- Miller FD y Gauthier AS (2007). *Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex*. *Neuron* 54, 357-369.
- Miller MW y Nowakowski RS (1988). *Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system*. *Brain research* 457, 44-52.
- Mizuguchi R, Kriks S, Cordes R, Gossler A, Ma Q y Goulding M (2006). *Ascl1 and Gsh1/2 control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons*. *Nature neuroscience* 9, 770-778.
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K y Nakafuku M (2001). *Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons*. *Neuron* 31, 757-771.

- Molofsky AV, Kelley KW, Tsai HH, Redmond SA, Chang SM, Madireddy L, Chan JR, Baranzini SE, Ullian EM y Rowitch DH (2014). *Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity*. *Nature* 509, 189-194.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR y Macklis JD (2007). *Neuronal subtype specification in the cerebral cortex*. *Nature reviews Neuroscience* 8, 427-437.
- Moriguchi T, Takako N, Hamada M, Maeda A, Fujioka Y, Kuroha T, Huber RE, Hasegawa SL, Rao A, Yamamoto M, et al. (2006). *Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation*. *Development* 133, 3871-3881.
- Muller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell TM y Birchmeier C (2002). *The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord*. *Neuron* 34, 551-562.
- Muroyama Y, Fujiwara Y, Orkin SH y Rowitch DH (2005). *Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube*. *Nature* 438, 360-363.
- Naka H, Nakamura S, Shimazaki T y Okano H (2008). *Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development*. *Nature neuroscience* 11, 1014-1023.
- Nakatani H, Martin E, Hassani H, Clavairoly A, Maire CL, Viadieu A, Kerninon C, Delmas A, Frah M, Weber M, et al. (2013). *Ascl1/Mash1 promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination*. *J Neurosci* 33, 9752-9768.
- Namihira M, Kohyama J, Semi K, Sanosaka T, Deneen B, Taga T y Nakashima K (2009). *Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells*. *Developmental cell* 16, 245-255.
- Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY y Orkin SH (1999). *Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system*. *Dev Biol* 210, 305-321.
- National Research Council (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition* (Washington, DC: The National Academies Press).
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O y Guillemot F (2001). *Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors*. *Neuron* 29, 401-413.
- Novitsch BG, Chen AI y Jessell TM (2001). *Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2*. *Neuron* 31, 773-789.
- Ogawa Y, Takebayashi H, Takahashi M, Osumi N, Iwasaki Y y Ikenaka K (2005). *Gliogenic radial glial cells show heterogeneity in the developing mouse spinal cord*. *Developmental neuroscience* 27, 364-377.
- Oosterveen T, Kurdija S, Alekseenko Z, Uhde CW, Bergsland M, Sandberg M, Andersson E, Dias JM, Muhr J y Ericson J (2012). *Mechanistic differences in the transcriptional interpretation of local and long-range Shh morphogen signaling*. *Developmental cell* 23, 1006-1019.
- Oosterveen T, Kurdija S, Enstero M, Uhde CW, Bergsland M, Sandberg M, Sandberg R, Muhr J y Ericson J (2013). *SoxB1-driven transcriptional network underlies neural-specific interpretation of morphogen signals*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7330-7335.

- Orts-Del'Immagine A, Kastner A, Tillement V, Tardivel C, Trouslard J y Wanaverbecq N (2014). *Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice*. PLoS One 9, e87748.
- Orts-Del'Immagine A, Seddik R, Tell F, Airault C, Er-Raoui G, Najimi M, Trouslard J y Wanaverbecq N (2016). *A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem*. Neuropharmacology 101, 549-565.
- Orts-Del'Immagine A, Wanaverbecq N, Tardivel C, Tillement V, Dallaporta M y Trouslard J (2012). *Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem*. The Journal of physiology 590, 3719-3741.
- Osorio J y Retaux S (2008). *The lamprey in evolutionary studies*. Dev Genes Evol 218, 221-235.
- Pacary E, Heng J, Azzarelli R, Riou P, Castro D, Lebel-Potter M, Parras C, Bell DM, Ridley AJ, Parsons M, et al. (2011). *Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling*. Neuron 69, 1069-1084.
