

Tesis Doctoral

# Neuronas espinales que contactan el canal central: identificación de neurogénesis tardía en la médula espinal embrionaria

Petracca, Yanina Luján

2015-07-17

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Petracca, Yanina Luján. (2015-07-17). Neuronas espinales que contactan el canal central: identificación de neurogénesis tardía en la médula espinal embrionaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Petracca, Yanina Luján. "Neuronas espinales que contactan el canal central: identificación de neurogénesis tardía en la médula espinal embrionaria". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-07-17.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# **Neuronas espinales que contactan el canal central: identificación de neurogénesis tardía en la médula espinal embrionaria**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Yanina Lujan Petracca**

**Director de tesis: Dr. Guillermo Lanuza**

Consejero de Estudios: Dr. Dante Paz

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir- Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
de Buenos Aires (IIBBA), CONICET.

Buenos Aires, 17 de julio del 2015.

## **Resumen.**

### ***Neuronas espinales que contactan el canal central: Identificación de neurogénesis tardía en la médula espinal embrionaria.***

Uno de los problemas fundamentales en la neurobiología del desarrollo es cómo el neuroepitelio embrionario da lugar a la llamativa diversidad celular. Mi tesis de doctorado tiene por objetivo identificar la contribución de eventos neurogénicos embrionarios tardíos a la diversidad neuronal. Descubrimos que el canal central de la médula espinal del ratón contiene células que se originan en estadios embrionarios avanzados y determinamos su identidad como las Neuronas que contactan el líquido cerebroespinal (CSF-cNs). Las CSF-cNs expresan los factores de transcripción Gata2/3, y no pertenecen a las poblaciones neuronales embrionarias previamente descritas. Se distinguen por la expresión del canal iónico PKD2L1 y tienen propiedades activas de membrana, aunque inmaduras. Las CSF-cNs comienzan su diferenciación en estadio E14 en el ratón, momento en el cual en la médula espinal predomina la producción de oligodendrocitos y astrocitos. Mediante un análisis de marcadores moleculares, encontramos que la mayoría de las CSF-cNs derivan de progenitores ventrales “p2”, especificación controlada por mecanismos genéticos distintos de aquellos que gobiernan la neurogénesis temprana en este dominio. Identificamos asimismo, un segundo grupo de progenitores de CSF-cNs que se origina y ubica en el polo ventral del neuroepitelio espinal. El estudio de este grupo demostró que existen al menos dos sub-poblaciones de CSF-cNs que se diferencian en su ontogenia, propiedades electrofisiológicas y ubicación. En resumen, mi tesis demuestra que en el cordón espinal existe neurogénesis concomitantemente con la gliogénesis, se determinó la identidad de las neuronas producidas y algunos reguladores diferenciales de su especificación.

Palabras claves: Desarrollo, Neurogénesis, Tubo Neural, Médula Espinal, Canal Central.

## **Abstract.**

### ***Cerebrospinal Fluid-contacting Neurons: Identification of late neurogenesis in the embryonic spinal cord.***

One of most important questions in developmental neurobiology is how the embryonic progenitors of the neural tube give rise to the wide variety of specialized cells that make up the central nervous system. The general aim of my Ph.D. thesis is to analyze the contribution of late-embryonic neurogenic events to neuronal diversity. We found late-born cells surrounding the central canal of the mouse spinal cord and we identified them as Cerebrospinal Fluid-contacting Neurons (CSF -cNs). The CSF-cNs express the transcription factors Gata2/3 and are a novel population of cells, which do not belong to previously characterized embryonic neuronal classes. They selectively express the ionic channel PKD2L1 and display active membrane properties although, with immature characteristics. In the mice, the differentiation of CSF-cNs begins at stage E14 when oligo/astroglialogenesis is predominant. Our molecular analyses revealed that most CSF-cNs originate from ventral "p2" progenitors and that their specification is controlled by genetic mechanisms different from those involved in early neurogenesis from the same domain. In addition, we identified a second pool of CSF-cNs progenitors on the ventral pole of the spinal neuroepithelium. The analysis of this group demonstrates the existence of at least two subpopulations that are distinct in their ontogeny, electrophysiological properties and location. In summary, this work found that neurogenesis in the spinal cord during the gliogenic period give rise to CSF-cNs and also identified key regulators of their specification.

Key Words: Development, Neurogenesis, Neural Tube, Spinal Cord, Central Canal

*A mis papás,*

*A mis hermanos Aldi y Jo,*

*A mis abuelos Anita e Italo,*

*A mis maestros,*

*A Ed.*

## Agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mi director, Guillermo Lanuza, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y porque, incansablemente, me impulsó a buscar mi propio criterio y a superar las dificultades del día a día en la búsqueda de la excelencia.

A mis compañeros de labo Abel, Dani y Mica, por la paciencia, los innumerables debates, la ayuda desinteresada y el cariño de todos los días.

También agradezco a los miembros del laboratorio 307, a los de ahora y los de antes, especialmente a Anto, Ale y Georgi.

A los miembros del laboratorio 303-304 & *friends* por los caricaturescos momentos vividos, particularmente a Nacho, Gaby, Vani, Ine, Ruso, Her, Lau y Ramiro.

Agradezco a todos los integrantes de la FIL: personal de soporte, mantenimiento, biblioteca y recepción, técnicos, becarios, investigadores y autoridades, que colaboran para que el trabajo diario sea más agradable y sencillo.

A los miembros de mi CST, por sus observaciones y al CONICET por brindarme el financiamiento necesario para realizar mi doctorado.

Además, agradezco a mis compañeros del MINAGRI, por todas las anécdotas bizarras que compartimos y por bancarme durante la escritura de la tesis, especialmente a Mai, Facu, Emi, Sofi, Edu, Rober, Andy, Flor G., Flor P., Jime, Zane y Marce. A Martín por darme el tiempo para hacerlo.

A Mati, *my hilarious twin soul*, a Lu, mi ángel guardian y Leo M.T, mi ateo favorito, por confiar, por apoyarme/aguantarme y por contar siempre con su cariño.

Agradezco a Gret y a Marie, por su comprensión, empuje y por hacer más lindo el camino, no siempre recto, de la vida académica.

A mis amigas de la Facu y compañeras de aventuras, Flor y Lore, gracias por su constante presencia que me acompaña desinteresadamente en las buenas y en las otras.

Agradezco a Sole Gori, Patri, Juani F. y Gabi L., por estar, incluso a la distancia, por su ayuda y sus consejos.

A mis amigas de la infancia, Vicky, Romi y Juli, porque nuestro cariño y amistad trasciende el tiempo, por todos los lindos momentos juntas. También agradezco a mis bellos sobris, Nacho y Delfi, y al querido Christofer.

A mis maestros del alma, Enri, Mer, Lali, Friede, Silvi, Ale, Charly y Gladys. Por su ejemplo, sus enseñanzas, por su amor y por ayudarme a crecer y convertirme en mejor persona.

Agradezco a toda mi familia, especialmente a los abuelos Anita e Italo y la Tía Sonia, por su cariño y apoyo, por comprender las ausencias y estar siempre presentes.

A mis hermanos, Aldi y Josi, y por adopción Juani. Por sus consejos, retos, mimos y por crecer juntos.

A mamá y a papá, por sus valores, su incondicionalidad, su paciencia, su palabra certera, sus locuras y su infinito amor.

Agradezco mucho a Ed, mi amado, por su inmensa paciencia y comprensión, por aguantarme en “el modo tesis” y en los otros, por creer y ayudarme a confiar en mí, por su amor, por mostrarme la otra cara de la moneda y por motivarme a ser cada día mejor.

A Nero, por ser mi fiel compañero en las noches de insomnio y escritura, y en los despertares de juegos.

A los que me cuidan desde el cielo.

A los anónimos, los que siguen estando y los que pasaron, que dejaron y dejarán su huella en mi historia, también, muchas gracias.

# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract. ....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos. ....</b>	<b>iv</b>
<b>Abreviaturas. ....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
La médula espinal.....	2
Diversidad celular en la médula espinal. ....	3
Desarrollo del Sistema Nervioso Central de vertebrados.....	4
Inducción neural y neurulación. ....	5
Establecimiento de patterning neural-Identidad Posicional. ....	6
Eje Rostro- Caudal.....	7
Eje Dorso-Ventral. El rol del gradiente de Shh.....	8
Establecimiento de dominios de progenitores ventrales. ....	10
Especificación celular- Mecanismos de acción de las proteínas proneurales. ....	12
Diversidad neuronal en el tubo neural ventral: el caso de las Interneuronas V2..	14
Mecanismos de la especificación de interneuronas V2 tempranas.....	15
Generación de diversidad celular en la médula espinal - Rol del factor temporal.....	17
El desarrollo de astrocitos y oligodendrocitos espinales.....	18
Arquitectura del canal central.....	21
Las células que contactan el CSF. ....	23
<b>Objetivos. ....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
Animales.....	29
Cepas utilizadas en los distintos diseños experimentales. ....	30
Genotipificación de animales. ....	36
Extracción de ADN genómico. ....	36
Reacción de PCR. ....	36
Marcación con BrdU.....	39
Preparación de tejido espinal.....	40
Disección y criopreservación de tejido espinal.....	40
Obtención de secciones transversales de tejido espinal. ....	41



Inmunofluorescencia.....	41
Protocolo general. ....	41
Recuperación antigénica de BrdU por tratamiento ácido. ....	44
Hibridación in situ.....	45
Preparación de las sondas. Transcripción in vitro. ....	45
Protocolo general. ....	46
Tinción de la $\beta$ -galactosidasa.....	47
Microscopía. ....	47
Transporte retrógrado de dextranos.....	48
Desarrollo de anticuerpo contra la proteína m-PKD1L2.....	48
Electrofisiología: Registro en rebanadas agudas de cordón espinal. ....	50
Análisis Estadístico. ....	51
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
Diferenciación celular en la médula espinal ventral.....	53
Células del canal central se originan en el embrión avanzado. ....	53
Células en el epéndima expresan Gata2,Gata3. ....	55
Las CSF-cNs nacen tardíamente. ....	60
PKD2L1 se expresa en el desarrollo avanzado.....	60
Los progenitores de las CSF-cNs proliferan tarde en el desarrollo.....	63
Las CSF-cNs se producen en el período gliogénico.....	66
Las V2b y las CSF-cNs se distinguen por su dependencia de Foxn4. ....	68
Foxn4 controla la especificación V2b temprana.....	68
Las CSF-cNs no requieren de Foxn4 para su desarrollo.....	70
Las CSF-cNs derivan de progenitores espinales ventrales tardíos.....	72
Astrogénesis alterada produce un aumento de las CSF-cNs. ....	75
Las CSF-cNs son neuronas GABAérgicas inmaduras.....	79
Las CSF-cNs expresan marcadores moleculares de neuronas inmaduras. ....	79
Las CSF-cNs expresan la policistina 1, PKD1L2.....	80
La mayoría de las CSF-cNs son neuronas GABAérgicas. ....	82
El axón de las CSF-cNs proyecta rostralmente. ....	83
Las CSF-cNs presentan propiedades electrofisiológicas inmaduras. ....	86
Dos subpoblaciones de CSF-cNs se distinguen anatómica y electrofisiológicamente.....	88
Las subpoblaciones de CSF-cNs surgen de distintos dominios progenitores. ....	90
Las l-CSF-cNs y v-CSF-cNs se especifican por distintos mecanismos genéticos.....	91
Las l-CSF-cNs requieren de Pax6 para su desarrollo.....	91
Nkx2.2 es prescindible para el desarrollo de las CSF-cNs.....	94
Las v-cc CSF-cNs están presentes en embriones wild type y Pax6 <sup>-/-</sup> .....	97

<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>99</b>
Caracterización morfológica y molecular de las CSF-cNs.....	100
Las CSF-cNs son una nueva población Gata2 <sup>+</sup> ,Gata3 <sup>+</sup> . .....	101
La especificación de las CSF-cNs: rol de Ascl1 y Gata3.....	104
El origen dual de las CSF-cNs.....	106
El doble origen de las CSF-cNs, ¿está conservado evolutivamente? .....	107
¿Existen dos subtipos de CSF-cNs? .....	111
Heterocronía en el desarrollo de las CSF-cNs.....	112
Sobre la función de las CSF-cNs en los vertebrados.....	113
Conclusiones.....	118
 <b>REFERENCIAS.</b> .....	 <b>119</b>

## Abreviaturas.

BrdU	5-Bromo-2'deoxiUridina.
bHLH	<i>basic Helix Loop Helix</i> , dominio proteico básico hélice-bucle-hélice.
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> , proteínas morfogenéticas.
cc	Canal central.
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> , fluido cerebroespinal.
CSF-cNs	<i>Cerebrospinal fluid contacting neurons</i> , Células que contactan el fluido cerebroespinal.
DE	Desvío estándar.
DTA	<i>Diphtheria toxin A subunit</i> , Subunidad A de la toxina diftérica.
EE	Error estándar.
E(x)	Estadio embrionario (x), días post-coito.
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , Proteína verde fluorescente.
HD	Homeodominio
hpf	Horas post-fertilización.
KA	Células <i>Kolmer-Agduhr</i> .
MADM	Análisis mosaico con marcadores dobles.
MN	Motoneuronas.
Neo	Marcador de selección de resistencia a neomicina.
n.s.	No significativo.
O.N.	<i>Over night</i> , durante toda la noche.
OPC	<i>Oligodendrocyte precursor cells</i> , Células progenitoras de oligodendrocitos.
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , buffer fosfato salino.
PBS-Tw	PBS conteniendo 0.1% de <i>Tween-20</i> .
PFA	Paraformaldehído.
PKD2L1	<i>Polycystic Kidney Disease 2 Like 1</i> .
pp	Placa del piso.
pp-lat	Placa del piso lateral.

P(X)	Estadio postnatal (día).
p(x)	Dominio de progenitores de (población neural/glial).
SNC	Sistema Nervioso Central.
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i> .
T.A.	Temperatura ambiente.
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
V(0-3)	Población de interneuronas ventrales (0-3).
VA(0-3)	Población de astrocitos ventrales (0-3).
wt	<i>Wild type</i> , genotipo salvaje.
ZM	Zona del manto.
ZV	Zona ventricular.

# **INTRODUCCIÓN**

## **Introducción.**

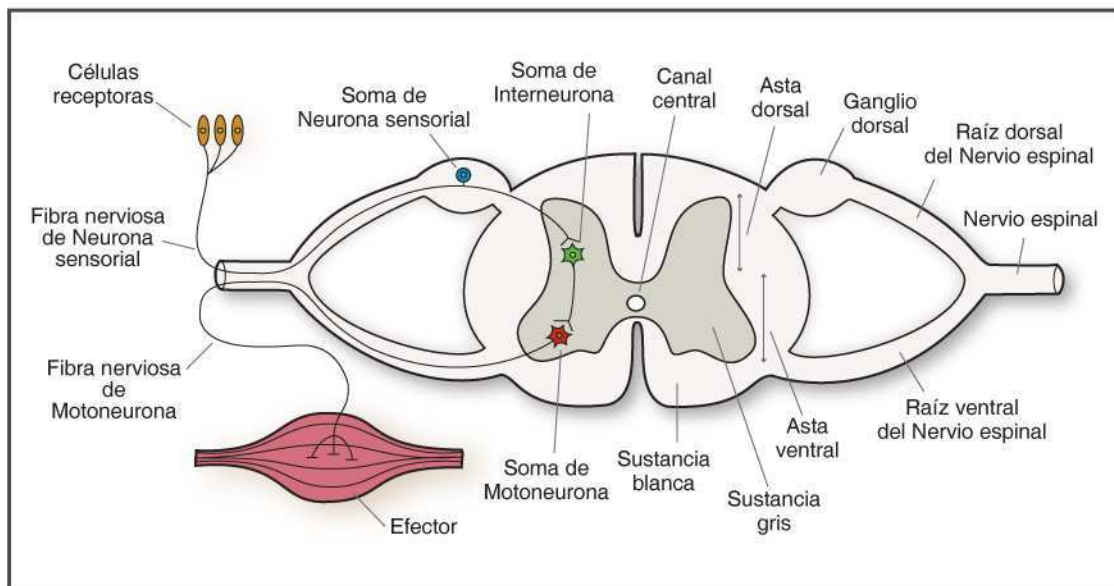
A pesar del considerable progreso que se ha alcanzado en el entendimiento de la especificación del destino celular en el tubo neural, aún restan elucidarse muchos aspectos acerca de cómo se origina durante el desarrollo, la variedad de tipos neuronales altamente especializados que encontramos en el adulto.

La parte caudal del tubo neural de mamíferos, la médula espinal, ha servido como un modelo pionero para entender la especificación de tipos celulares y cómo comienzan a ensamblarse en circuitos funcionales en el sistema nervioso central.

### ***La médula espinal.***

La médula espinal es la porción más caudal del SNC y constituye la principal vía de información entre el cerebro y el sistema nervioso periférico, recibe señales sensoriales desde el tronco y los miembros, y controla los movimientos voluntarios y la generación de respuestas reflejas (Jessell, 2000; Goulding, 2009).

En el plano transversal de la médula espinal adulta se distinguen: a) el canal central que es un conducto rodeado de células ependimarias, en cuyo interior circula el líquido cerebroespinal (CSF, sus siglas en inglés), b) la sustancia gris que tiene forma de “H o mariposa” y está constituida principalmente por los somas de interneuronas y motoneuronas, células de la neuroglia (astrocitos, oligodendrocitos, microglia) y axones no mielinizados, y c) la sustancia blanca que rodea la sustancia gris y comprende mayoritariamente fibras nerviosas motoras y sensitivas mielinizadas y neuroglia (Figura 1) (Amaral, 2000).



**Figura 1. Organización de la médula espinal.**

A través de raíces dorsales llegan las aferencias de las neuronas que tienen sus somas en los ganglios de las raíces dorsales y que colectan la información sensorial del tronco y los miembros. Las motoneuronas que se localizan en el asta ventral del cordón espinal envían las proyecciones axonales que inervan los músculos a través de las raíces ventrales. Las interneuronas en la sustancia gris participan de los circuitos motores y en la integración de la información sensorial.

### *Diversidad celular en la médula espinal.*

La fisiología y la conectividad de las neuronas de la médula espinal madura han sido particularmente bien delineadas. Estas células tienen dos funciones principales: el relevo de información sensorial cutánea hacia centros superiores en el cerebro y la integración de *inputs* propioceptivos y motores.

En la región dorsal de la médula espinal se concentran las neuronas y circuitos responsables del procesamiento e integración de la información recibida desde la periferia (nocicepción, mecanocepción, etc.). Los somas de las neuronas sensitivas se ubican en estructuras adyacentes a la médula espinal, los ganglios dorsales, y sus axones ingresan a la médula por las raíces dorsales (Figura 1) (Amaral, 2000; Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000).