- Panayi H, Panayiotou E, Orford M, Genethliou N, Mean R, Lapathitis G, Li S, Xiang M, Kessar N, Richardson WD, et al. (2010). *Sox1 is required for the specification of a novel p2-derived interneuron subtype in the mouse ventral spinal cord*. J Neurosci 30, 12274-12280.
- Panayiotou E, Panayi E, Lapathitis G, Francius C, Clotman F, Kessar N, Richardson WD y Malas S (2013). *Pax6 is expressed in subsets of V0 and V2 interneurons in the ventral spinal cord in mice*. Gene expression patterns : GEP 13, 328-334.
- Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD y Lindenbaum MH (1995). *Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis*. Nat Genet 11, 40-44.
- Park HC y Appel B (2003). *Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification*. Development 130, 3747-3755.
- Park HC, Shin J y Appel B (2004). *Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling*. Development 131, 5959-5969.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A y Guillemot F (2004). *Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain*. The EMBO journal 23, 4495-4505.
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ y Guillemot F (2002). *Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity*. Genes Dev 16, 324-338.
- Pattyn A, Guillemot F y Brunet JF (2006). *Delays in neuronal differentiation in Mash1/Ascl1 mutants*. Dev Biol 295, 67-75.
- Pattyn A, Simplicio N, van Doorninck JH, Goridis C, Guillemot F y Brunet JF (2004). *Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons*. Nature neuroscience 7, 589-595.
- Peng CY, Yajima H, Burns CE, Zon LI, Sisodia SS, Pfaff SL y Sharma K (2007). *Notch and MAML signaling drives Scl-dependent interneuron diversity in the spinal cord*. Neuron 53, 813-827.

- Persson M, Stamatakis D, te Welscher P, Andersson E, Bose J, Ruther U, Ericson J y Briscoe J (2002). *Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity*. *Genes Dev* 16, 2865-2878.
- Peterson KA, Nishi Y, Ma W, Vedenko A, Shokri L, Zhang X, McFarlane M, Baizabal JM, Junker JP, van Oudenaarden A, et al. (2012). *Neural-specific Sox2 input and differential Gli-binding affinity provide context and positional information in Shh-directed neural patterning*. *Genes Dev* 26, 2802-2816.
- Petracca YL, Sartoretti MM, Di Bella DJ, Marin-Burgin A, Carcagno AL, Schinder AF y Lanuza GM (2016). *The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord*. *Development* 143, 880-891.
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C y Jessell TM (1999). *A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord*. *Cell* 97, 903-915.
- Pierani A, Moran-Rivard L, Sunshine MJ, Littman DR, Goulding M y Jessell TM (2001). *Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1*. *Neuron* 29, 367-384.
- Pierfelice T, Alberi L y Gaiano N (2011). *Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks*. *Neuron* 69, 840-855.
- Pogoda HM, von der Hardt S, Herzog W, Kramer C, Schwarz H y Hammerschmidt M (2006). *The proneural gene ascl1a is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis*. *Development* 133, 1079-1089.
- Quan XJ, Yuan L, Tiberi L, Claeys A, De Geest N, Yan J, van der Kant R, Xie WR, Klisch TJ, Shymkowitz J, et al. (2016). *Post-translational Control of the Temporal Dynamics of Transcription Factor Activity Regulates Neurogenesis*. *Cell* 164, 460-475.
- Rabadan MA, Cayuso J, Le Dreau G, Cruz C, Barzi M, Pons S, Briscoe J y Marti E (2012). *Jagged2 controls the generation of motor neuron and oligodendrocyte progenitors in the ventral spinal cord*. *Cell death and differentiation* 19, 209-219.
- Rakic P (1988). *Specification of cerebral cortical areas*. *Science* 241, 170-176.
- Rela L, Bordey A y Greer CA (2010). *Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity*. *Glia* 58, 665-678.
- Richardson WD, Kessaris N y Pringle N (2006). *Oligodendrocyte wars*. *Nature reviews Neuroscience* 7, 11-18.
- Rocha SF, Lopes SS, Gossler A y Henrique D (2009). *Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity*. *Dev Biol* 328, 54-65.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA y Jessell TM (1995). *Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis*. *Cell* 81, 445-455.