En el área media ventral se encuentran confinadas principalmente las motoneuronas y distintas clases de interneuronas que forman parte de los circuitos

espinales involucrados en propiocepción y el control de la actividad motora. Los somas de las motoneuronas se localizan en la sustancia gris y sus axones se dirigen hacia los músculos *targets* a través de las raíces ventrales (Figura 1) (Amaral, 2000; Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000).

Otro grupo neural de los vertebrados son las células de la glía que, con diversos papeles en el mantenimiento de la función nerviosa, resultaron cruciales para el incremento de la complejidad del SNC a lo largo de la evolución (Rowitch, 2004; Rowitch and Kriegstein, 2010). Los principales subtipos macrogliales, los astrocitos y los oligodendrocitos, se encuentran distribuidos en todo el SNC maduro. Los astrocitos brindan apoyo estructural, regulan el balance hídrico y la distribución de iones. Además, se ha demostrado que participan en la señalización intercelular a través de flujos de calcio, la producción de neuropéptidos y la modulación de la transmisión sináptica. Por su parte, los oligodendrocitos interactúan con los somas y los axones neuronales y participan en la formación de la vaina de mielina indispensable para el fenómeno de conducción nerviosa saltatoria (Rowitch, 2004; Rowitch and Kriegstein, 2010).

### ***Desarrollo del Sistema Nervioso Central de vertebrados.***

La construcción del sistema nervioso de vertebrados involucra una serie de pasos complejos e integrados. Se destacan tres eventos clave: a) la inducción neural, que resulta en la formación de la placa neural a partir de una población uniforme de células progenitoras del ectodermo, b) la neurulación, donde el tejido adquiere una estructura cilíndrica, el tubo neural, y c) el establecimiento del *patterning* neural, paso indispensable para la generación de distintos tipos neuronales y gliales, los cuales migran posteriormente hacia su destino final y completan su maduración (Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000; Rowitch, 2004; Ge et al., 2006; Rowitch and Kriegstein, 2010).



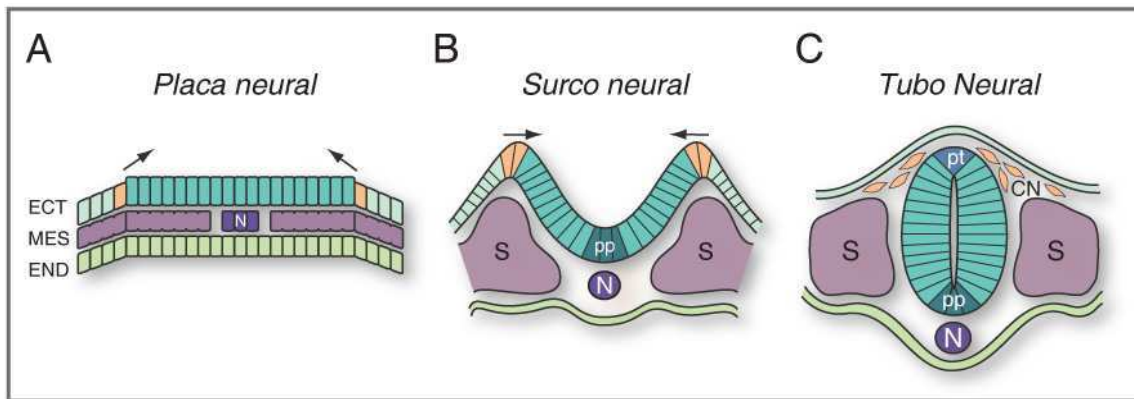
*Inducción neural y neurulación.*

Temprano en el desarrollo, el embrión sufre el proceso de gastrulación que resulta en el establecimiento de las tres capas germinales: a) el endodermo, la lámina más interna que da lugar al tubo digestivo y los pulmones, b) el mesodermo, la capa media que origina la notocorda y los tejidos musculares, conectivo y vascular y c) el ectodermo, ubicado en el exterior del embrión, a partir del cual se genera el sistema nervioso y la epidermis (Figura 2A).

La totalidad del ectodermo tiene la potencialidad de diferenciarse en tejido nervioso, lo que es más, la diferenciación neural es el destino que las células ectodérmicas adoptan por defecto. Sin embargo, señales de la familia de las *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP, proteínas morfogenéticas óseas) favorecen la diferenciación a epidermis.

La notocorda es una estructura exclusiva de los cordados que se extiende por la línea media debajo del ectodermo. Este tejido y el mesodermo axial secretan proteínas que actúan como inductores neurales. La Nogina, Cordina y Folistatina, secuestran a las BMP y promueven la diferenciación de las células del ectodermo adyacente dando origen a un neuroepitelio columnar, la placa neural. Este fenómeno es denominado inducción neural (Figura 2A) (Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000).

Posteriormente, en la neurulación, el neuroepitelio comienza a angostarse apicalmente en la línea media dorsal de la placa neural y se establece una región de bisagra. Producto de fuerzas tanto intrínsecas como extrínsecas, se genera el surco neural que se extiende y profundiza a lo largo del eje rostro-caudal (Figura 2B). Los extremos de la placa se elevan hasta fusionarse dorsalmente, el ectodermo adyacente se estrangula y queda formado el tubo neural (Figura 2C) (Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000). El punto bisagra ventral del neuroepitelio, se diferencia en la placa del piso, mientras que el dorsal, donde se fusionan los extremos, constituye el techo de la misma. Las células progenitoras del neuroepitelio quedan ubicadas en la zona media del tubo neural en contacto con la cavidad ventricular, región que recibe el nombre de zona ventricular.



**Figura 2. Etapas tempranas del desarrollo del Sistema Nervioso Central.**

A) Durante el proceso de inducción neural, la porción del ectodermo (ECT) ubicada en la línea media se diferencia a placa neural (celestes oscuros) y conforman un epitelio columnar simple. Por debajo se ubican las células del mesodermo axial de la notocorda (N), y mesodermo paraxial (más tarde los somitas) (S) y está flanqueada por ectodermo epidérmico (celestes claros).

B) En la neurulación, las células se angostan y la placa neural comienza a plegarse formándose el surco neural. Los extremos de la placa se elevan y los pliegues neurales convergen dorsalmente y se fusionan. Las células de la placa del piso (pp) se evidencian en la línea media ventral, y el mesodermo somítico (S) comienza a desarrollarse. Finalmente el ectodermo neural se independiza del epidérmico quedando formado el tubo neural.

C) En el tubo neural, las células de la placa del techo (pt) se diferencian en la línea media dorsal y las células de la cresta neural (CN), que posteriormente dan lugar a las neuronas de los nervios periféricos, entre otras poblaciones, comienzan a delaminar desde el tubo dorsal neural.

ECT, ectodermo; MES; mesodermo; END, endodermo. Figura adaptada de (Tanabe and Jessell, 1996).

### *Establecimiento de patterning neural-Identidad Posicional.*

Uno de los problemas fundamentales en la neurobiología del desarrollo es cómo el neuroepitelio embrionario indiferenciado puede dar lugar a la llamativa diversidad celular en el sistema nervioso central, que incluye neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células del epéndima (Jessell, 2000; Temple, 2001; Spassky et al., 2005; Rowitch and Kriegstein, 2010).

En los últimos 20 años, la identidad posicional ha emergido como uno de los principios de organización centrales en el control de la diversidad neural (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Guillemot, 2007; Briscoe and Novitch, 2008). De acuerdo a este modelo, se establecen temprano en el desarrollo, dominios discretos de progenitores

en la zona ventricular del tubo neural como resultado de la expresión de un código combinatorio de factores de transcripción, cuya inducción es iniciada por la señalización de gradientes morfogénicos (antero-posteriores y dorso-ventrales) (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Dessaud et al., 2007; Guillemot, 2007; Briscoe and Novitch, 2008). De esta forma, se determina una clave posicional en forma de grilla por la cual, la ubicación de una célula progenitora condiciona su destino.

La señalización a lo largo del eje rostro-caudal establece las principales subdivisiones del SNC: el cerebro anterior, medio y posterior y la médula espinal. Por otro lado, aquella en el eje dorso-ventral tiene un rol prominente en la creación de la diversidad celular en un segmento determinado (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Briscoe and Novitch, 2008). A continuación se describen los sistemas de señalización que instruyen la diferenciación neuronal en la médula espinal ventral, región del SNC que es el foco del presente trabajo.

### **Eje Rostro- Caudal.**

El carácter caudal de las células neurales emerge inmediatamente después de la inducción neural, a través de la reprogramación de destinos celulares por señales extrínsecas. Factores secretados, tanto por la línea primitiva durante la gastrulación como por el mesodermo paraxial posterior, determinan la adquisición de identidad caudal en las células del tubo neural que dan lugar a la médula espinal. Entre ellas se encuentran moléculas de la familia de *FGFs* (factores de crecimiento de fibroblastos), BMPs, Wnts y Retinoides (Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000; Liu et al., 2001; Maden, 2006).

Asimismo, la expresión de genes diferenciales en el eje rostro-caudal (por ejemplo, genes de la familia *Hox*) sugiere que las células neuronales ubicadas en distintas posiciones segmentales pueden exhibir características particulares. Tal es el caso de las motoneuronas, cuya organización depende de un código Hox, en la formación de neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo, la organización de la columna lateral a la altura de los miembros, o la segregación de

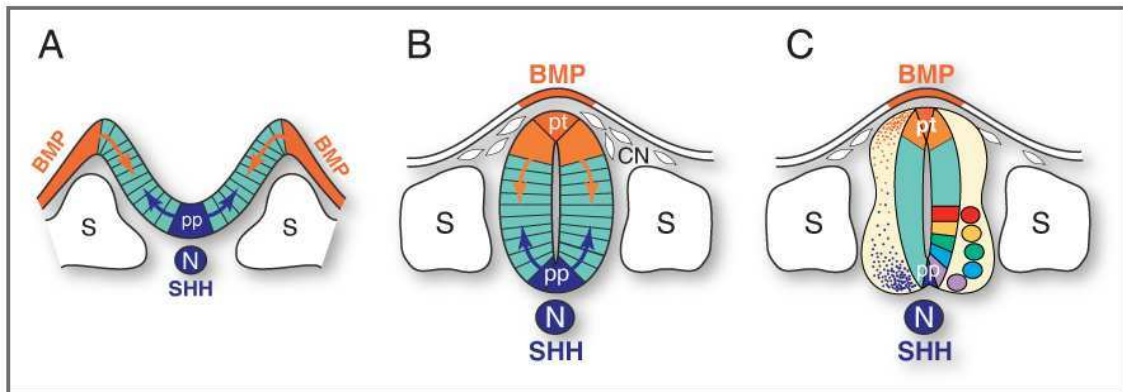
*pools* que inervan músculos específicos (Jessell, 2000; Liu et al., 2001; Shirasaki and Pfaff, 2002; Dasen et al., 2003; Dasen et al., 2008).

### **Eje Dorso-Ventral. El rol del gradiente de Shh.**

La ventralización de la médula espinal se inicia por señales difusibles provenientes de la notocorda que promueven la formación de la placa del piso en la línea media del surco neural. Una vez diferenciada, sus células actúan como fuente secundaria, contribuyendo al gradiente ventral alto-dorsal bajo de las moléculas señalizadoras (Figura 3A-C). Numerosos estudios han identificado a la proteína *Sonic hedgehog* (Shh) como el morfógeno secretado por estos centros organizadores ventrales (notocorda y placa del piso), responsable de la inducción de la identidad ventral del tubo neural (Figura 3C) (Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000).

El modelo aceptado propone que, concentraciones graduales y variables en dos o tres órdenes de magnitud de Shh a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural, inducen la adquisición de identidades progenitoras ventrales específicas. Consistentemente, los tipos neuronales generados en regiones más ventrales requieren para su inducción concentraciones de Shh mayores y por tiempos más prolongados (Figura 3C) (Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1996; Jessell, 2000; Lek et al., 2010; Balaskas et al., 2012).

Por ejemplo, la exposición *in vitro* de explantes neurales a distintas concentraciones de Shh promueve su diferenciación a neuronas ventrales particulares recapitulando la concentración de Shh que se requiere para su inducción *in vivo* y reproduciendo la distancia a los centros organizadores del tubo neural (Roelink et al., 1995; Ericson et al., 1996; Jessell, 2000; Dessaud et al., 2007; Dessaud et al., 2010; Balaskas et al., 2012). Asimismo, la eliminación de la señalización de Shh por manipulación farmacológica o genética, previene la diferenciación de los tipos neuronales más ventrales (Ericson et al., 1996; Jessell, 2000).



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

A) En las primeras etapas del desarrollo del SNC, se establecen centros organizadores que liberan señales difusibles. Las células de la notocorda (N, mesodermo axial) producen Shh, mientras que el ectodermo epidérmico que flanquea los bordes laterales de la placa neural, producen BMP. La acción de Shh induce la formación de la placa del piso (pp) en la línea media de la placa. Las células de la placa del piso comienzan a expresar Shh y las células en los extremos dorsales de los pliegues neurales generan BMP.

B) En el inicio de la diferenciación neuronal, luego del cierre del tubo neural, se produce BMP en la placa de techo (pt) y neuroepitelio dorsal adyacente, a la vez que la expresión en el ectodermo epidérmico queda restringida a la línea media dorsal. Además, se mantiene la expresión de Shh en las células de la notocorda y de la placa del piso. De esta manera, ambos centros organizadores en los polos liberan distintos morfógenos y quedan establecidos dos gradientes en el eje dorso-ventral.

C) Definido el gradiente de Shh, las diferentes concentraciones del morfógeno determinan el establecimiento de distintos dominios de progenitores ventrales en distintas posiciones a lo largo del eje dorso-ventral. Posteriormente, cada uno de estos dominios da origen a distintas poblaciones de neuronas ventrales temprano en el desarrollo.

S, somitos; CN, células de la cresta neural. Figura adaptada de (Tanabe and Jessell, 1996; Jessell, 2000).

Centros organizadores en el polo dorsal del tubo neural también participan en la inducción dorso-ventral. La placa del techo y el ectodermo epidérmico producen moléculas de morfógenos pertenecientes a la superfamilia de las *BMPs* y *Wnt* que contribuye a la diferenciación de las regiones progenitoras dorsales (Figura 3A-C) (Jessell, 2000; Nguyen et al., 2000; Caspary and Anderson, 2003; Ille et al., 2007). Existen evidencias de que los efectos de las BMPs pueden extenderse a la médula espinal ventral e interferir con la señalización de Shh. Antagonistas de la vía de BMP remueven la represión y hacen sensibles a las células progenitoras ventrales a las señales de Shh (McMahon et al., 1998; Barth et al., 1999; Jessell, 2000).

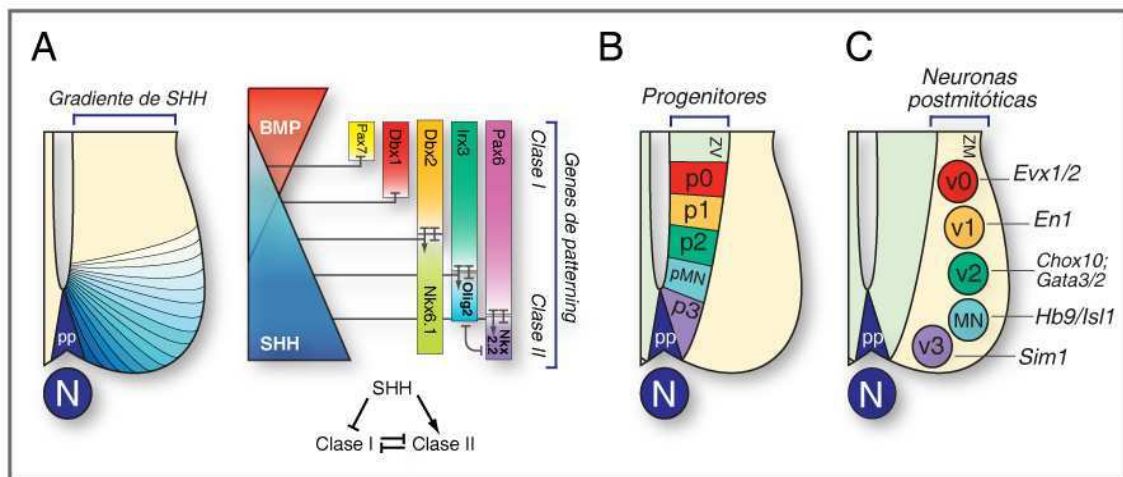
Los factores de transcripción de la familia *Gli* son los efectores principales de la vía de Shh. En presencia de Shh, Gli2 y Gli3 actúan como activadores transcripcionales y promueven destinos ventrales, mientras que en su ausencia el primero se proteoliza y el segundo actúa como un represor transcripcional de los genes blanco. En contraste con los embriones de ratones deficientes en Shh donde no se diferencian los tipos neuronales ventrales, los dobles mutantes para Shh y Gli3 recuperan un patrón prácticamente normal (exceptuando la región más ventral). Estas observaciones sugieren que la señalización de Shh des-reprime destinos ventrales intermedios y simultáneamente activa la especificación de las poblaciones más ventrales (Litingtung and Chiang, 2000).

#### **Establecimiento de dominios de progenitores ventrales.**

Estos hallazgos indican que la posición de una célula progenitora dentro del gradiente de actividad ventral alto-dorsal bajo de Shh dirige su diferenciación en subtipos neurales específicos. Sin embargo, se plantea el problema de cómo estos precursores interpretan este gradiente.

Los precursores ventrales expresan un grupo de genes que actúan como factores intermediarios en la interpretación de la señalización del gradiente de Shh. Entre estos encontramos a los factores de transcripción con homeodominio (*HD*, dominio proteico de unión a ADN) de la familia *Pax*, *Irx* y *Nkx*, y la proteína con el motivo *bHLH* (*basic Helix Loop Helix*, por el dominio proteico básico hélice-bucle-hélice) *Olig2* (Figura 4A) (Jessell, 2000; Briscoe and Ericson, 2001; Guillemot, 2007; Lek et al., 2010; Balaskas et al., 2012).

Las proteínas con HD pueden dividirse en dos clases, I y II. Las proteínas de Clase I son reprimidas al superarse ciertos niveles de actividad de Shh, por lo que definen el límite ventral de los dominios. Por el contrario, la expresión de las proteínas de Clase II requiere que la concentración de Shh supere un umbral y establecen los límites dorsales de estos dominios (Briscoe et al., 1999; Briscoe et al., 2000; Jessell and Sanes, 2000; Lek et al., 2010; Balaskas et al., 2012).



**Figura 4. La señalización por Shh especifica distintas neuronas espinales ventrales a través de la regulación de la expresión de factores de transcripción.**

A) Los gradientes opuestos de los dos morfógenos definen el *patterning* dorso-ventral. Distintas concentraciones de Shh a lo largo del cordón espinal ventral reprimen la expresión de los genes de *patterning* de clase I (por ejemplo, Pax6 y Dbx2) e inducen la expresión de factores de transcripción de clase II de forma específica (por ejemplo, Nkx2.2 y Nkx6.1). La represión cruzada entre pares de proteínas de clase I y II específicos (por ejemplo Pax6 y Nkx2.2) colabora al establecimiento de límites dorsales y ventrales definidos.

B) La combinación particular de genes de *patterning* de clase I y clase II que se expresa en distintas posiciones en la médula espinal ventral, determina el establecimiento de distintos dominios de progenitores a lo largo del eje dorso-ventral (p0-p3 y pMN). La expresión de distintos factores de transcripción en los dominios individuales controla el destino de las neuronas en diferenciación.

C) Los progenitores de los dominios p0, p1, p2, p3 y pMN se diferencian y dan origen a distintas poblaciones postmitóticas de interneuronas (V0, V1, V2 y V3) y motoneuronas (MN) respectivamente. Estas poblaciones se identifican por la expresión de marcadores moleculares particulares.

pp, placa del piso; ZV, zona ventricular; ZM, zona del manto. Figura adaptada de (Jessell, 2000).

Distintos pares complementarios de factores de transcripción de clase I y II se reprimen mutuamente, lo que colabora para que una señal gradual se convierta en regiones de expresión génica con límites discretos (Wolpert, 1968, 1989). Tal es el caso del par Pax6 y Nkx2.2, dónde la pérdida del primero resulta en la expansión hacia regiones más dorsales del segundo, y la expresión ectópica de cualquiera de ellos reprime la expresión de su *partner* (Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 1999; Briscoe et al., 2000; Muhr et al., 2001). Como resultado de esta represión cruzada, distintas combinaciones de genes de clase I y II se expresan a lo largo del eje dorso-ventral (Figura 4A).

De esta forma, los reguladores transcripcionales que se expresan en poblaciones discretas de precursores en respuesta a Shh, determinan el establecimiento de dominios de progenitores en posiciones definidas de la zona ventricular a lo largo del eje dorso-ventral (Figura 4A) (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Briscoe and Ericson, 2001; Dessaud et al., 2007; Guillemot, 2007; Briscoe and Novitch, 2008). Específicamente, el neuroepitelio en la región ventral del tubo neural caudal se subdivide en 5 dominios de progenitores denominados p0, p1, p2, p3 y pMN/pOL (Figura 4B) (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Briscoe and Ericson, 2001; Goulding, 2009; Lek et al., 2010; Balaskas et al., 2012).

#### **Especificación celular- Mecanismos de acción de las proteínas proneurales.**

Temprano en el desarrollo (E9.5-E12.5 en el embrión de ratón) los precursores se comprometen hacia destinos neuronales y tiene lugar una fase neurogénica. Los progenitores de cada uno de los cinco dominios proliferan en la zona ventricular y dan origen a poblaciones postmitóticas de neuronas (especificación de subtipo) (Figura 4B,C) (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Briscoe and Ericson, 2001; Briscoe and Novitch, 2008; Goulding, 2009).

Los dominios, p0, p1, p2 y p3, producen las interneuronas V0, V1, V2 y V3 respectivamente, y el dominio de progenitores MN genera motoneuronas (Figura 4B,C) (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Guillemot, 2007; Briscoe and Novitch, 2008). Cada uno de estos grupos de neuronas embrionarias se identifican por la expresión de marcadores moleculares específicos, y se ha demostrado que cada una de ellas cumple funciones definidas en los circuitos espinales (Lanuza et al., 2004; Gosgnach et al., 2006; Crone et al., 2008; Goulding, 2009; Dougherty et al., 2013; Zhang et al., 2014).

La diferenciación de los progenitores a neuronas es un proceso complejo. Los factores de transcripción característicos de cada dominio activan programas genéticos definidos que incluyen la expresión de proteínas proneurales (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Guillemot, 2007).



Los factores de transcripción proneurales Neurog1-3, Ascl1 y Atoh1 son miembros de la familia *bHLH* que se expresan en progenitores de manera transitoria y preceden a la adquisición de identidad neuronal (Lo et al., 1991; Guillemot et al., 1993; Jessell, 2000; Bertrand et al., 2002). Estas proteínas inducen la neurogénesis y participan en la elección de destino celular: a) activan la diferenciación de algunos precursores y previenen la diferenciación de otros a través de la vía de Notch (Bertrand et al., 2002; Ge et al., 2006; Fortini, 2009), b) promueven la salida del ciclo celular inhibiendo los genes Sox 1-3 y activando inhibidores de dicho 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 (Guillemot et al., 1993; Bertrand et al., 2002; Rowitch, 2004; Rowitch and Kriegstein, 2010), a la vez que suprimen destinos gliales (Briscoe et al., 2000).

A pesar de que la expresión de las proteínas proneurales está regulada espacialmente por los genes de *patterning* y por la represión cruzada que ejercen los distintos *bHLH*, solo se expresan cerca de la última división de los progenitores. De esta manera, los factores proneurales integran las componentes espaciales y temporales que controlan la activación de programas de diferenciación específicos en poblaciones de precursores definiendo su proliferación en un momento particular del desarrollo. Así determinan las señales inductoras a las que se exponen los precursores al momento de salir del ciclo y participan de la decisión sobre el destino de esas células postmitóticas (Guillemot, 2007). La salida del ciclo celular está estrechamente coordinada con la expresión temprana de determinantes de identidad neuronal y con la migración estereotípica fuera de la zona ventricular hacia la zona marginal (Jessell, 2000; Ge et al., 2006; Guillemot, 2007).

En resumen, la generación de los distintos tipos celulares involucra una sucesión de eventos controlados por una serie de factores de transcripción específicos. Primero, la adquisición de identidad posicional, seguida de una fase proliferativa en la que se generan progenitores comprometidos hacia un destino celular particular (neuronal o glial) y la especificación del subtipo. Finalmente, prosigue con el arresto de la proliferación, la migración y la diferenciación terminal.

*Diversidad neuronal en el tubo neural ventral: el caso de las Interneuronas V2.*

La caracterización de algunas de las poblaciones de neuronas tempranas sugiere que cada población representa una clase genérica de neuronas que comparten elementos comunes, como su perfil de neurotransmisión y el tipo de proyección axonal. Sin embargo, la gran variedad de interneuronas espinales en el adulto indica que dentro de cada una de las poblaciones neuronales embrionarias operan mecanismos adicionales que asignan identidades más específicas (Jessell, 2000; Briscoe and Ericson, 2001; Lewis, 2006; Dessaud et al., 2007; Guillemot, 2007). Por ejemplo, la población V1 constituida por interneuronas inhibitorias de proyección ipsilateral aparentemente homogéneas, se diferencia en distintos tipos neuronales con conectividad característica, como las células de Renshaw, las interneuronas inhibitorias y otras neuronas pre-motoras (Sapir et al., 2004; Alvarez et al., 2005; Gosgnach et al., 2006; Stam et al., 2012).

Otro ejemplo de diversificación son las neuronas V2, derivadas del dominio progenitor p2. Estas se originan tempranamente en el desarrollo (~E10-E12.5) y están constituidas por al menos dos clases, las neuronas V2a y las V2b (Ericson et al., 1997; Karunaratne et al., 2002; Li et al., 2005). Al diferenciarse, ambos grupos migran hacia la región ventro-lateral del cordón espinal de la lámina VII y extienden axones ipsilaterales ascendentes. Estos dos subtipos V2 pueden ser distinguidos inmediatamente luego de que se convierten en células postmitóticas. Mientras que las interneuronas V2a excitatorias (glutamatérgicas) expresan los factores de transcripción Chx10 y Lhx3 (Briscoe et al., 2000; Crone et al., 2008), las V2b inhibitorias (GABAérgicas/glicinérgicas) (Lanuza et al., 2004; Kimura et al., 2008) se caracterizan por la expresión de Gata2 y Gata3 (Karunaratne et al., 2002; Lundfald et al., 2007) (Figura 4C y 5).

Las interneuronas V2a y V2b son componentes fundamentales de los circuitos motores espinales responsables de la generación de patrones centrales (CPG) que coordinan las actividades musculares rítmicas y determinan el patrón motor (Kiehn and Butt, 2003; Kiehn, 2006; Goulding, 2009). Se ha demostrado que las interneuronas

V2a excitatorias, conjuntamente con neuronas V0, son responsables de la activación de vías comisurales que controlan la alternancia izquierda-derecha de los miembros (Lanuza et al., 2004; Crone et al., 2008). Por otro lado, estudios recientes muestran que la inhibición recíproca entre pares musculares flexor-extensor depende de la actividad inhibitoria de las interneuronas V2b, y V1, resultando estos grupos indispensables para el movimiento voluntario o reflejo de los miembros (Zhang et al., 2014).

Se han descrito recientemente que el dominio de progenitores p2 tempranos genera también otros tipos de interneuronas adicionales, las células V2c y V2d, que presentan estrechos vínculos de linaje con las neuronas V2b y V2a, respectivamente (Li et al., 2010; Panayi et al., 2010; Dougherty et al., 2013; Francius et al., 2013).

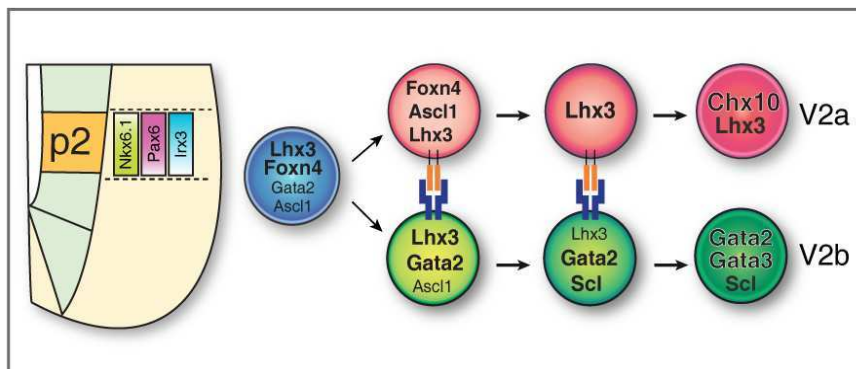
#### **Mecanismos de la especificación de interneuronas V2 tempranas.**

El *pool* de progenitores p2 está definido por la expresión de Pax6, Irx3 y Nkx6.1 que regulan la expresión de otros factores de transcripción a medida que avanza su diferenciación (Figura 5) (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000). En el período neurogénico en el que las neuronas V2a y V2b son generadas (~E10-E12.5), los progenitores p2 de la zona ventricular exhiben una combinación particular de factores de transcripción: Foxn4 (*forkhead box N4*), Lhx3 (factor con dominios LIM y HD), Ascl1 (*bHLH*) y Gata2 (proteína con dedos de Zinc) (Figura 5) (Karunaratne et al., 2002; Parras et al., 2002; Li et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007).

La especificación de subtipos de interneuronas V2a y V2b, a partir de progenitores p2 equivalentes, está principalmente regulada por la activación de la cascada de señalización Notch/Delta (Karunaratne et al., 2002; Li et al., 2005; Yang et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Batista et al., 2008; Kimura et al., 2008). De forma estocástica y debido a mecanismos que no han sido completamente elucidados, algunos precursores aumentan la expresión del ligando de Notch, *Delta-like4* (*Dll4<sup>+</sup>, Notch<sup>off</sup>*). Estos progenitores interactúan con sus vecinos activando la vía y reforzando las diferencias en un sistema clásico de inhibición lateral (Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Fortini, 2009). De esta manera, se establece la separación

inicial de linajes donde precursores de V2a y V2b quedan entremezclados de forma “salt & pepper” (Figura 5).

La actividad diferencial de Notch promueve o inhibe complejos transcripcionales en cada subgrupo promoviendo un destino V2 específico e inhibiendo el alternativo (Joshi et al., 2009). La subpoblación de neuronas inmaduras *Dll4<sup>+</sup>,Notch<sup>off</sup>* mantiene la expresión de Lhx3 a la vez que suprimen la de Gata2, orientándose hacia un destino V2a. Por otro lado, el subgrupo *Dll4<sup>-</sup>,Notch<sup>on</sup>* regula positivamente los factores Scl (Tal1) y Gata2, y silencia Lhx3, orientándose hacia un destino V2b (Figura 5) (Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007).



**Figura 5.**  
Diferenciación de las interneuronas V2 tempranas.

A partir del dominio de progenitores p2, definido por los genes de *patterning* *Nkx6.1*, *Pax6* e *Irx3*, se diferencia una población de precursores *Ascl1<sup>+</sup>,Foxn4<sup>+</sup>,Lhx3<sup>+</sup>,Gata2<sup>+</sup>*. En algunos de estos progenitores y de forma estocástica, aumenta la expresión de *Dll4*, activando la vía de señalización de Notch en células vecinas. Mientras que los primeros conservan la expresión de *Foxn4*, *Lhx3* y *Ascl1* y dan origen a las V2a (*Chx10<sup>+</sup>,Lhx3<sup>+</sup>*), los últimos disminuyen la expresión de estos genes, a la vez que aumentan la de *Gata2*, *Scl* y *Gata3* diferenciándose a V2b (*Gata2<sup>+</sup>,Gata3<sup>+</sup>,Scl<sup>+</sup>*).

Figura adaptada de (Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007).

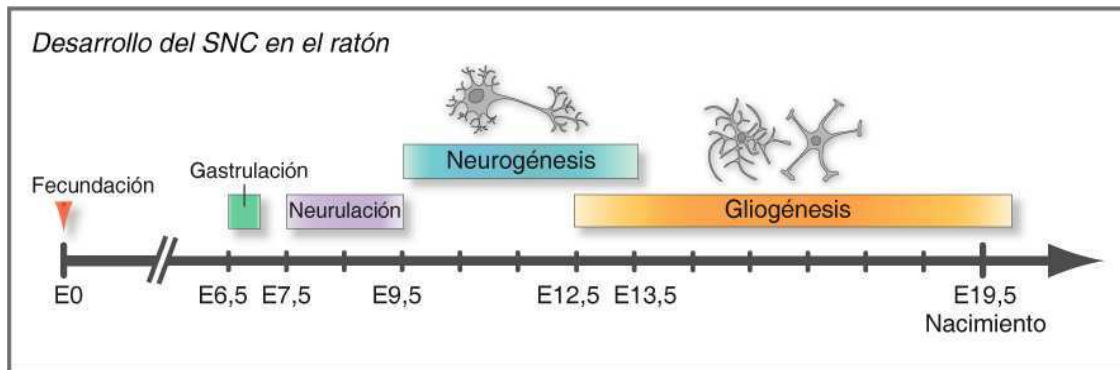
Ambos subtipos inmaduros abandonan el ciclo celular (Peng et al., 2007) y migran (entre ~E10-E12.5) fuera de la zona ventricular a la vez que adquieren perfiles de marcadores y de neurotransmisión específicos. El modulador transcripcional LMO4 promueve la identidad GABAérgica (V2b) y suprime la glutamatérgica (V2a), contribuyendo al balance necesario entre la actividad inhibitoria y excitatoria en los circuitos motores (Joshi et al., 2009).

Como resultado de los procesos de especificación, las V2a maduran convirtiéndose en interneuronas excitatorias  $Lhx3^+$ ,  $Chx10^+$ , mientras que las V2b se desarrollan en interneuronas inhibitorias que expresan Gata2 y Gata3 (Figura 5) (Li et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Joshi et al., 2009). De esta forma, las interacciones célula-célula da origen a dos tipos de interneuronas a partir de progenitores p2 homogéneos. Aún se desconocen los mecanismos involucrados en la generación de interneuronas V2c y V2d (Panayi et al., 2010; Dougherty et al., 2013).

### ***Generación de diversidad celular en la médula espinal - Rol del factor temporal.***

La organización de los dominios progenitores a lo largo del eje dorso-ventral, muestra la relevancia del factor espacial en la diversidad neuronal (Jessell, 2000). Sin embargo, el grado de complejidad de subtipos neurales encontrados en la médula espinal madura, sugiere que la temporalidad de la neurogénesis también ejerce un papel determinante durante el desarrollo.

Se ha establecido que la génesis de neuronas y células de la glía, a partir de progenitores ventriculares/células madre neurales, sigue una secuencia temporal ordenada durante el desarrollo embrionario (Altman and Bayer, 1984). Mientras que la diferenciación neurogénica ocurre en estadios embrionarios tempranos (E9.5-E12.5 en el ratón) (Altman and Bayer, 1984; Lee and Jessell, 1999; Jessell, 2000), posteriormente, los precursores del cordón espinal adquieren destinos gliales (desde ~E12.5 en adelante) (Stolt et al., 2003; Rowitch, 2004; Deneen et al., 2006; Richardson et al., 2006; Hochstim et al., 2008; Genethliou et al., 2009) (Figura 6). Este fenómeno sugiere que a lo largo del tiempo, estos precursores adquieren distintas competencias sucesivas y consecuentemente se genera una mayor diversidad neural.



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

La gestación de los ratones es de aproximadamente 20 días desde el momento de la fecundación (estadio embrionario 0, E0). La neurulación ocurre temprano (E7.5-E9.5) en el desarrollo, luego de la gastrulación (E6.5). La fase neurogénica se inicia ~E9.5 y prosigue hasta ~E13.5. Posteriormente tiene lugar la gliogénesis, iniciándose ~E12.5 hasta estadios postnatales tempranos.

### *El desarrollo de astrocitos y oligodendrocitos espinales.*

En la última década, ha quedado evidenciado que la especificación de la glía sigue un modelo posicional que guarda similitud con el de la especificación neuronal. De acuerdo al mismo, la generación de distintas poblaciones gliales se regula siguiendo una “plantilla segmentaria” con programas de desarrollo parcialmente independientes para los oligodendrocitos y astrocitos (Rowitch, 2004; Rowitch and Kriegstein, 2010) (Figura 7).

El dominio pMN/pOL genera tempranamente a las motoneuronas (~E9.5, Figura 7A) y más tardíamente (~>E12.5) da origen a las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs),  $PDGFR-\alpha^+$ ,  $Sox10^+$ ,  $Neurog2^+$ . Estas últimas, comienzan a migrar y se diferencian (~E14) en oligodendrocitos maduros, caracterizados por la expresión de proteínas de mielina como la proteína básica de mielina (MBP), PLP1 y APC (Figura 7B) (Rowitch, 2004; Guillemot, 2007; Sugimori et al., 2007).