- Rowitch DH (2004). *Glial specification in the vertebrate neural tube*. *Nature reviews Neuroscience* 5, 409-419.

- Rowitch DH y Kriegstein AR (2010). *Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification*. Nature 468, 214-222.
- Russo RE, Fernandez A, Reali C, Radmilovich M y Trujillo-Cenoz O (2004). *Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord*. The Journal of physiology 560, 831-838.
- Sabelstrom H, Stenudd M, Reu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, Damberg P, Goritz C y Frisen J (2013). *Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice*. Science 342, 637-640.
- Sabourin JC, Ackema KB, Ohayon D, Guichet PO, Perrin FE, Garces A, Ripoll C, Charite J, Simonneau L, Kettenmann H, et al. (2009). *A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord*. Stem Cells 27, 2722-2733.
- Sander M, Paydar S, Ericson J, Briscoe J, Berber E, German M, Jessell TM y Rubenstein JL (2000). *Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates*. Genes Dev 14, 2134-2139.
- Sapir T, Geiman EJ, Wang Z, Velasquez T, Mitsui S, Yoshihara Y, Frank E, Alvarez FJ y Goulding M (2004). *Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of rensaw cell development*. J Neurosci 24, 1255-1264.
- Scardigli R, Schuurmans C, Gradwohl G y Guillemot F (2001). *Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord*. Neuron 31, 203-217.
- Scott CE, Wynn SL, Sesay A, Cruz C, Cheung M, Gomez Gaviro MV, Booth S, Gao B, Cheah KS, Lovell-Badge R, et al. (2010). *SOX9 induces and maintains neural stem cells*. Nature neuroscience 13, 1181-1189.
- Schafer M, Kinzel D y Winkler C (2007). *Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish*. Developmental biology 301, 117-129.
- Schuurmans C y Guillemot F (2002). *Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon*. Curr Opin Neurobiol 12, 26-34.
- Semmo M, Kottgen M y Hofherr A (2014). *The TRPP subfamily and polycystin-1 proteins*. Handbook of experimental pharmacology 222, 675-711.
- Seredick S, Hutchinson SA, Van Ryswyk L, Talbot JC y Eisen JS (2014). *Lhx3 and Lhx4 suppress Kolmer-Agduhr interneuron characteristics within zebrafish axial motoneurons*. Development 141, 3900-3909.
- Shimizu T, Janssens A, Voets T y Nilius B (2009). *Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume*. Pflugers Archiv : European journal of physiology 457, 795-807.
- Shin J, Poling J, Park HC y Appel B (2007). *Notch signaling regulates neural precursor allocation and binary neuronal fate decisions in zebrafish*. Development 134, 1911-1920.
- Shirasaki R y Pfaff SL (2002). *Transcriptional codes and the control of neuronal identity*. Annu Rev Neurosci 25, 251-281.
- Smith KK (2003). *Time's arrow: heterochrony and the evolution of development*. The International journal of developmental biology 47, 613-621.

- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM y Alvarez-Buylla A (2005). *Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis*. J Neurosci 25, 10-18.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM y Costantini F (2001). *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC developmental biology 1, 4.
- Stam FJ, Hendricks TJ, Zhang J, Geiman EJ, Francius C, Labosky PA, Clotman F y Goulding M (2012). *Renshaw cell interneuron specialization is controlled by a temporally restricted transcription factor program*. Development 139, 179-190.
- Stamatakis D, Ulloa F, Tsoni SV, Mynett A y Briscoe J (2005). *A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube*. Genes Dev 19, 626-641.
- Stern CD (2001). *Initial patterning of the central nervous system: how many organizers?* Nature reviews Neuroscience 2, 92-98.
- Stern CD (2005). *Neural induction: old problem, new findings, yet more questions*. Development 132, 2007-2021.
- Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein MJ, Mutterer J, Freund-Mercier MJ y Schlichter R (2003). *Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study*. J Comp Neurol 457, 159-174.
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A y Wegner M (2003). *The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord*. Genes Dev 17, 1677-1689.
- Studnicka FK (1900). *Untersuchungen über den Bau des Ependyms der nervösen Centralorgane*. Anat Hefte Wiesbaden 15, 303- 430.