Este dominio ventral ha sido extensamente caracterizado por lo que resulta un modelo adecuado para estudiar los mecanismos temporales que regulan la generación de ondas sucesivas de progenie neuronal y glial a partir de una población discreta de precursores. En primer lugar, la actividad de la vía de Shh induce la expresión de genes

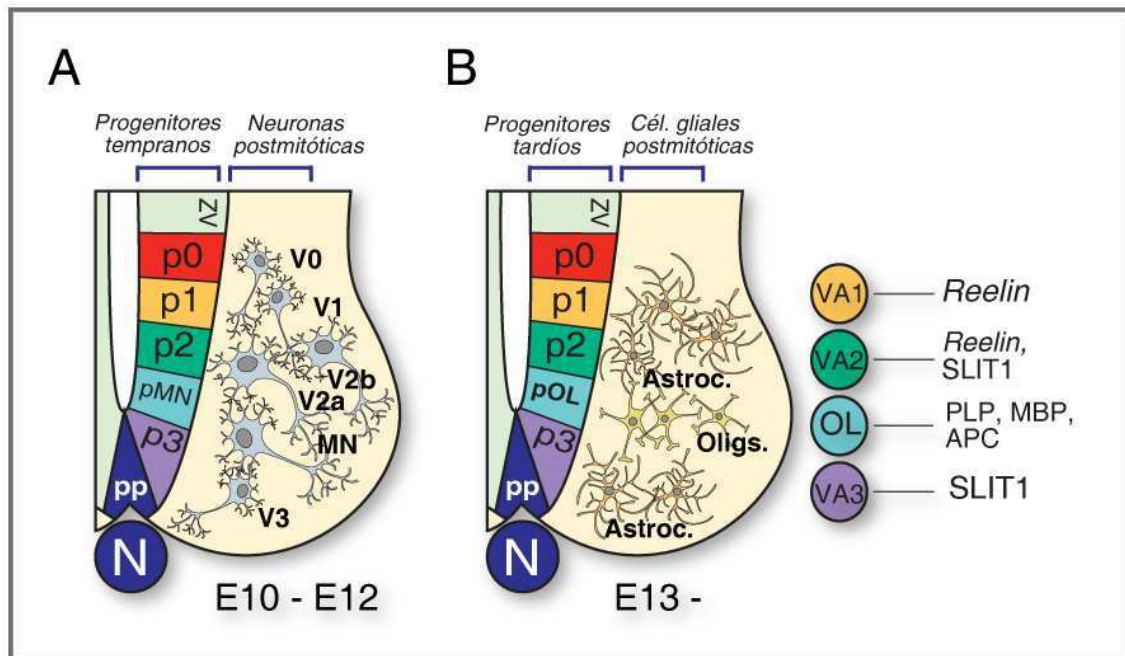
de la familia *Olig*. Adecuados niveles de expresión de los *bHLH* Olig1 y Olig2 son indispensables para la especificación tanto de las motoneuronas como de los oligodendrocitos.

El cambio en la producción de la progenie celular involucra, el mantenimiento de los precursores gliales por acción de la vía Notch-Delta y la actividad proglial de Sox9 (ver más adelante) (Stolt et al., 2003; Kang et al., 2012). Asimismo, el factor proneural Neurog2 que se expresa en las células *Olig2*<sup>+</sup> tempranas y reprime la gliogénesis, disminuye su expresión inmediatamente antes de la producción de OPCs, lo cual sugiere que este paso es clave para el *switch* neuronal-glial (Guillemot, 2007; Rowitch and Kriegstein, 2010).

A diferencia de los oligodendrocitos, los astrocitos se producen a lo largo de todo el eje dorso-ventral. Estudios recientes indican que la acción combinada de los factores de transcripción Nkx6.1 y Pax6 establece dominios de progenitores ventrales p1, p2 y p3, tardíos (Hochstim et al., 2008; Rowitch and Kriegstein, 2010) a partir de los que se especifican tres subpoblaciones de astrocitos ventrales maduros: a) VA1, el grupo más dorsal, derivan de p1 y expresan Pax6 y Reelin, b) VA2, en una posición intermedia, se generan a partir de precursores p2 y son Pax6<sup>+</sup>, Nkx6.1<sup>+</sup>, Reelin<sup>+</sup>, Slit1<sup>+</sup> y c) VA3, el subtipo más ventral que proviene del dominio p3 y son positivos para Nkx6.1 y Slit1. Como se observa, la ubicación dorso-ventral de los astrocitos VA1-3 en la sustancia blanca, refleja el arreglo de los dominios de progenitores p1, p2 y p3 que les dan origen (Figura 7A,B) (Hochstim et al., 2008; Rowitch and Kriegstein, 2010; Bayraktar et al., 2015).

Más allá de los mecanismos globales de *patterning*, también existe evidencia de una regulación local en la producción de astrocitos. Los animales doble mutantes *Olig1*<sup>-</sup>; *Olig2*<sup>-</sup> presentan una expansión ventral p2 con la consecuente generación de un mayor número de interneuronas V2 y astrocitos. Por el contrario, la eliminación del factor asociado al dominio p2, Scl, resulta en la dorsalización de la expresión de Olig2, y el aumento en la producción de oligodendrocitos, a expensas de astrocitos (Muroyama et al., 2005; Guillemot, 2007). El requerimiento de interacciones represivas

cruzadas entre los factores de transcripción *bHLH*, *Scl* y *Olig2* para la generación de astrocitos sugiere un modelo por el cual distintos mecanismos regulan la astrogénesis en regiones restringidas del cordón espinal.



**Figura 7. Poblaciones neurales espinales de origen temprano y tardío.**

A) Temprano en el desarrollo (E10-E12.5), los distintos dominios de progenitores ubicados en regiones restringidas del cordón espinal ventral (p0-p3 y pMN) dan origen a diferentes poblaciones de interneuronas y a las motoneuronas (V0-V3 y MN, respectivamente).

B) En estadios tardíos del desarrollo, los dominios de progenitores dan origen a células gliales. Mientras que el dominio de progenitores pOL genera oligodendrocitos (PLP<sup>+</sup>,MBP<sup>+</sup>,APC<sup>+</sup>), se han identificado tres subtipos de astrocitos ubicados en las sustancia blanca que se originan a partir de tres dominios distintos: los VA1 (Reelin<sup>+</sup>) derivan del p1 y son los más dorsales, los VA3 (Slit1<sup>+</sup>) provienen del p3 y son los más ventrales y los VA2 (Reelin<sup>+</sup>,Slit1<sup>+</sup>) originados del p2 y ubicados en una posición intermedia entre ambos.

Figura adaptada de adaptada de (Rowitch and Kriegstein, 2010).

Más allá de las particularidades, existen ciertos elementos comunes en la generación de oligodendrocitos y astrocitos. Como se mencionó anteriormente, la activación de la vía de señalización de Notch colabora en el mantenimiento del *pool* de progenitores e inhibe la neurogénesis, aunque no es suficiente para inducir los destinos gliales. Por lo tanto, la especificación de tipos celulares tardíos requiere de programas transcripcionales pro-gliales adicionales (Stolt et al., 2003; Rowitch and Kriegstein, 2010; Kang et al., 2012).



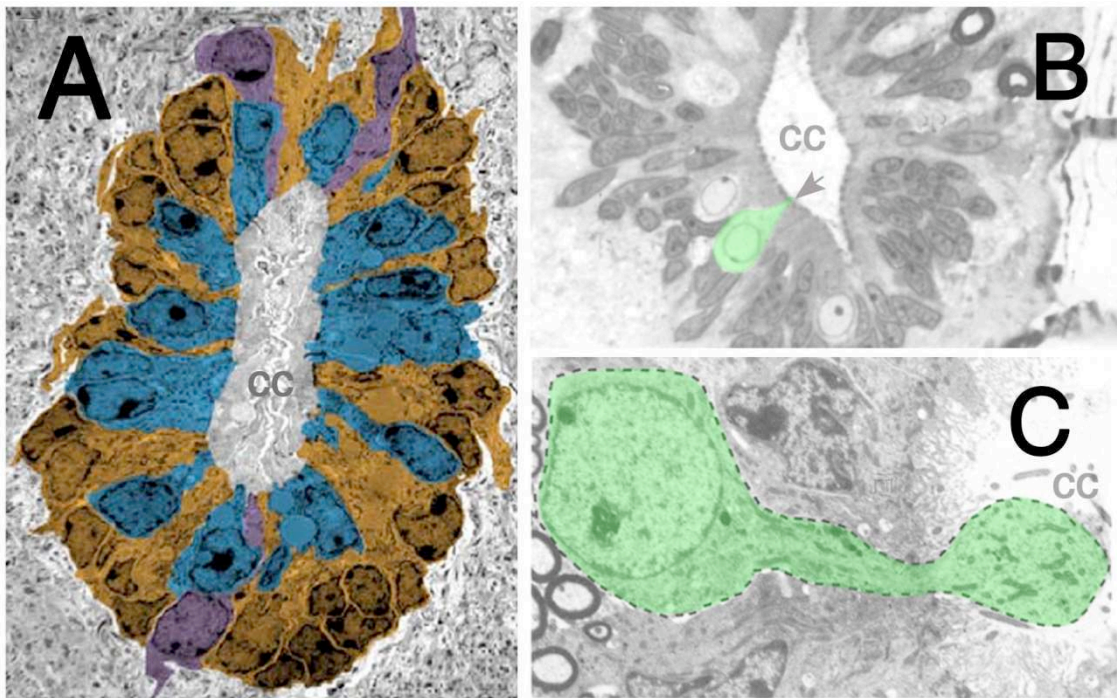
Distintas observaciones sugieren que durante el *switch* gliogénico (E11.5-E12.5) el factor de transcripción de la familia *HMG-box*, Sox9, participa en el mantenimiento de las células madre neurales y en la iniciación de la gliogénesis. Ratones mutantes para este factor mostraron períodos más extendidos de neurogénesis y defectos en la especificación de los oligodendrocitos, así como deficiencias en la producción de los astrocitos. Estas evidencias indican que Sox9 es un componente molecular general del *switch* neuronal-glial en la médula espinal en desarrollo (Stolt et al., 2003; Guillemot, 2007; Finzsch et al., 2008; Rowitch and Kriegstein, 2010; Kang et al., 2012).

Estudios subsecuentes revelaron que Sox9 ejerce su rol en el linaje de oligodendrocitos y astrocitos a través de la regulación directa del factor nuclear I, NFIA (Kang et al., 2012). Este factor, promueve la iniciación de la gliogénesis, asegurando la expresión de Olig2 y el estado de “progenitor” a través de la regulación positiva de efectores de la vía de Notch (Deneen et al., 2006; Guillemot, 2007; Kang et al., 2012). Luego, NFIA y Sox9 se asocian y promueven la progresión del linaje astrocítico, inducen su diferenciación terminal y regulan la migración y expresión de los marcadores característicos GFAP y GLAST (Kang et al., 2012).

En resumen, estos hallazgos indican que el pasaje de una fase neurogénica a otra gliogénica del desarrollo está determinado por componentes región-específicos y reguladores temporales, y que programas transcripcionales propios de la etapa avanzada, son necesarios para la generación de oligodendrocitos y astrocitos.

### ***Arquitectura del canal central.***

Como se mencionó anteriormente, el canal central es el espacio que corre longitudinalmente en el interior de la médula espinal adulta y es el remanente de la cavidad ventricular del tubo neural. El epéndima es un epitelio simple con arquitectura oval que constituye la interfase entre el tejido nervioso y las cavidades ventriculares del SNC que contienen el líquido cerebroespinal, esencial para mantener el ambiente de neuronas y células gliales constante (Figura 8A) (Del Bigio, 1995; Bruni, 1998).



**Figura 8. Diversidad celular en la región del canal central.**

A) Microscopía electrónica del canal central del ratón. Se observan células ependimarias de distinta morfología coloreadas en azul y violeta, y tanicitos en color marrón. Tomado de (Meletis et al., 2008).

B-C) Células que contactan el líquido cerebroespinal en el canal central. B) Las CSF-cNs espinales se encuentran presentes en distintas especies de vertebrados no amniotas, entre ellas en la carpa (*Cyprinus carpio*). La flecha señala una célula contactando el canal central en una fotografía de microscopía electrónica. Adaptado de (Vigh et al., 1974). C) Las s-CSF-cNs también han sido descritas en numerosas especies de vertebrados amniotas como el ratón. En la foto de microscopía electrónica, se muestra coloreada en verde una de estas células. Adaptado de (Vigh et al., 1983).

La región del canal central se compone de varios tipos celulares que se encuentran en contacto directo con el lumen o en una posición subependimaria. Las células mayoritarias, los ependimocitos, tienen una morfología columnar, presentan en su cara apical una capa de cilias móviles y microvellosidades que absorben el CSF, y contribuyen a su circulación a través del sistema ventricular (Figura 8A) (Bruni, 1998; Meletis et al., 2008).

Un segundo tipo celular encontrado frecuentemente en la región del canal central son los tanicitos. Considerados un tipo ependimario especializado, presentan su soma en posición subependimaria, se encuentran en contacto con el lumen, y

proyectan un largo proceso basal que contacta los vasos sanguíneos u otros tipos neurales (Figura 8A) (Meletis et al., 2008).

Las células endimarias tienen funciones de soporte, filtran moléculas cerebrales, aíslan al SNC de sustancias potencialmente nocivas en el CSF, movilizan los desechos celulares, optimizan la dispersión de mensajeros en el CSF y tendrían un posible rol en los nichos neurogénicos adultos (Agduhr, 1932; Del Bigio, 1995; Spassky et al., 2005; Hugnot and Franzen, 2011).

En el cordón espinal del ratón, las células endimarias se originan a partir de E12 y proliferan hasta E18. Además, derivan de progenitores neuroepiteliales ventrales Nkx6.1<sup>+</sup>, y mantienen la expresión de este factor de transcripción en la médula espinal adulta (Bruni, 1998; Fu et al., 2003; Hugnot and Franzen, 2011).

#### *Las células que contactan el CSF.*

Las neuronas del SNC están aisladas del líquido cerebroespinal por el epéndima. Sin embargo, existen zonas del sistema ventricular, donde ciertos tipos neuronales traspasan la frontera endimaria y entran en contacto con el CSF. Estas células se denominan neuronas que contactan el CSF (CSF-cNs, por sus siglas en inglés) y presentan características propias en diferentes regiones del SNC (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004). La localización peculiar de estas células sugiere un papel importante en la recepción, interpretación y emisión de señales no sinápticas mediadas por el CSF interno y externo del SNC (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004).

Las CSF-cNs más simples encontradas son las neuronas médulo-espinales, un tipo celular especializado presente en el tallo cerebral (*medulla oblongata*) y rodeando el canal central de la médula espinal (Figura 8B). Estas neuronas, originalmente denominadas células del *epiPLEXUS*, fueron identificadas y descritas hace más de 90 años por los científicos W. Kolmer (1921) y E. Agduhr (1932), basándose en su morfología celular y ubicación. Estas características hicieron considerar que las CSF-cNs

podrían constituir un órgano sensorial en la interfase entre el CSF y el SNC a nivel de la médula espinal. Desde entonces, las CSF-cNs espinales han sido descritas en más de 200 especies de peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Vigh and Vigh-Teichmann, 1971, 1973; Vigh et al., 1983; Vigh et al., 2004), lo que sugiere un alto grado de conservación.

Los estudios posteriores, principalmente a través de microscopía electrónica, mostraron que las CSF-cNs espinales presentan características únicas, con el soma ubicado entre las células del epéndima o en posición subependimal. Además, presentan una extensión apical, que expresa la proteína dendrítica MAP2, y que se extiende desde el soma hacia el canal central y culmina en un terminal en estrecho contacto con el CSF (Figura 8B) (Vigh and Vigh-Teichmann, 1971, 1998; Stoeckel et al., 2003; Vigh et al., 2004).

Más recientemente, el análisis fisiológico y de expresión de marcadores ha señalado que se trata de neuronas inmaduras (Stoeckel et al., 2003; Marichal et al., 2009; Sabourin et al., 2009). Sin embargo, no es claro cuál es el nivel de heterogeneidad de la población. Estudios recientes en el cordón espinal de la rata, demuestra cierto rango de variabilidad en los fenotipos electrofisiológicos encontrados en la proximidad del canal central (Marichal et al., 2009). Esta heterogeneidad podría atribuirse a distintos estadios de maduración de las células, o bien al hecho de que no se discriminaron adecuadamente distintos tipos celulares. Asimismo, ensayos de inmunohistoquímica revelaron que las CSF-cNs espinales de numerosas especies expresan marcadores GABAérgicos (Alford et al., 1990; Christenson et al., 1991; Stoeckel et al., 2003; Vigh et al., 2004; Djenoune et al., 2014).

A pesar del conocimiento anatómico de las CSF-cNs, aún no se ha elucidado cuál es el rol fisiológico que las CSF-cNs espinales cumplen en el SNC de vertebrados (Marichal et al., 2009; Hugnot and Franzen, 2011; Marichal et al., 2012). Su ubicación peculiar en la médula espinal madura ha generado distintas especulaciones al respecto de sus potenciales funciones. Estas neuronas presentan numerosas características comunes con mecanorreceptores conocidos, como las células sensoriales del oído

interno o de la línea lateral de peces y anfibios, por lo que se sospecha que son sensibles a los cambios en la presión o el flujo del CSF. Por ejemplo, su proyección dendrítica exhibe un engrosamiento terminal (Figura 8C) con un número variable de estereocilias y un único cilio largo con un arreglo de microtúbulos del tipo 9x2+2, característico de cinetocilios móviles (Vigh and Vigh-Teichmann, 1971; Vigh et al., 1977; Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004). Se ha sugerido que, al menos en vertebrados anamniotas, este cilio formaría parte de una estructura involucrada en la percepción y/o modulación del movimiento de la columna vertebral a través de la detección de estímulos mecánicos (Kolmer, 1921; Grillner, 1985). En concordancia con esta hipótesis, se reportó que las CSF-cNs del pez cebra, denominadas células Kolmer-Agduhr (KA), estarían implicadas en la modulación de la locomoción espontánea en estadios larvales durante el desarrollo (Wyart et al., 2009).

Por otro lado, se ha propuesto que las CSF-cNs espinales actúan como quimiosensores (Vigh et al., 2004). Estas neuronas expresan específicamente el canal PKD2L1, *polycystic kidney disease 2-like 1* (Huang et al., 2006). Este canal pertenece a la familia de los *Transient Receptor Potential (TRP)* y es un elemento central de receptores gustativos de la lengua que responden al pH (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; Inada et al., 2008; Shimizu et al., 2009; Kawaguchi et al., 2010; Orts-Del'Immagine et al., 2012) y a cambios en la osmolaridad del medio (Shimizu et al., 2009; Orts-Del'Immagine et al., 2012). Estas observaciones sugieren que las CSF-cNs podrían estar involucradas en un circuito homeostático responsable de monitorear la calidad y reportar cambios en la composición del CSF. Consistentemente, se registró que estas neuronas exhiben respuestas excitatorias ante descensos en el valor de pH (Huang et al., 2006; Marichal et al., 2009) y expresan el receptor sensible a pH, P2X2 (Stoeckel et al., 2003; Marichal et al., 2009).

En el mamífero, aún no se ha determinado el origen embrionario y los mecanismos que controlan la especificación de este tipo neuronal. Estudios en el pez cebra reportaron que la diferenciación de las CSF-cNs a partir de progenitores ventrales, involucra tanto la vía de señalización de Hedgehog y de Notch (Park et al., 2004; Yeo and Chitnis, 2007; Huang et al., 2012). Estos antecedentes sugieren que las

CSF-cNs de los mamíferos, también se originarían en el tubo neural ventral. Sin embargo, a pesar de la exhaustiva caracterización de las poblaciones de neuronas embrionarias ventrales (V0-V3) que se ha realizado en los últimos años, no se han obtenido evidencias en relación a la ontogenia de las CSF-cNs.

## Objetivos.

A pesar del considerable progreso realizado en la comprensión de la especificación de destino celular en el cordón espinal, aún falta elucidar ciertos aspectos de cómo grupos presuntamente homogéneos de progenitores se diversifican para generar células neuronales altamente especializadas en el adulto.

El **objetivo general** de esta tesis es analizar la contribución de eventos neurogénicos tardíos a la diversificación celular en el sistema nervioso central. En particular, se determinará si en estadios embrionarios avanzados del desarrollo se generan tipos neuronales aún no caracterizados.

Este estudio, utiliza como modelo la médula espinal del ratón que ha probado ser un excelente sistema para identificar de los mecanismos que gobiernan la especificación neural y el establecimiento de circuitos funcionales.

En este sentido, los **objetivos específicos** del trabajo son:

1. *Determinar las componentes espacio-temporales involucradas en desarrollo de las neuronas que contactan el líquido cerebroespinal (CSF-cNs).*
  - Identificar el momento embrionario en el que se producen las CSF-cNs
  - Establecer la identidad de los progenitores que les dan origen y
  - Determinar cuál es la relación de linaje de las CSF-cNs con las poblaciones neuronales embrionarias conocidas.
2. *Caracterizar la distribución anatómica, la expresión de marcadores moleculares y las propiedades electrofisiológicas de las CSF-cNs.*
3. *Evaluar si las CSF-cNs constituyen una población homogénea en relación a su origen, los mecanismos genéticos que controlan su diferenciación y sus propiedades fisiológicas.*

# **MATERIALES y MÉTODOS**



## 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), donde 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. G).

El inicio de la preñez de las hembras fue determinado por la detección de tapón vaginal al mediodía siguiente de la cópula, designándose como estadio embrionario 0.5 d.p.c. (E0.5). Adicionalmente, la edad de los embriones fue confirmada, luego de su disección, mediante el análisis de las características anatómicas particulares de cada estadio embrionario (Kaufman, 1992).

Se utilizaron ratones exocriados Hsd: ICR (CD-1®; *Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA*) para aquellos diseños experimentales que involucraban exclusivamente animales *wild type*, así como también para el mantenimiento de líneas de ratones genéticamente modificadas. Los animales CD-1 fueron mantenidos bajo una estrategia de cruzamiento que asegurase la exocría.

### ***Cepas utilizadas en los distintos diseños experimentales.***

A continuación se detallan las distintas líneas de ratones modificados genéticamente utilizadas a lo largo del presente trabajo:

***Gata2<sup>GFP</sup>*** (Suzuki et al., 2006). MGI ID: 2673268. Línea *knock-in* que expresa GFP bajo el control transcripcional del gen endógeno de Gata2. La secuencia de GFP fue insertada reemplazando al exón 2 de Gata2 en el que se inicia la traducción. La mutación en homocigosis es letal (los embriones mueren aproximadamente en el estadio E10). Cedida por Doug Engel (*University of Michigan, MI, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia GFP.

***Gata3<sup>Cre</sup>*** (Zhang et al., 2014). MGI ID: 5619418. Línea *knock-in* que expresa la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del gen endógeno Gata3. La secuencia de Cre, conteniendo una secuencia de localización nuclear, fue insertada en el sitio ATG del segundo exón del gen Gata3. El *cassette* conteniendo el marcador de selección de resistencia a neomicina (PGK-Neo) fue eliminado mediante cruzamiento con la línea de ratones que expresa la recombinasa Flpe (Rodriguez et al., 2000). La mutación en homocigosis es letal (los embriones mueren en el estadio E10.5). Generado por G. Lanuza. Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Cre o *primers* específicos para la construcción Gata3-Cre.

***Foxn4<sup>lacZ</sup>*** (Li et al., 2004). MGI ID: 3054789. Línea *knock-in* en la que siete de los nueve exones codificantes, incluyendo aquellos que codifican para los dominios de unión al DNA *forkhead/winged helix*, fueron reemplazados por un *cassette* conteniendo las construcciones IRES-lacZ y PGK-Neo. El gen de lacZ codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa y Neo corresponde al marcador de selección. La mutación en homocigosis es letal en estadio postnatal. Cedida por Mengqing Xiang (*Rutgers University, NJ, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia lacZ o *primers* específicos para el alelo no modificado.

***Sim1<sup>Cre</sup>*** (Zhang et al., 2008). MGI ID: 3839912. Línea *knock-in* en la cual la secuencia de Cre, seguida de un *cassette* conteniendo al marcador de selección Neo flanqueado por

elementos FRT, fue insertada en reemplazo del primer exón de Sim1. La secuencia para dicho selector fue removida posteriormente mediante cruzamiento con la línea de ratones que expresan la recombinasa Flpe (Rodríguez et al., 2000). La expresión de Cre en estos animales recapitula la de Sim1. Cedida por Martyn Goulding (*The Salk Institute, CA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Cre.

**En1<sup>Cre</sup>** (Sapir et al., 2004). MGI ID: 3029756. Línea *knock-in* que expresa la recombinasa Cre bajo el control del gen endógeno de En1. La secuencia del primer exón de En1 fue reemplazada por una construcción conteniendo *nls-Cre-PGK-Neo-pA*, por lo que la expresión de Cre en estos animales recapitula la del gen endógeno. Cedida por Martyn Goulding (*The Salk Institute, CA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Cre o *primers* específicos para la construcción En1-Cre.

**Dbx1<sup>lacZ</sup>** (Pierani et al., 2001). MGI ID: 2182329. Línea *knock-in* en la cual la región codificante (exones 1-4) de Dbx1 fue reemplazada por un *cassette* conteniendo *nls-lacZ* y el marcador de selección PGK-Neo flanqueado por elementos *loxP*. El patrón de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en células progenitoras neurales es similar a la de Dbx1. La mutación en homocigosis es letal en neonatos debido a deficiencias respiratorias. Cedido por Tom Jessell (*Columbia University, NY, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la contra la secuencia lacZ o *primers* específicos para el alelo *wt* del Dbx1. En embriones, se utilizó la detección de la actividad de  $\beta$ -gal en tejido proveniente colículo superior.

**Pax6<sup>Sey</sup>, Small eye** (Roberts, 1967; Hill et al., 1991). MGI ID: 1856155. Esta línea presenta una mutación espontánea puntual, en la cual una transversión en el codón 194 (G por T) da lugar a un codón STOP, resultando en una terminación prematura de la proteína, antes del homeodominio. Los animales homocigotas para la mutación presentan alteraciones en el desarrollo ocular y mueren perinatalmente. Los animales heterocigotas presentan un fenotipo semidominante que se manifiesta en estadios juveniles como defectos oculares (ojos más pequeños y/o malformados, cataratas, lentes involucionados). Cedida por Martyn Goulding (*Salk Institute, CA, USA*). Los

embriones homocigotas para esta mutación pueden distinguirse por ausencia desarrollo ocular.

***Nkx2.2<sup>Neo</sup>*** (Sussel et al., 1998). MGI ID: 1932100. Línea *knock-out* generada reemplazando los exones 1 y 2 de *Nkx2.2* por un *cassette* de resistencia PGK-Neo. La mutación en homocigosis es letal en estadio postnatal temprano. Cedido por John Rubenstein (*University of California, CA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Neo o *primers* específicos para el alelo *wt* y mutante *Nkx2.2<sup>Neo</sup>*.

***Chx10<sup>DTA</sup>*** (Crone et al., 2008). MGI ID: 3835936 Línea *knock-in* donde se reemplazó el exón 1 de *Chx10* por una construcción de la secuencia de Neo-pA (flanqueada por elementos *loxP*) que actúa como “*stop*” transcripcional, río arriba del cDNA de la subunidad A de la toxina diftérica (DTA). La remoción del *cassette* STOP, por la recombinasa Cre, es condición indispensable para que se exprese la toxina y se produzca la ablación celular específica de aquellas células que expresen ambos genes. Los embriones usados fueron provistos por Kamal Sharma (*University of Chicago, IL, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia DTA.

***Gad1<sup>GFP</sup>*** (Tamamaki et al., 2003). MGI ID: 3590300. Línea *knock-in* que expresa la proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP*), bajo el control transcripcional del gen endógeno de *Gad1*. La secuencia de la EGFP seguida de un *cassette* que contiene al marcador de selección Neo flanqueado por secuencias *loxP*, fue insertada en el ATG del primer exón. Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia GFP.

***Sox9<sup>fl/fl</sup>*** (Akiyama et al., 2002). MGI ID: 2429649. Línea *knock-out* condicional del gen *Sox9* que presenta un sitio *loxP* río arriba del exón 2 de este gen y un *cassette* de resistencia a neomicina seguido por otro sitio *loxP*, insertado río abajo del exón 3 (*loxP*-exón 2-exón3- Neo-*loxP*). Cuando esta línea de ratones mutantes es cruzada con otra que expresa la recombinasa Cre, la progenie resultante, presenta una delección de los exones 2 y 3 en el tejido que expresa la enzima, resultando en la inactivación de la función génica de *Sox9*. Cedido por Richard Behringer (*M.D.Anderson Cancer Center,*

*University of Texas, TX, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Neo o *primers* específicos para el alelo *wt* y mutante *Sox9<sup>fl/fl</sup>*.

**Sst<sup>Cre</sup>** (Taniguchi et al., 2011). MGI: 4838416. Línea *knock-in* que expresa la recombinasa Cre bajo el control del gen endógeno de somatostatina. Se insertó un sitio IRES seguido de la secuencia de la recombinasa Cre y un sitio de poliadenilación en la región 3' no-traducible del *locus* de Sst. Se detecta actividad de Cre en todas las células somatostatina positivas, recapitulándose la expresión del gen endógeno. Cedida por Z.Huang (*Stanford University, CA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Cre.

**Nestin:Cre** (Tronche et al., 1999). MGI ID: 2176173. Línea transgénica que expresa la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de rata de Nestin y del *enhancer* específico de sistema nervioso presente en el segundo intrón de dicho gen. Este promotor dirige la expresión de la recombinasa en precursores neuronales y gliales desde el estadio embrionario ~E10. El transgén se localiza en el cromosoma 12. Cedido por Rüdiger Klein (*Max Planck Institute of Neurobiology, Alemania*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Cre.

**R26<sup>lacZ</sup>** (Soriano, 1999). MGI ID: 1861932. Línea reportera *knock-in* generada por la inserción de una construcción que contiene la secuencia lacZ precedida por un *cassette* STOP (Neo) flanqueado por elementos *loxP*, en el *locus* endógeno de expresión ubicada ROSA26. El sitio de integración es el sitio único de reconocimiento de la enzima de restricción Xba1, a 300 pb del 5' del sitio de integración identificado en el ensayo de *gene-trap* original por el que se caracterizó dicho *locus*. Cuando esta línea de animales reporteros se cruza con otra que expresa Cre, el *cassette* STOP es removido en la progenie y el gen de lacZ se expresa en las células derivadas de aquellas que expresaron la recombinasa. Cedido por Philippe Soriano (*Fred Hutchinson Cancer Research Center, WA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia lacZ, o bien, pares específicos contra distintas regiones del *locus* ROSA26 que permiten distinguir la presencia o ausencia de la inserción.

**R26<sup>DTA</sup>** (Brockschnieder et al., 2004). MGI ID: 3055489. Línea reportera *knock-in* generada por la inserción, en el sitio único de reconocimiento de la enzima de restricción Xba1 del *locus* ROSA26, de una construcción conteniendo la secuencia de un *cassette* STOP (*lacZ*) flanqueado por elementos *loxP*, río arriba de otra codificante para el fragmento A de la toxina diftérica (DTA). La toxina no se expresa a menos que la secuencia STOP sea removida por recombinación. Cuando esta línea de ratones se cruza con otra que expresa la recombinasa Cre bajo el control de promotores específicos de célula o tejido, se produce la ablación de aquellos tipos celulares donde se expresa. Cedido por Dieter Riethmacher (*University of Southampton, UK*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia *lacZ*, DTA, o pares específicos para detectar la modificación del *locus* ROSA26.

**R26<sup>GFP</sup>** (Mao et al., 2001). MGI ID: 2136519. Línea reportera *knock-in* generada por inserción de la secuencia del gen de la proteína GFP en el *locus* ROSA26. La expresión de este gen se encuentra impedida por la presencia, río arriba, de un *cassette* STOP flanqueado por secuencias *loxP*. Esta línea de ratones reporteros puede cruzarse con líneas Cre para la remoción del STOP por recombinación. La proteína fluorescente marca la progenie de aquellas células que expresen la recombinasa. Cedido por Stuart Orkin (*Harvard Stem Cell Institute, MA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia GFP, o bien, pares específicos contra distintas regiones del *locus* ROSA26 que permiten distinguir la presencia o ausencia de la inserción de acuerdo a los tamaños diferenciales de los productos resultantes.

**ZnG** (Zhang et al., 2008). MGI ID: W/O. Línea transgénica reportera (condicional) que presenta una secuencia de GFP de localización nuclear (*nlsGFP*) precedida por un *cassette* STOP flanqueado por sitios *loxP*. La construcción incluye el promotor híbrido pCAG (*enhancer de citomegalovirus-CMV-IE/* promotor, primer exón e intrón del  $\beta$ -actina de pollo/ aceptor *splicing* de la  $\beta$ -globina de conejo) río arriba de la secuencia codificante de la proteína b-geo, resultante de la fusión de los genes *lacZ* y de resistencia a neomicina. En aquellas células de la progenie resultante del cruzamiento de este ratón con otro expresando una recombinasa Cre, se remueve el *cassette* STOP y se detecta la proteína GFP. En ausencia de recombinación se expresa constitutiva y

ubicuamente la proteína de fusión. Cedido por Martyn Goulding (*Salk Institute, CA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia GFP, lacZ y/o por la técnica de detección de la actividad de  $\beta$ -gal en tejido proveniente de la cola.

**MADM** (Zong et al., 2005).

**Sistema MADM. R26<sup>GR</sup> y R26<sup>RG</sup>**. MGI ID: 3623346 y 3623347. Las líneas de ratones MADM-GR y MADM-RG fueron diseñados para la realización de análisis mosaico con marcadores dobles (MADM: *mosaic analysis with double markers*). El diseño MADM se basa en la recombinación inter-cromosómica mediada por el sistema Cre-*loxP*. En los animales MADM-GR y MADM-RG, cada uno de los marcadores quiméricos recíprocos (RG: N.Dsred2-*loxp*-C.EGFP y GR: N.EGFP-*loxp*-C.Dsred2), no expresan las proteínas fluorescentes debido a la presencia del intrón de *rabbit*  $\beta$ -globina que genera un cambio en el marco de lectura de sus secuencias codificantes. En animales *RG/GR* portadores de la enzima Cre, el par de sitios únicos *loxP* presentes en cada uno de los *loci* homólogos, sirven de sustrato para la recombinación intercromosómica. Luego de producirse esta recombinación, se completa la secuencias codificantes para los dominios N- y C- de cada una de las proteínas reporteras en el mismo *loci* (cromosoma), se restituyen los marcos de lectura y se expresan las proteínas reporteras (ver esquema de la Figura 27A). La especificidad del tejido/células estará determinado por el promotor que controla la expresión de Cre. Entre otras utilidades, el sistema MADM permite marcar unas pocas células de un mismo tipo o linaje, pudiéndose entonces evaluar su morfología y ontología.

Las líneas reporteras *knock-in* fueron generadas por inserción de la construcción GR o RG en el *locus* ROSA26. Esta construcción presenta el *enhancer/promotor* CAG río arriba de la secuencia codificante del dominio N-terminal de EGFP o N-terminal de DsRed. Cedidos por Liqun Luo (*Stanford University, CA, USA*). Genotipificación: PCR utilizando pares de *primers* específicos contra regiones del *locus* ROSA26 que permiten distinguir la presencia o ausencia de la inserción.

**Ai14 td-Tomato** (Madisen et al., 2010). MGI ID: 3809524. Línea reportera condicional *knock-in* generada por la inserción de la construcción Tomato Ai 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 (pCAG-*loxP*-STOP-*loxP*-tdTomato). La progenie resultante de la cruce de esta línea con otra portadora del gen Cre, expresará la proteína tdTomato en aquellos tejidos/células donde también se exprese la recombinasa. Obtenido del *Allen Institute for Brain Science (USA)*. Genotipificación: PCR utilizando *primers* contra la secuencia Tomato, o bien, pares específicos contra distintas regiones del *locus* ROSA26 que permiten distinguir la presencia o ausencia de la inserción de acuerdo a los tamaños diferenciales de los productos resultantes.

En la mayoría de los casos, los alelos modificados fueron mantenidos en heterocigosis. No se observaron manifestaciones fenotípicas asociadas con la presencia de estos alelos en ninguna de las líneas, indicando que una única copia funcional es suficiente para el cumplimiento de la función génica.

### ***Genotipificación de animales.***

#### *Extracción de ADN genómico.*

Para la determinación del genotipo de los animales se extrajo ADN genómico de una biopsia de la cola (aproximadamente 2 mm). El material fue incubado en 100-200 µl de solución de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8.5; SDS 0.2%; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl y 20 µg/ml Proteinasa K, Invitrogen) a 55°C en agitación hasta lograr la degradación total del tejido. Posteriormente, se precipitó el ADN agregando 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó, se lavó el *pellet* con 500 µl de alcohol etílico 70% y se resuspendió en 100-200 µl de agua deionizada con agitación a 55°C.

#### *Reacción de PCR.*

El genotipo de los animales se determinó por la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada alelo de interés. Todas las reacciones de PCR



fueron realizadas en un volumen de 25µl (Mezcla estándar: *Buffer* Taq 1x; 150 µM dNTPs (cada uno); 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.4 µM *primers Fw* y *Rev*; Taq 0.1%; ~100 ng ADN). . El protocolo constó de 30 ciclos (30 seg. 94°C, 30 seg. 60°C, 1 min. 72°C) precedidos por un paso de desnaturalización de 3 min. y otro de elongación final de 5 min., en una termocicladora (Veriti, Applied Biosystems). En unos pocos casos, fue necesario el agregado de DMSO 2.5% (Sigma Aldrich) (\*, ver abajo) a la mezcla de PCR estándar o se elevó la temperatura de *annealing* a 62°C (\*\*) o 64°C (\*\*\*) para obtener una amplificación específica. En cada uno de los diagnósticos se incluyeron los correspondientes controles positivos, negativos y blancos. El producto de reacción se analizó mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa (0.8-2%).