- Sugimori M, Nagao M, Bertrand N, Parras CM, Guillemot F y Nakafuku M (2007). *Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord*. Development 134, 1617-1629.
- Sugimori M, Nagao M, Parras CM, Nakatani H, Lebel M, Guillemot F y Nakafuku M (2008). *Ascl1 is required for oligodendrocyte development in the spinal cord*. Development 135, 1271-1281.
- Suzuki N, Ohneda O, Minegishi N, Nishikawa M, Ohta T, Takahashi S, Engel JD y Yamamoto M (2006). *Combinatorial Gata2 and Sca1 expression defines hematopoietic stem cells in the bone marrow niche*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2202-2207.
- Takebayashi H, Ohtsuki T, Uchida T, Kawamoto S, Okubo K, Ikenaka K, Takeichi M, Chisaka O y Nabeshima Y (2002). *Non-overlapping expression of Olig3 and Olig2 in the embryonic neural tube*. Mechanisms of development 113, 169-174.
- Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M y Nabeshima Y (2000). *Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3*. Mechanisms of development 99, 143-148.

- Talpalar AE, Bouvier J, Borgius L, Fortin G, Pierani A y Kiehn O (2013). *Dual-mode operation of neuronal networks involved in left-right alternation*. *Nature* 500, 85-88.
- Tanabe Y y Jessell TM (1996). *Diversity and pattern in the developing spinal cord*. *Science* 274, 1115-1123.
- Temprana SG, Mongiat LA, Yang SM, Trincherio MF, Alvarez DD, Kropff E, Giacomini D, Beltramone N, Lanuza GM y Schinder AF (2015). *Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells*. *Neuron* 85, 116-130.
- Thaler J, Harrison K, Sharma K, Lettieri K, Kehrl J y Pfaff SL (1999). *Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9*. *Neuron* 23, 675-687.
- Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM y Hotamisligil GS (2000). *Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition*. *Science* 290, 134-138.
- Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, Bjorklund A, Grealish S y Parmar M (2013). *Generation of induced neurons via direct conversion in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7038-7043.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R y Schutz G (1999). *Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety*. *Nat Genet* 23, 99-103.
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW y Orkin SH (1994). *An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2*. *Nature* 371, 221-226.
- Tsai HH, Li H, Fuentealba LC, Molofsky AV, Taveira-Marques R, Zhuang H, Tenney A, Murnen AT, Fancy SP, Merkle F, et al. (2012). *Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair*. *Science* 337, 358-362.
- Tzouanacou E, Wegener A, Wymeersch FJ, Wilson V y Nicolas JF (2009). *Redefining the progression of lineage segregations during mammalian embryogenesis by clonal analysis*. *Developmental cell* 17, 365-376.
- Vallstedt A, Klos JM y Ericson J (2005). *Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain*. *Neuron* 45, 55-67.
- Vallstedt A, Muhr J, Pattyn A, Pierani A, Mendelsohn M, Sander M, Jessell TM y Ericson J (2001). *Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification*. *Neuron* 31, 743-755.
- van Doorninck JH, van Der Wees J, Karis A, Goedknegt E, Engel JD, Coesmans M, Rutteman M, Grosveld F y De Zeeuw CI (1999). *GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei*. *J Neurosci* 19, RC12.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC y Wernig M (2010). *Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors*. *Nature* 463, 1035-1041.
- Vigh-Teichmann I, Rohlich P, Vigh B y Aros B (1980). *Comparison of the pineal complex, retina and cerebrospinal fluid contacting neurons by immunocytochemical antirhodopsin reaction*. *Z Mikrosk Anat Forsch* 94, 623-640.

- Vigh-Teichmann I y Vigh B (1974). *The infundibular cerebrospinal-fluid contacting neurons*. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 50, 1-91.
- Vigh-Teichmann I y Vigh B (1983). *The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons*. *Arch Histol Jpn* 46, 427-468.
- Vigh B, Manzano e Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirok SJ, Szabo A, Lukats A y Szel A (2004). *The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain*. *Histol Histopathol* 19, 607-628.
- Vigh B y Vigh-Teichmann I (1971). *Structure of the medullo-spinal liquor contacting neuronal system*. *Acta Biol Acad Sci Hung* 22, 227-243.