La combinación de *primers* utilizadas para la genotipificación de cada línea de ratones genéticamente modificados fue:

**PCR GFP** (*Gata2<sup>GFP</sup>*, *Gad1<sup>GFP</sup>*, *R26<sup>GFP</sup>*, *ZnG*).

EGFP1: GAC GTA AAC GGC CAC AAG TT

EGFP2: GAA CTC CAG CAG GAC CAT GT

**PCR LacZ** (*Gata3<sup>lacZ</sup>*, *Dbx1<sup>lacZ</sup>*, *Foxn4<sup>lacZ</sup>*, *R26<sup>DTA</sup>* (*R26<sup>foxlacZ-DTA</sup>*), *ZnG*, *R26<sup>lacZ</sup>*).

lacZ392: TTG GCG TAA GTG AAG CGA C

lacZ393: AGC GGC TGA TGT TGA ACT G

**PCR Tomato** (*td-Tomato Ai14*).

Tom-Fw: ACG GCA TGG ACG AGC TGT AC

Tom-Rev: CAG GCG AGC AGC CAA GGC AA

**PCR Neo** (*Gata3<sup>Cre</sup>*, *Foxn4<sup>lacZ</sup>*, *Ascl1<sup>Neo</sup>*, *En1<sup>Cre</sup>*, *Dbx1<sup>lacZ</sup>*, *Nkx2.2<sup>Neo</sup>*, *Chx10<sup>DTA</sup>*, *Sox9<sup>fl/fl</sup>*, *R26<sup>lacZ</sup>*, *R26-DTA*, *ZnG*, *MADM RG-GR*).

NEO F1: GCA TAC GCT TGA TCC GGC TAC C

NEO R1: AAG GCG ATG CGC TGC GAA TC

**PCR Cre** (*Gata3<sup>Cre</sup>*, *En1<sup>Cre</sup>*, *Nestin:Cre*, *Sim1<sup>Cre</sup>*, *Sst<sup>Cre</sup>*).

Cre3-Rv: TAATCGCCATCTTCCAGCAG

CreJ-Fw: GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC

**PCR DTA** (*Chx10<sup>DTA</sup>* y *R26<sup>DTA\*\*</sup>*)

DTA F: TCG TAC CAC GGG ACT AAA CC

DTA R: GCA TCT TGG CCA CGT TTT

**PCR ROSA26 locus 1 ( $R26^{lacZ}$ ,  $R26^{DTA}$ ,  $R26^{GFP}$ ) (\*).**

Alelo wt (\*\*)

Rosa10: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT

Rosa11: CGAGGCGGATCACAAGCAATA

Alelo mutante (\*\*\*)

SA: GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC

Rosa10: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT

**PCR ROSA26 locus 2 ( $MADM$   $RG-GR$ ,  $td$ -Tomato  $Ai14$ ) (\*).**

Alelo wt (\*\*)

Rosa10: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT

Rosa11: CGAGGCGGATCACAAGCAATA

Alelo mutante (\*\*\*)

Rosa4: TCA ATG GGC GGG GGT CGT T

Rosa10: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT

**PCR específica para locus *Foxn4*.**

Alelo wt:

Foxn4-1: GGC CTC TCT GTC CAT ACC TGT A

Foxn4-2: CTA CTC TCT TTG ATG ACA GCT CCC

**PCR específica para locus *En1* (\*\*\*)**

Alelo mutante

En1 F: GAG ATT TGC TCC ACC AGA GC

Cre seq1: CAT CAC TCG TTG CAT CGA CC

**PCR específica para locus *Dbx1*.**

Alelo wt (\*\*)

Dbx1-5': GTG AGG GCC ATG CTT ATG AAG

Dbx1-3': CCT CTT TGG CTC AGT ATC CTG

Alelo mutante

Diagnóstico de presencia por tinción de lacZ en embriones (disección colículo superior).

**PCR específica para locus *Nkx2.2*.**

Alelo *Nkx2.2 wt* (\*\*)

*Nkx22-Fwt*: GAA GCG CCG AGT GCT CTT CTC C

*Nkx22-Rwt*: GCC GAG CTG TAC TGG GCG TTG T

Alelo *Nkx2.2 Neo* (\*\*)

*Nkx22\_REV-DOWN*: GAA CCA CCA GCG ATG GGA AG

*Neo Forward 5*: GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC

**PCR específica para locus *Sox9*.**

Alelo wt:

*Sox9fl Fw*: TAA CAT GGA GGA CGA TTG GAG

*Sox9fl Rev*: GGT TGC AAG GAA GGC TAA GG

Alelo mutante:

NeoF1: GCA TAC GCT TGA TCC GGC TAC C

Sox9fl Rev: GGT TGC AAG GAA GGC TAA GG

### ***Marcación con BrdU.***

La 5-Bromo-2'deoxiUridina (5 mg/ml BrdU, Sigma Aldrich) es un análogo sintético de timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular. Esto permite identificar por inmunohistoquímica a la progenie de aquellas células que se encontraban en división al momento de la administración del compuesto. La marca se conserva luego de una división celular, sin embargo, esta marca se diluye luego de sucesivas duplicaciones de células en proliferación.

***Protocolo de pulso único:*** Se realizó una aplicación intraperitoneal de BrdU (50 mg/kg) (Miller and Nowakowski, 1988) a hembras en distintos estadios de preñez entre E10.5 y E15.5. Posteriormente se colectaron y analizaron las médulas espinales de su progenie en estadios perinatales (P0-P1).

***Protocolo de pulso único corto:*** Las hembras en estadio E15.5 de preñez fueron inyectadas intraperitonealmente con BrdU (50 mg/kg) (Miller and Nowakowski, 1988). Los embriones fueron colectados 3 hs. después.

***Protocolo de 12 hs. de marcación:*** Se aplicaron tres inyecciones intraperitoneales de BrdU (35 mg/kg), una aplicación cada 4 hs., a hembras en distintos estadios de preñez entre E12.5 y E15. Se colectaron los cordones espinales de los embriones E15.5.

***Protocolo de 24 hs. de marcación:*** Se realizaron seis aplicaciones intraperitoneales de BrdU (35 mg/kg), separadas 4 hs., en hembras preñadas iniciando en los estadios E13 o E16. Posteriormente se colectaron los cordones espinales de los animales perinatales (E19.5-P0).

## ***Preparación de tejido espinal.***

### *Disección y criopreservación 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 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) bajo lupa estereoscópica (Olympus SZ61 y Zeiss Stemi2000). Los mismos fueron decapitados, inmovilizados con alfileres de 100-200 µm en placas de *sylgard* (Dow Corning) con *buffer* PBS y eviscerados con pinzas (Dumont #5, FST). Las médulas espinales de los embriones en estadios > E16.5 o perinatales (P0-P3), fueron disecadas previo paso de fijación y el cordón espinal fue aislado abriendo la columna vertebral desde el lado ventral utilizando tijeras de disección (Spring Scissors, angled, FST).

Los embriones o médulas espinales fueron aislados y fijados por una hora en una solución de paraformaldehído 4% en *buffer* PBS (PFA, pH 7.4, Sigma Aldrich) a temperatura ambiente (T.A). Luego, el tejido fue lavado tres veces con *buffer* PBS durante 10-20 min. Finalmente, se lo equilibró *O.N.* en una solución de sacarosa 20% en *buffer* PBS a 4°C para su criopreservación.

En aquellos casos donde se aislaron médulas espinales de animales juveniles o adultos (P10 o edad superior) el tejido fue fijado por perfusión cardíaca. Los animales fueron anestesiados con Avertina 2% (2,2,2 tribromoetanol, 250 µg/g, Sigma Aldrich), y se inmovilizaron en un soporte de disección. Se realizó una incisión a la altura del diafragma, se seccionó la cara superior de la caja torácica y se expuso el corazón. El sistema de perfusión se conectó con un catéter en el ventrículo izquierdo, se seccionó la aurícula derecha y se prosiguió al lavado del sistema circulatorio utilizando 5 ml de *buffer* PBS manteniendo un flujo de ~1 ml/min. Luego se procedió a la fijación del tejido por perfusión de 10 ml de una solución PFA 4% en *buffer* PBS (pH 7.4). Inmediatamente se diseccionó la médula espinal de manera similar a lo descrito para los cordones de los animales de edad ≥ E16.5. Posteriormente se continuó con el proceso de fijación y criopreservación de acuerdo a lo expuesto previamente.

Los embriones o los cordones espinales aislados fueron embebidos en medio de montaje para criostato (OCT, *Optimal Cutting Temperature*, Tissue-Tek o Biopack) y se congelaron progresivamente. 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. Los bloques congelados fueron almacenados a -70°C.

#### *Obtención de secciones transversales de tejido espinal.*

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

### ***Inmunofluorescencia.***

#### *Protocolo general.*

Se secaron las secciones colocando los portaobjetos durante 15 min. en estufa a 37°C y luego se delimitó la superficie a utilizarse con un marcador hidrofóbico (Super Pap-Pen). Se llevaron a cabo tres lavados con *buffer* PBS Tween-20 0.1% (*buffer* PBS-Tw) por 5 min. 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 *buffer* PBS) por al menos una hora a T.A. Luego, las secciones fueron incubadas O.N. en cámara húmeda a 4°C con la dilución correspondiente de anticuerpos primarios en solución de bloqueo (Tabla 1).

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con *buffer* PBS-Tw por 15 min. a T.A. y se incubaron las secciones en cámara húmeda durante al menos 2 hs. a T.A. u O.N. a 4°C, utilizando una dilución 1:250 de los anticuerpos secundarios acoplados a

fluoróforos o a biotina (Tabla 2) en solución de bloqueo. En aquellos casos donde se utilizaron anticuerpos biotinilados se realizaron tres lavados adicionales (*buffer* PBS-Tw por 15 min. a T.A.) y se incubaron las secciones por 45 min. a T.A., con una dilución 1:250 de estreptoavidina acoplada a fluoróforo (Tabla 2) en solución de bloqueo. Posteriormente, se tiñeron los núcleos celulares utilizando una solución del colorante nuclear bis-benzimida Hoescht 3342 (Invitrogen, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en *buffer* PBS-Tw por 5 min. a T.A. y se realizaron tres lavados finales (*buffer* PBS-Tw por 15 min. a T.A.).

Finalmente, se procedió a la deshidratación de las secciones sumergiendo los portaobjetos durante 4 min. en una serie de soluciones de concentración creciente de alcohol etílico (25%, 50%, 75%, 96%, 100%) y dos *stocks* de xileno al 100%. El montaje final se realizó utilizando DPX (Sigma Aldrich) y se dejó secar la preparación O.N. a T.A. protegidas de la luz.

Adicionalmente, en aquellos protocolos de inmunofluorescencia donde se utilizaron anticuerpos primarios generados en ratón, se agregó un fragmento monovalente (Fab) de anticuerpo de burro anti-ratón (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Jackson ImmunoResearch) al bloqueo inicial con el objetivo de disminuir la señal basal. Estos fragmentos bloquean los sitios de unión a inmunoglobulinas endógenas (murinas) impidiendo su reconocimiento por el anticuerpo secundario. Luego se procedió a realizar una serie de tres lavados con *buffer* PBS-Tw por 15 min. a T.A. y se continuó el protocolo como fue descrito previamente.

Tabla 1.

Antígeno	Especie	Fuente	Factor de Dilución
PKD2L1	Conejo	Charles Zuker, <i>UCSD, San Diego, CA, USA</i> (Huang et al., 2006).	23000
PKD1L2	Rata	Generado en el laboratorio	450
Gata2	Cobayo	Kamal Sharma, <i>University Chicago, IL, USA</i> (Peng et al., 2007).	2000
Chx10	Cobayo	S. Pfaff (Thaler et al., 1999)	500
Lhx1/5	Ratón	DSHB 4F2	10
Lhx3	Ratón	DSHB	15
Hb9	Conejo	S. Pfaff (Thaler et al., 1999)	1000
Isl1/2	Ratón	DSHB 40.2D6	10
Pax3	Rata	Martyn Goulding, <i>The Salk Institute, La Jolla, CA, USA</i> (Gross et al., 2000).	400
Pax7	Ratón	DSHB	15
Pax6	Ratón	DSHB	15
Nkx6.1	Ratón	DSHB F55A10	15
Nkx2.2	Ratón	DSHB 74.5A5	25
Olig2	Conejo	Masato Nakafuku, <i>Cincinnati Children's Hospital, OH, USA</i> (Takebayashi et al., 2000).	1000
Lmx1b	Cobayo	Martyn Goulding, <i>The Salk Institute, La Jolla, CA, USA</i> y Tom Jessell, <i>Columbia University, NY, USA</i> .	100
Foxa2	Ratón	Abcam	200
Sox2	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	300
Sox9	Cabra	RD Systems	100
$\beta$ III-tubulina (Tuj1)	Ratón	Covance MMS-435P	500
NeuN	Ratón	Chemicon International, Inc.	500
Nestin	Ratón	Fred Gage, <i>The Salk Institute, La Jolla, CA, USA</i> .	500
DCX	Conejo	Chris Walsh, <i>Harvard University, MA, USA</i> (Gleeson et al., 1999).	1000
GFAP	Cobayo	Fred Gage, <i>The Salk Institute, La Jolla, CA, USA</i> .	1000
NFIA	Conejo	Active Motif	1000
Vimentina	Pollo	Chemicon International, Inc. AB5733	1000
BrdU	Rata	ImmunoDirect MCA2060T	250
GFP	Pollo	Aves GFP-1020	500
GFP	Conejo	Molecular Probes A11122	1000
Ds-Red (Tomato)	Conejo	Clontech	300
$\beta$ -galactosidasa	Conejo	Cappel	1000
$\beta$ -galactosidasa	Rata	Martyn Goulding, <i>The Salk Institute, La Jolla, CA, USA</i> (Lanuza et al., 2004).	1000

**Tabla 2.**

Anticuerpo secundario/Estreptoavidina	Fuente
Anti-ratón acoplado a Cy2	Jackson ImmunoResearch
Anti-ratón acoplado a Cy3	Jackson ImmunoResearch
Anti-ratón acoplado a Cy5	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo acoplado a Alexa 488	Life Technologies
Anti-conejo acoplado a Cy2	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo acoplado a Cy3	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo acoplado a Cy5	Jackson ImmunoResearch
Anti-rata acoplado a Cy3	Jackson ImmunoResearch
Anti-rata acoplado a Cy5	Jackson ImmunoResearch
Anti-cobayo acoplado a Cy2	Jackson ImmunoResearch
Anti-cobayo acoplado a Cy3	Jackson ImmunoResearch
Anti-cobayo acoplado a Cy5	Jackson ImmunoResearch
Anti-Cabra biotinilado	Jackson ImmunoResearch
Anti-Pollo biotinilado	Jackson ImmunoResearch
Estreptoavidina acoplada a Cy3	Jackson ImmunoResearch
Estreptoavidina acoplada a Cy2	Jackson ImmunoResearch
Estreptoavidina acoplada a DyeLight 649	Jackson ImmunoResearch

### *Recuperación antigénica de BrdU por tratamiento ácido.*

Para la detección de BrdU, es indispensable que el nucleótido modificado incorporado en el ADN, esté accesible para su reconocimiento por parte de los anticuerpos específicos, por lo que se aplicó un tratamiento de exposición de epítopes (*retrieval*) durante el protocolo de inmunohistoquímica. Luego de poner a prueba la eficiencia en la detección de distintos tratamientos se optó por la utilización del tratamiento con ácido (Gratzner, 1982; Miller and Nowakowski, 1988).

Como mencionamos anteriormente se secaron las secciones, se realizaron tres lavados con *buffer* PBS-Tw y se procedió al paso de bloqueo. Luego las secciones



fueron incubadas O.N. con la dilución de anticuerpos primarios de interés, excluyendo de la mezcla al anticuerpo primario anti-BrdU.

Posteriormente se realizaron tres lavados con *buffer* PBS-Tw (15 min. a T.A.) y se incubaron las secciones durante al menos 2 hs. a T.A. con la solución de anticuerpos secundarios (Tabla 2). Se repitieron los lavados y se fijaron las secciones con PFA 4% en *buffer* PBS por 5 min.

El *retrieval* ácido del BrdU se llevó a cabo por la aplicación de una solución de HCl (2N en PBS) por 30 min. Se neutralizó el tratamiento incubando las secciones en *buffer* Borato (100 mM, pH 8) por 30 min., con tres lavados con *buffer* PBS-Tw posteriores. Luego se repitió el bloqueo, y se incubaron las secciones O.N a 4°C con el anticuerpo anti-BrdU. Finalmente, se prosiguió con la inmunohistoquímica de acuerdo a lo descrito previamente.

## ***Hibridación in situ.***

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

Para la generación de transcriptos anti-sentido se utilizaron plásmidos linealizados conteniendo parte de la secuencia de interés o fragmentos obtenidos por PCR. Las sondas usadas fueron: mFoxn4 (IMAGE clone 40141600) (Strausberg et al., 2002), mGata2 (Carcagno et al., 2014), mGata3 (Tong et al., 2000), mChx10 (Liu et al., 1994), mNkx2.2 (Briscoe et al., 1999), mPKD1L2 (generado en el laboratorio), mvGluT2 (Slc17a6) (Lanuza et al., 2004), mvGAT (Slc32a1) (Lanuza et al., 2004), mGad1 (Cheng et al., 2004), mvAChT (Slc18a3) (Carcagno et al., 2014).

La transcripción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl de una mezcla conteniendo: DNA molde (~1 µg), ribonucleótidos (1 mM cada uno) incluyendo *dig*-rUTP (350 µM), inhibidor de ARNasas (RNase-out, Invitrogen), DTT (10 mM), *buffer* de transcripción (1X, Promega) y T7, T3 o SP6 RNA polimerasa según corresponda (1 UE, Promega). Se incubó la mezcla por 2 hs. a 37°C y luego se agregaron 2 µl de DNasa I

(RQ Promega) por 10 min. Posteriormente, se precipitó el RNA agregando 100 µl de agua DEPC<sup>(#)</sup>, 2 µl de LiCl (5M) y 300 µl de alcohol etílico (100%). Se centrifugó la mezcla y se lavó el *pellet* con alcohol etílico (70%). Finalmente, se lo resuspendió en 20 µl de agua DEPC<sup>(#)</sup> y se controló el producto de la reacción en geles de agarosa. Las sondas sintetizadas se conservaron a -70°C.

### *Protocolo general.*

**Pretratamiento.** Se secaron las secciones montadas sobre el portaobjetos en estufa a 55°C por 15 min. Se realizaron tres lavados de 3 min. con *buffer* PBS-DEPC<sup>(#)</sup>, se fijó el tejido con PFA 4% por 10 min. y se repitieron los lavados. Luego, se incubó el tejido con proteinasa K (3 µg/ml en *buffer* PBS-DEPC, Invitrogen) por 3 min., se fijó nuevamente con PFA 4% por 5 min. y se repitieron los lavados.

Se realizó un tratamiento de acetilación en una solución de trietanolamina-HCl 1.5%, pH 8 y anhídrido acético 0.25% por 10 min. Por último, se permeabilizó el tejido con una solución del Tritón X-100 1% en *buffer* PBS-DEPC durante 30 min. y se repitieron los lavados.

**Hibridación.** Se pre-incubaron las secciones por 2 hs. con solución de hibridación: Formamida deionizada 50%, SSC 5x (Solución Salina Citrato, 750 mM NaCl, 75 mM Na-citrato en agua destilada), Denharts 5x (Ficoll-400 1g, Polivinilpirrolidona 1g, BSA 1g en 100 ml de agua destilada) y 0.25 mg/ml ARNt de levadura (Invitrogen), en agua tratada con DEPC.

Las sondas marcadas con *dig* (digoxigenina) se diluyeron en la solución de hibridación a una concentración aproximada de 1 µg/ml, se calentaron a 80°C por 5 min. y posteriormente se colocaron en hielo por otros 5 min. Se agregaron 150 µl de la solución de hibridación conteniendo la sonda sobre cada portaobjeto, se cubrieron con un cubreobjetos para evitar la desecación e incubaron en cámara húmeda con una solución de formamida 50% en estufa, a 70°C O.N.

**Lavados y detección.** Luego de 14-18 hs., se retiró el cubreobjetos y se realizaron tres lavados de 45 min. a 70°C con una solución SSC 1x y formamida 50%. Se lavó el tejido con una solución B1-T (100 mM Tris pH=7.5, 0.15 M NaCl, *Tween-20* 0.1%) por 5 min. a T.A. y se incubó con solución de bloqueo (suero de cabra normal 10%, en solución B1-T) por una hora. Finalmente, se incubaron las secciones con anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1/2000, Roche) en solución de bloqueo a 4°C O.N.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 min. con B1-T a T.A. y uno con solución B3 por 5 min. (100 mM Tris pH=9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, *Tween-20* 0.1%, 50 ng/ml levamisol (Sigma Aldrich)). La actividad de la fosfatasa alcalina se reveló con NBT (150 µg/ml nitro azul tetrazolio, Roche), BCIP (175 µg/ml 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato, Roche) en solución B3. La reacción de revelado se detuvo lavando con agua y se montó con una solución de PBS: glicerol 1:1.

(#) DEPC (Sigma Aldrich): Se agregó 3.5 mM de este compuesto, se dejó reposar O.N. y se autoclavó para su inactivación.

### ***Tinción de la $\beta$ -galactosidasa.***

Las criosecciones o fragmentos de tejido obtenidos de biopsias fueron lavados con *buffer* PBS-Tw por 5 min. a T.A. y luego se les agregó *buffer* de reacción (1 mg/ml X-gal, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Tritón X-100 0.2%, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>). Se prosiguió al revelado en oscuridad a T.A. y se detuvo la reacción lavando con *buffer* PBS-Tw. En el caso de las criosecciones, se fijaron con PFA 4% y se montaron con glicerol: PBS.

### ***Microscopía.***

Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas utilizando los microscopios Zeiss modelos LSM5 Pascal y LSM 510 Meta. Las fotos de hibridaciones *in situ* y de ensayos de detección de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (microscopía óptica

de transmisión), se tomaron utilizando microscopios Olympus Bx60 o Zeiss Axioplan acoplados a cámaras CCD. Estos microscopios también se utilizaron para la toma de imágenes de epifluorescencia convencional. Las imágenes fueron montadas utilizando los programas Adobe Photoshop y Adobe Illustrator.

### ***Transporte retrógrado de dextranos.***

Se siguió esencialmente el protocolo descrito previamente (Glover, 1995). Se diseccionaron animales P0 en frío, se removió la porción ventral de la columna vertebral y expuso el cordón espinal. Se realizó un pequeño corte en la región del funículo ventral a nivel de los segmentos torácicos 7-8 (T7-T8) y se aplicó un cristal de dextrano marcado con rodamina (Dextrano conjugado a Rodamina, 3000 MW, Lysine Fixable, Molecular Probes) con un filamento de tungsteno. Las médulas espinales fueron incubadas en una solución de fluido cerebroespinal artificial (en mM: 124 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucosa; pH 7.4) con burbujeo constante con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, por 12 hs. a T.A. Posteriormente, los cordones fueron fijados con PFA 4% en *buffer* PBS por 1 h. y se criopreservaron como se describió anteriormente.

### ***Desarrollo de anticuerpo contra la proteína m-PKD1L2.***

Para la generación del anticuerpo policlonal en rata se utilizó una proteína quimera resultante de la fusión de un péptido de 20 aminoácidos de la proteína PKD1L2 de ratón (m-PKD1L2), y la proteína Lumazina Sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) que funciona como transportador/presentador (Sciutto et al., 2005).

**Generación de las construcciones.** Se utilizó el plásmido pET11a-BLS (Laplagne et al., 2004) para la expresión de la proteína recombinante. En base a la secuencia de la proteína PKD1L2 de ratón, se seleccionó una secuencia de 20 aminoácidos, ubicada próxima al extremo C-terminal intracitoplasmático. El fragmento fue amplificado por PCR y luego clonado en los sitios *NsiI* y *AflII* del vector de expresión.

**Expresión de las proteínas recombinantes.** Se electroporaron bacterias *E. coli* BL21 RIPL *Codon Plus* con el plásmido recombinante y crecieron en medio LB/Ampicilina hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600nm}=0.75$ ). El cultivo fue inducido con 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Genbiotech) por 4 hs. y luego centrifugado. El *pellet* se resuspendió en *buffer* de lisis (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 8). La suspensión de bacterias fue sonicada dos veces, durante 5 min. (intervalos de 15 seg. separados por 20 seg.) y luego centrifugada separándose el sobrenadante (fracción de proteínas solubles en el citoplasma) y el *pellet* (proteínas en cuerpos de inclusión). Se evaluaron ambas fracciones por SDS-PAGE y se detectó la presencia de la quimera en la fracción soluble.

**Purificación de las proteínas quimeras recombinantes.** El primer paso de purificación se realizó por cromatografía en columna de intercambio aniónico Q-Sepharose (Amersham) en un equipo de HPLC Gilson Modelo 320 conectado a un detector UV/Vis Gilson Modelo 152. La columna fue equilibrada en *buffer* A (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 8) y se eluyó con un gradiente lineal de 0-100% de *buffer* B (*buffer* A + 1 M NaCl). Las fracciones del pico fueron concentrada en Centriprep® YM-10 (Millipore). El segundo paso de purificación se realizó por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech). La proteína se eluyó con *buffer* PBS 1x, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.8. Su pureza se evaluó por SDS-PAGE y su especificidad mediante Western Blot contra BLS. Luego fue dializada contra PBS y la quimera fue concentrada a 1-2 mg/ml y conservada a -80 °C hasta su uso.

**Protocolo de inmunización en modelo de rata.** Se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) cinco ratas Wistar utilizando como antígeno la proteína recombinante purificada (150-200  $\mu$ g/animal; 300  $\mu$ l emulsionados en adyuvante oleoso). Inicialmente se utilizó adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich) y a la semana siguiente se comenzó una serie de 4 inoculaciones con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) (una cada dos semana). En la semana 7 se realizó un sangrado exploratorio para evaluar el título del anticuerpo. Se ensayaron los sueros

inmunes en inmunohistoquímicas en tejido espinal de ratón (P0) y por ELISA contra BLS, utilizando como control los sueros pre-inmunes. Al detectar señal positiva y títulos altos del anticuerpo, los animales fueron anestesiados y se procedió a una sangría final.

Los sueros inmunes obtenidos fueron titulados, encontrándose un factor de dilución óptimo para su utilización de ~450.

### ***Electrofisiología: Registro en rebanadas agudas de cordón espinal.***

El aislamiento de tejido y el registro electrofisiológico fue realizado esencialmente de acuerdo a lo descrito previamente (Zhang et al., 2008). Embriones *Gata2<sup>GFP</sup>* o *Gata2<sup>GFP</sup>;Pax6<sup>-/-</sup>* E18.5 o neonatos (P1-P2) fueron decapitados y su cordón espinal aislado en solución de Ringer de bajo calcio de la siguiente composición (en mM): 128 NaCl, 4.69 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.25 MgSO<sub>4</sub>, 0.25 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub> and 22 glucosa; saturado con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Se aisló la región del cordón espinal correspondiente a la porción torácica inferior y lumbar superior y se realizaron cortes coronales de 400 µm utilizando un vibrátomo Leica VY1000E. Las rebanadas fueron transferidas a una cámara conteniendo fluido cerebroespinal artificial (en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 Na-ascorbato, 3.1 Na-piruvato y 10 dextrosa, 315 mOsm) donde fueron mantenidas burbujeadas con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> a 30°C al menos una hora antes de que se iniciaran 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 GFP<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 (4-5 MΩ) rellenos de una solución interna con la

siguiente composición (mM): 150 K-gluconato, 4 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, 1 NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, 10 fosfocreatina. En cada registro se incluyó el colorante Alexa flúor 546 (Invitrogen) en la solución de la pipeta para poder identificar inequívocamente cada una de las células GFP<sup>+</sup> evaluadas. Todos los datos fueron obtenidos utilizando amplificadores Axopatch 200B, digitalizados y adquiridos a 20 KHz en una computadora personal utilizando el programa pClamp10. La capacitancia y la resistencia de la membrana se obtuvieron de los trazos de corrientes evocados por un estímulo hiperpolarizante de 10 mV.

Las corrientes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> voltaje-dependientes fueron registradas aplicando escalones de 1 mV desde un potencial de reposo de la célula de -60 mV. Se observaron potenciales de acción cuando se aplicaron escalones de corriente (en incrementos de 10 pA; 500 ms) bajo una configuración *current clamp*, manteniendo a las células en un potencial de reposo de -60 mV.

### ***Análisis Estadístico.***

Los conteos de células fueron realizados en al menos 10 secciones transversales del cordón espinal de tres individuos de la edad 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 de las mediciones  $\pm$  desvío estándar (DE) a menos que se indique. La distribución normal y la homocedacea de cada conjunto de datos fue puesto a prueba utilizando las pruebas de D'Agostino & Pearson y Barlett ( $p < 0.05$ ), respectivamente. Cuando ambos supuestos fueron validados, 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 el análisis comparativo del fenotipo de *spiking* entre las distintas subpoblaciones de células se utilizó la prueba no-paramétrica de Fisher. Se consideraron significativas a las variaciones que arrojaran una significación asintótica (bilateral) menor a 0.05 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

## **RESULTADOS**



## Resultados.

### ***Diferenciación celular en la médula espinal ventral.***

Durante estadios embrionarios tempranos del desarrollo del tubo neural del ratón los progenitores neuroepiteliales ubicados en la zona ventricular dan origen a distintas poblaciones celulares siguiendo un patrón de organización dorso-ventral definido (Jessell, 2000; Briscoe and Novitch, 2008; Goulding, 2009). Los grupos celulares, que se generan en la región ventral y dorsal del tubo neural entre los estadios E9 y E12, corresponden únicamente a tipos neuronales, indicando que este período es exclusivamente neurogénico (Altman and Bayer, 1984; Jessell, 2000; Briscoe and Novitch, 2008; Goulding, 2009). Posteriormente, a partir de E14, diferentes reportes muestran que los progenitores dan origen a distintos tipos de células gliales (oligodendrocitos y astrocitos) (Richardson et al., 2006; Rowitch and Kriegstein, 2010; Molofsky et al., 2012).

Si bien existe un entendimiento bien detallado de la especificación neuronal temprana, el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la diferenciación y especificación celular en los estadios más avanzados del desarrollo es limitado. Se ha establecido que las etapas embrionarias tardías son gliogénicas, sin embargo, no se ha explorado extensamente la posibilidad de que en este período existan eventos aislados de diferenciación neuronal. En este contexto, nos propusimos analizar la posible generación tardía de subtipos neuronales en el cordón espinal embrionario.

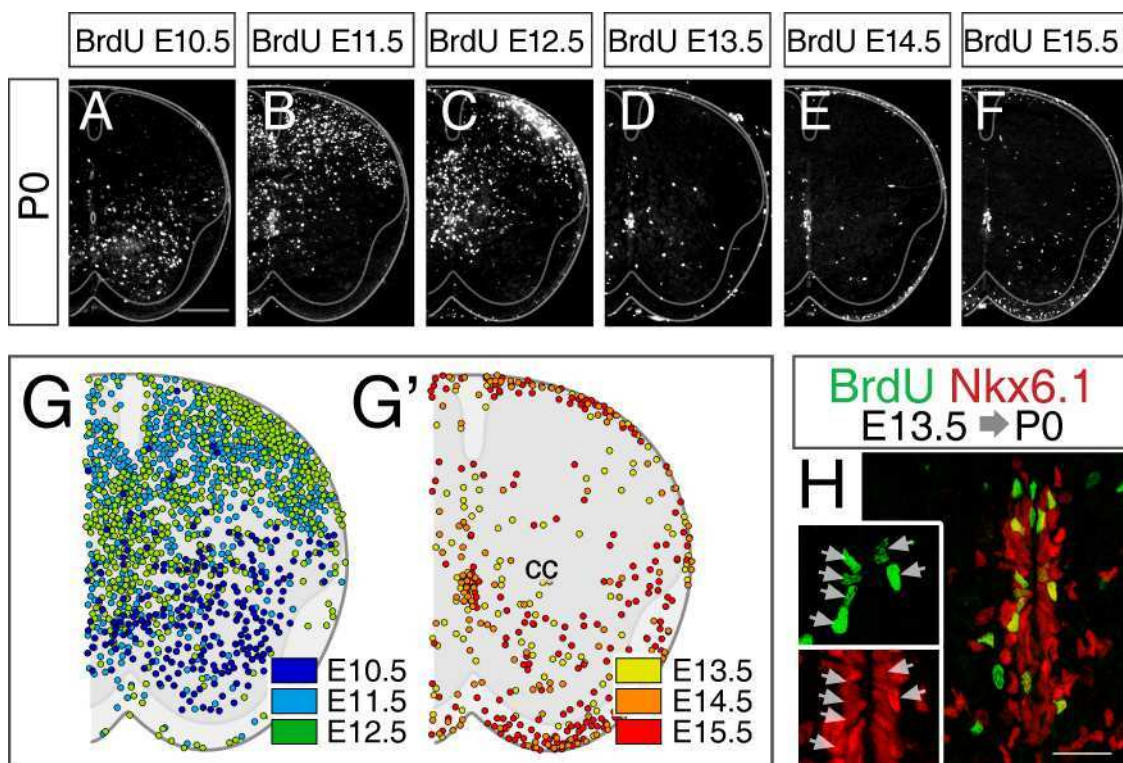
### *Células del canal central se originan en el embrión avanzado.*

Se buscó identificar el origen de distintas poblaciones celulares en el tubo neural murino, a través de experimentos de *pulse-chase* con BrdU. Se inyectaron hembras en distintos estadios de preñez con BrdU (de E10.5 a E15.5), para marcar los progenitores que se encontraban en activa división al momento de su administración y luego detectar la progenie celular en el estadio neonatal (Figura 9A-F).

Se mapeó la distribución de las células BrdU<sup>+</sup> por inmunohistoquímica en secciones transversales de médulas espinales P0 (Figura 9G,G'). Consistentemente con estudios clásicos del desarrollo en el sistema nervioso (Altman and Bayer, 1984), se observó que los pulsos tempranos (E10.5-E12.5) marcan células que se ubican en las astas ventral y dorsal de la médula, que corresponden a neuronas de los circuitos motores y de procesamiento sensorial (Figura 9G). A medida que el desarrollo progresa (pulsos entre E13.5 y E15.5), los eventos proliferativos disminuyen, pero se identifican numerosas células, en apariencia gliales, localizadas en la sustancia blanca o migrando lateralmente (Figura 9G'). Sorprendentemente, además de estas células presuntamente gliales, se detectaron células marcadas en la proximidad del canal central, generadas a partir de progenitores que se encontraban en división entre E13.5 y E15.5 (Figura 9G').

El canal central está rodeado de ependimocitos, aunque contiene también otros tipos celulares (Bruni, 1998; Sabourin et al., 2009; Marichal et al., 2012). Como se muestra en la Figura 9H, las células ubicadas en esta región, incluyendo aquellas marcadas con BrdU a E13.5, expresan el factor de transcripción Nkx6.1, lo cual revela su origen ventral en el tubo neural (Sander et al., 2000; Fu et al., 2003).

Estos resultados indican que en la región del canal central espinal existen poblaciones celulares que se origina tardíamente en el desarrollo, cuya identidad aún se desconoce.



**Figura 9. Células del canal central se originan tardíamente en el desarrollo.**

A-F) Curso temporal del nacimiento de las células en el médula espinal embrionaria del ratón. Se aplicó BrdU en los estadios indicados (E10.5-E15.5) y se analizaron los cordones de los neonatos. Imágenes representativas utilizadas para mapear la distribución mostrada en la Fig. 9G,G'. Barra de escala, 100 μm.

G-G') Distribución de células marcadas con BrdU a P0 cuando se aplicó el pulso entre los estadios E10.5 y E12.5 (G) o E13.5 y E15.5 (G'). Notar la presencia de una marcación densa alrededor del canal central (cc) en los pulsos de BrdU posteriores a E13.5.

H) El pulso de BrdU a E13.5 marca células Nkx6.1<sup>+</sup> que rodean el canal central de la médula espinal P0. Barra de escala, 30 μm.