- Vigh B y Vigh-Teichmann I (1992). *Cytochemistry of CSF-contacting neurons and pinealocytes*. *Progress in brain research* 91, 299-306.
- Vigh B y Vigh-Teichmann I (1998). *Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons*. *Microscopy research and technique* 41, 57-83.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I y Aros B (1977). *Special dendritic and axonal endings formed by the cerebrospinal fluid contacting neurons of the spinal cord*. *Cell Tissue Res* 183, 541-552.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I, Manzano e Silva MJ y van den Pol AN (1983). *Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates*. *Cell Tissue Res* 231, 615-621.
- Viloria A, Rodriguez-Alonso M, Costas V, Perez-Fernandez J, Pombal MA y Megias M (2008). *Developmental changes of calretinin immunoreactivity in the lamprey spinal cord*. *Brain research bulletin* 75, 428-432.
- Vinals F, Reiriz J, Ambrosio S, Bartrons R, Rosa JL y Ventura F (2004). *BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression*. *The EMBO journal* 23, 3527-3537.
- Virolainen SM, Achim K, Peltopuro P, Salminen M y Partanen J (2012). *Transcriptional regulatory mechanisms underlying the GABAergic neuron fate in different diencephalic prosomeres*. *Development* 139, 3795-3805.
- Vue TY, Kim EJ, Parras CM, Guillemot F y Johnson JE (2014). *Ascl1 controls the number and distribution of astrocytes and oligodendrocytes in the gray matter and white matter of the spinal cord*. *Development* 141, 3721-3731.
- Wildner H, Muller T, Cho SH, Brohl D, Cepko CL, Guillemot F y Birchmeier C (2006). *dILA neurons in the dorsal spinal cord are the product of terminal and non-terminal asymmetric progenitor cell divisions, and require Mash1 for their development*. *Development* 133, 2105-2113.
- Wyart C, Del Bene F, Warp E, Scott EK, Trauner D, Baier H y Isacoff EY (2009). *Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord*. *Nature* 461, 407-410.
- Yang L, Rastegar S y Strähle U (2010). *Regulatory interactions specifying Kolmer-Agduhr interneurons*. *Development* 137, 2713-2722.
- Yang SM, Alvarez DD y Schinder AF (2015). *Reliable Genetic Labeling of Adult-Born Dentate Granule Cells Using Ascl1 CreERT2 and Glaxt CreERT2 Murine Lines*. *J Neurosci* 35, 15379-15390.

- Yang X, Tomita T, Wines-Samuelson M, Beglopoulos V, Tansey MG, Kopan R y Shen J (2006). *Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord*. *Developmental neuroscience* 28, 102-117.
- Yeo SY y Chitnis AB (2007). *Jagged-mediated Notch signaling maintains proliferating neural progenitors and regulates cell diversity in the ventral spinal cord*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5913-5918.
- Yu K, McGlynn S y Matisse MP (2013). *Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord*. *Development* 140, 1594-1604.
- Zagoraoui L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM y Miles GB (2009). *A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity*. *Neuron* 64, 645-662.
- Zhang J, Lanuza GM, Britz O, Wang Z, Siembab VC, Zhang Y, Velasquez T, Alvarez FJ, Frank E y Goulding M (2014). *V1 and v2b interneurons secure the alternating flexor-extensor motor activity mice require for limbed locomotion*. *Neuron* 82, 138-150.
- Zhang Y, Narayan S, Geiman E, Lanuza GM, Velasquez T, Shanks B, Akay T, Dyck J, Pearson K, Gosgnach S, et al. (2008). *V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking*. *Neuron* 60, 84-96.
- Zhou Q y Anderson DJ (2002). *The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification*. *Cell* 109, 61-73.
- Zhou Q, Choi G y Anderson DJ (2001). *The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2*. *Neuron* 31, 791-807.
- Zhou Y, Yamamoto M y Engel JD (2000). *GATA2 is required for the generation of V2 interneurons*. *Development* 127, 3829-3838.
- Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban JF, Jr., Guo L y Paul WE (2004). *Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses*. *Nat Immunol* 5, 1157-1165.