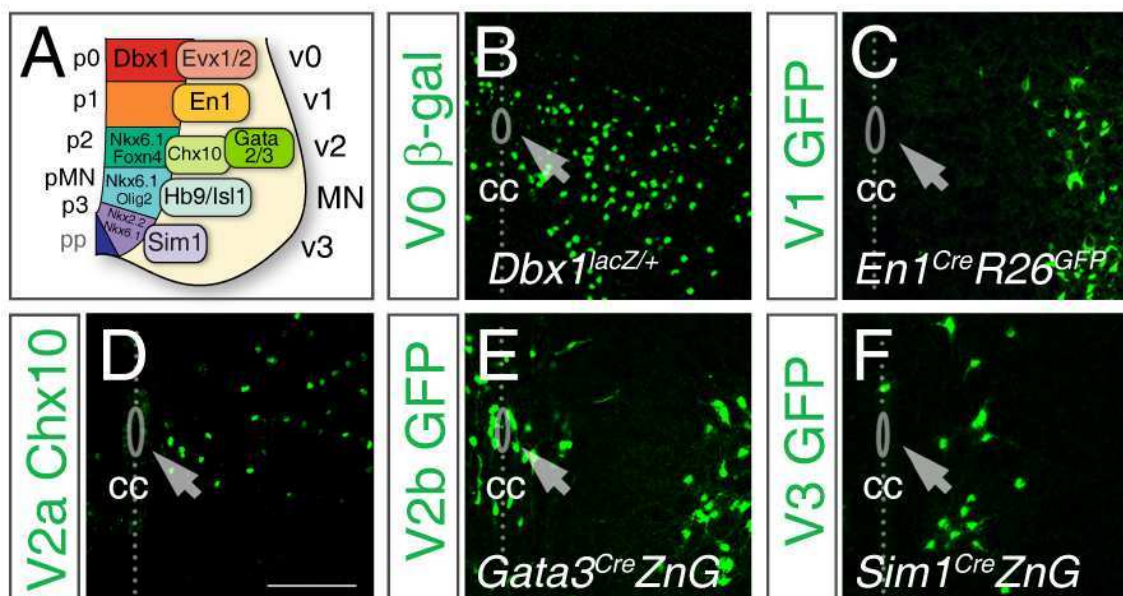
### *Células en el epéndima expresan Gata2, Gata3.*

Con el objeto de analizar la identidad de las células que se ubican alrededor del canal central, se evaluó la contribución de las poblaciones embrionarias ventrales V0-V3 mediante rastreo de linaje celular *in vivo* (Figura 10).

Como se mencionó en la introducción, las interneuronas V0-V3 se desarrollan a partir de dominios de progenitores ventrales p0-p3 y expresan combinaciones específicas de factores de transcripción que permiten su identificación (Jessell, 2000; Briscoe and Novitch, 2008; Goulding, 2009) (Figura 10A). Se utilizaron varias líneas de

ratones modificados genéticamente para la detección de las distintas poblaciones de neuronas ventrales en la médula espinal postnatal.

Se analizaron secciones transversales de médulas espinales de ratones *Dbx1<sup>lacZ</sup>* neonatos (Pierani et al., 2001), en los cuales las neuronas V0 expresan β-galactosidasa (Figura 10B). El seguimiento de las neuronas V1, V2b y V3 se realizó a través de una estrategia de etiquetado indeleble con reporteros condicionales GFP en combinación con las líneas *En1<sup>Cre</sup>*, *Gata3<sup>Cre</sup>* y *Sim1<sup>Cre</sup>*, respectivamente (Sapir et al., 2004; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2014) (Figura 10C,E,F). Las interneuronas V2a se identificaron por inmunohistoquímica contra el factor de transcripción Chx10 (Figura 10D).



**Figura 10. Contribución de las células V0-V3 de la médula espinal a la región endimaria o lámina X.**

A) Esquema del tubo neural ventral embrionario y de los marcadores moleculares de cada uno de los cinco dominios de progenitores y de las neuronas que estos originan.

B-F) Detección de la actividad de β-galactosidasa en secciones de la médula espinal P0 (B, *Dbx1<sup>lacZ/+</sup>*), GFP (C, *En1<sup>Cre</sup>;R26<sup>GFP</sup>*), Chx10 (D), GFP (E, *Gata3<sup>Cre</sup>;ZnG*) y GFP (F, *Sim1<sup>Cre</sup>;ZnG*) para identificar a las interneuronas V0, V1, V2a, V2b y V3, respectivamente. En los cordones *Gata3<sup>Cre</sup>*, se encuentra marca de GFP en las interneuronas V2b en la lámina VII y un nuevo subgrupo *Gata3<sup>+</sup>* cercano a epéndima (E, flecha). Notar la ausencia de células V0, V1, V2a y V3 en la proximidad del canal central (cc) (B, C, D, F). Barra de escala 100 μm.

En estos experimentos se encontró que las neuronas ventrales V0, V1, V2a y V3 se encuentran excluidas de la región del epéndima y de la lámina X espinal (Figura

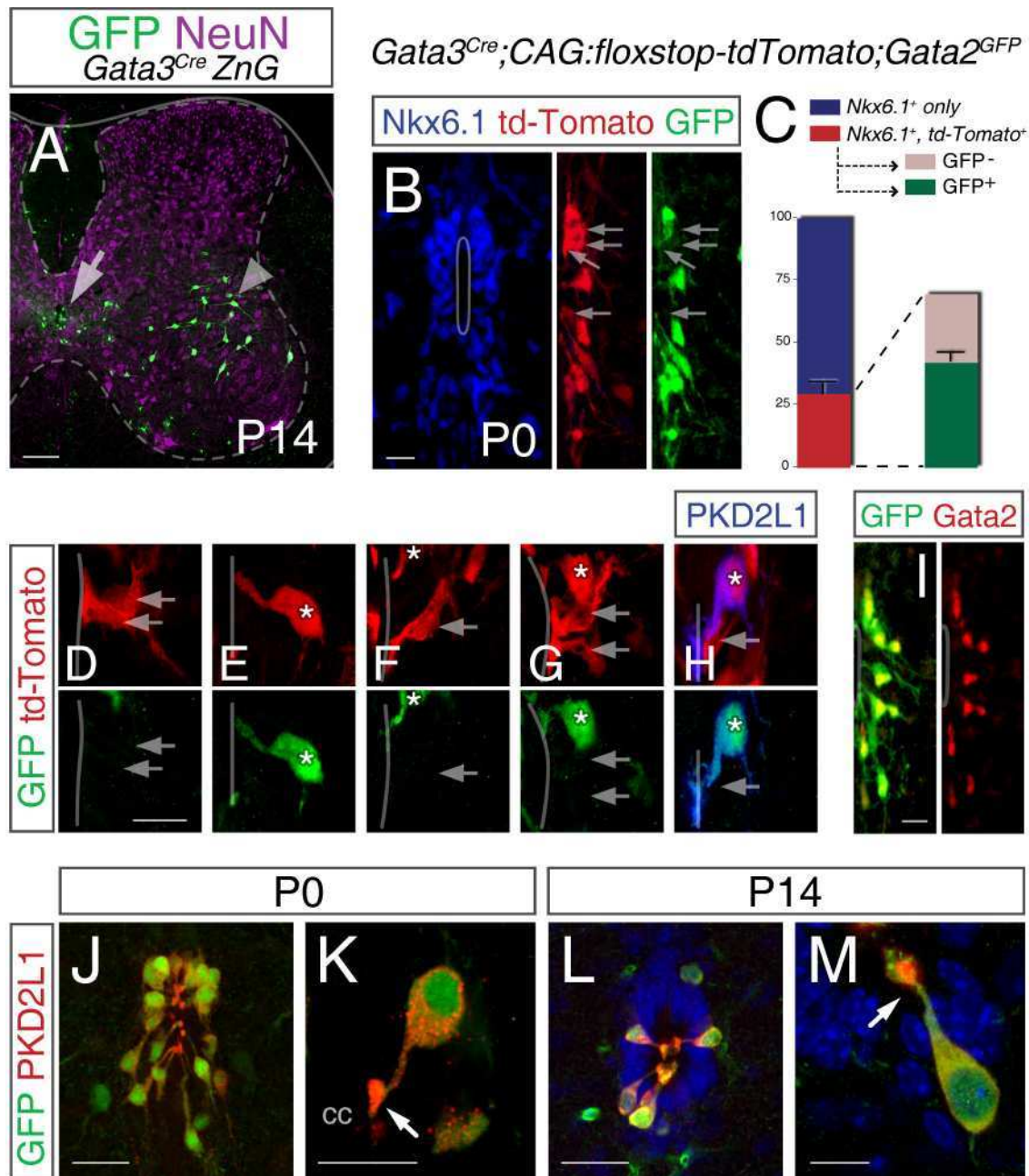
10B,C,D,F, flechas). Por el contrario, el mapeo de células que expresan el factor de transcripción *Gata3*, a través de la expresión de GFP en ratones *Gata3<sup>Cre</sup>;ZnG*, identificó un conjunto de células *Gata3<sup>+</sup>* organizadas alrededor del canal central (Figura 10E, flecha). Estos resultados sugieren que un subgrupo de neuronas V2b, o un tipo celular no descrito que también expresa este factor de transcripción, forma parte de las capas endimaria y/o subendimaria que rodean el canal central.

Para caracterizar mejor estas células, se realizó un seguimiento de linaje celular a largo plazo en ratones *Gata3<sup>Cre</sup>;ZnG* P14. Este análisis confirmó la existencia de al menos dos subgrupos de células *Gata3<sup>+</sup>* (*GFP<sup>+</sup>*): las interneuronas V2b localizadas en la lámina VII, región ventrolateral de la médula espinal (Lundfald et al., 2007; Zhang et al., 2014) (Figura 11A, punta de flecha) y un segundo subgrupo de células *Gata3<sup>+</sup>* en la región del epéndima (Figura 11A, flecha).

Estudios previos han demostrado que las interneuronas V2b de la lámina VII tienen un rol esencial en los circuitos motores involucrados en reflejos espinales y locomoción (Lundfald et al., 2007; Zhang et al., 2014). Sin embargo, el *cluster* de células *Gata3<sup>+</sup>* localizadas en la región del epéndima, parece pertenecer a un conjunto distinto a los previamente caracterizados. En ese sentido, un análisis exhaustivo de las células marcadas en el canal central de la médula espinal de animales neonatos *Gata3<sup>Cre</sup>;Ai14 td-Tomato* reveló que constituyen el  $29\pm 4.6\%$  de las células *Nkx6.1<sup>+</sup>* de la región del epéndima (Figura 11B,C) y que presentan heterogeneidad morfológica (Figura 11D-H).

Considerando que la co-expresión de los factores de transcripción *Gata3* y *Gata2* ha sido ampliamente descrita en el SNC en desarrollo (Karunaratne et al., 2002; Lundfald et al., 2007; Peng et al., 2007), también se decidió evaluar la expresión de *Gata2* en la proximidad del canal central, utilizando animales *Gata2<sup>GFP</sup>* (Suzuki et al., 2006) (Figura 11I). Las inmunohistoquímicas de la médula espinal de animales neonatos *Gata3<sup>Cre</sup>;Ai14 td-Tomato;Gata2<sup>GFP</sup>* mostró que el  $60.5\pm 6.3\%$  de las células *td-Tomato<sup>+</sup>* de la región del canal central son *Gata2<sup>+</sup>* (*GFP<sup>+</sup>*) (Figura 11B,C). Además, la expresión de *Gata2* define un subconjunto de las células *Gata3<sup>+</sup>* con mayor

homogeneidad morfológica, lo que anticipa la posibilidad de que este factor de transcripción se exprese en un tipo celular definido del epéndima (Figura 11E-H, asterisco).



**Figura 11. Expresión de Gata3 y Gata2 en las células del canal central.**

A) Mapeo de destino en la médula espinal *Gata3<sup>Cre</sup>;ZnG* P14. La flecha señala células *GFP<sup>+</sup>* en el canal central y la punta de flecha muestra interneuronas V2b en la región ventrolateral. Barra de escala, 100  $\mu$ m

B-I) Identificación de una población *Gata2<sup>+</sup>,Gata3<sup>+</sup>* en el canal central. B) Sección transversal del canal central de ratones *Gata3<sup>Cre</sup>;CAG:floxstop-tdTomato;Gata2<sup>GFP</sup>* P0 teñidos contra *Nkx6.1*, *td-Tomato* (derivadas de *Gata3*) y *GFP* (*Gata2<sup>+</sup>*). C) Proporción de células *Nkx6.1<sup>+</sup>* que



expresan td-Tomato, y su clasificación de acuerdo a la marcación con GFP (*Gata2<sup>GFP</sup>*) (n=1230 células Nkx6.1). D-H) Heterogeneidad de las células Gata3 del canal central P0. Las flechas señalan las células que son negativas para GFP (D,F,G,H), mientras que las células positivas para ambos reporteros están marcadas por asteriscos (E-H). Las células td-Tomato<sup>+</sup> que expresan Gata2 (GFP) exhiben características morfológicas de CSF-cNs y expresan PKD2L1 (H, asterisco). I) Inmunohistoquímica contra Gata2 indica que GFP recapitula la expresión del factor de transcripción en la médula espinal *Gata2<sup>GFP</sup>* P0. Barras de escala, 10  $\mu$ m.

J-M) Expresión del canal iónico PKD2L1 en las células GFP<sup>+</sup> que rodean el canal central (cc). J,K) Sección transversal de la médula espinal *Gata2<sup>GFP</sup>* P0 teñida con anticuerpos contra GFP y PKD2L1. Magnificación de una célula representativa GFP<sup>+</sup>,PKD2L1<sup>+</sup> con su proceso en contacto con el canal central (K, flecha). L,M) CSF-cNs marcadas con GFP en la capa subependimal de animales *Gata2<sup>GFP</sup>* P14. Notar que PKD2L1 se acumula fuertemente en las terminales celulares bañadas por el CSF (M, flecha, tinción de DAPI en azul). Barras de escala, 10  $\mu$ m en K,M y 30  $\mu$ m en J,L.

El análisis anatómico de las células GFP<sup>+</sup> (*Gata2<sup>+</sup>*) presentes en el canal central de la médula espinal a P0 y P14, permitió su identificación como las neuronas espinales que contactan el líquido cerebroespinal (CSF-cNs, por su nombre en inglés) (Vigh and Vigh-Teichmann, 1971; Vigh et al., 1977; Vigh and Vigh-Teichmann, 1998) (Figura 11J-M). Estas células se caracterizan por una morfología única con proceso “dendrítico” que se proyecta hacia el canal central (Figura 11K,M, flechas).

Además, se encontró que las células GFP<sup>+</sup> (*Gata2<sup>+</sup>*) de la región del epéndima son las únicas que expresan el canal iónico PKD2L1 (TRPP3) (Huang et al., 2006; Djenoune et al., 2014) (Figura 11J-M). Este canal TRP se acumula fuertemente en el proceso bañado por el fluido cerebroespinal (Huang et al., 2006) (Figura 11K,M, flechas).

Por lo tanto, las CSF-cNs son una población de células *Gata3<sup>+</sup>* que se ubican alrededor del canal central y que pueden distinguirse por sus características morfológicas y la expresión específica del canal iónico PKD2L1 y del factor de transcripción *Gata2*.

## ***Las CSF-cNs nacen tardíamente.***

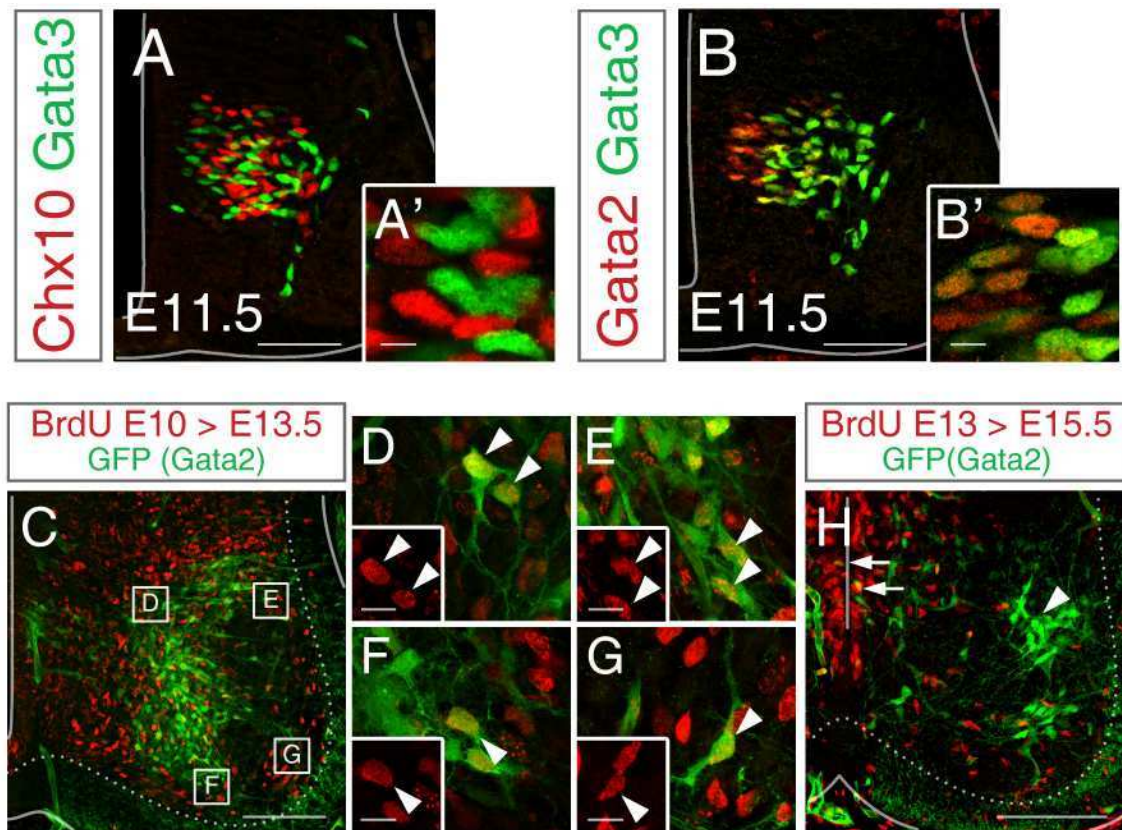
*PKD2L1 se expresa en el desarrollo avanzado.*

Como se mencionó anteriormente, estudios previos han establecido que en el tubo neural embrionario del ratón, el dominio de progenitores ventrales p2 da origen, en etapas tempranas del desarrollo (~E10-E12.5), a al menos dos tipos de interneuronas: excitatorias V2a ( $Chx10^+$ ) e inhibitorias V2b ( $Gata2/3^+$ ) (Zhou et al., 2000; Karunaratne et al., 2002; Li et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Crone et al., 2008; Zhang et al., 2014) (Figura 12A,B).

Dado que se encontró que las CSF-cNs expresan los factores de transcripción *Gata2* y *Gata3* (Figura 11H,J-M), ambos marcadores de las neuronas V2b (Karunaratne et al., 2002; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Zhang et al., 2014), nos preguntamos si las CSF-cNs son un subgrupo de neuronas V2b o constituyen un tipo celular espinal diferente que expresa coincidentemente estos factores de transcripción.

Se observó que una gran proporción de las células V2b ( $GFP^+$ ) de los cordones de embriones *Gata2<sup>GFP</sup>* E13.5, se marcó con BrdU administrado en el estadio E10 (Figura 12C-G). Por el contrario, al aplicar un pulso tardío (E13), no se encontraron células  $GFP^+, BrdU^+$  en la lámina VII de las médulas espinales E15.5 (Figura 12H). Esto indica que las interneuronas V2b en el área ventrolateral, se producen temprano en el desarrollo.



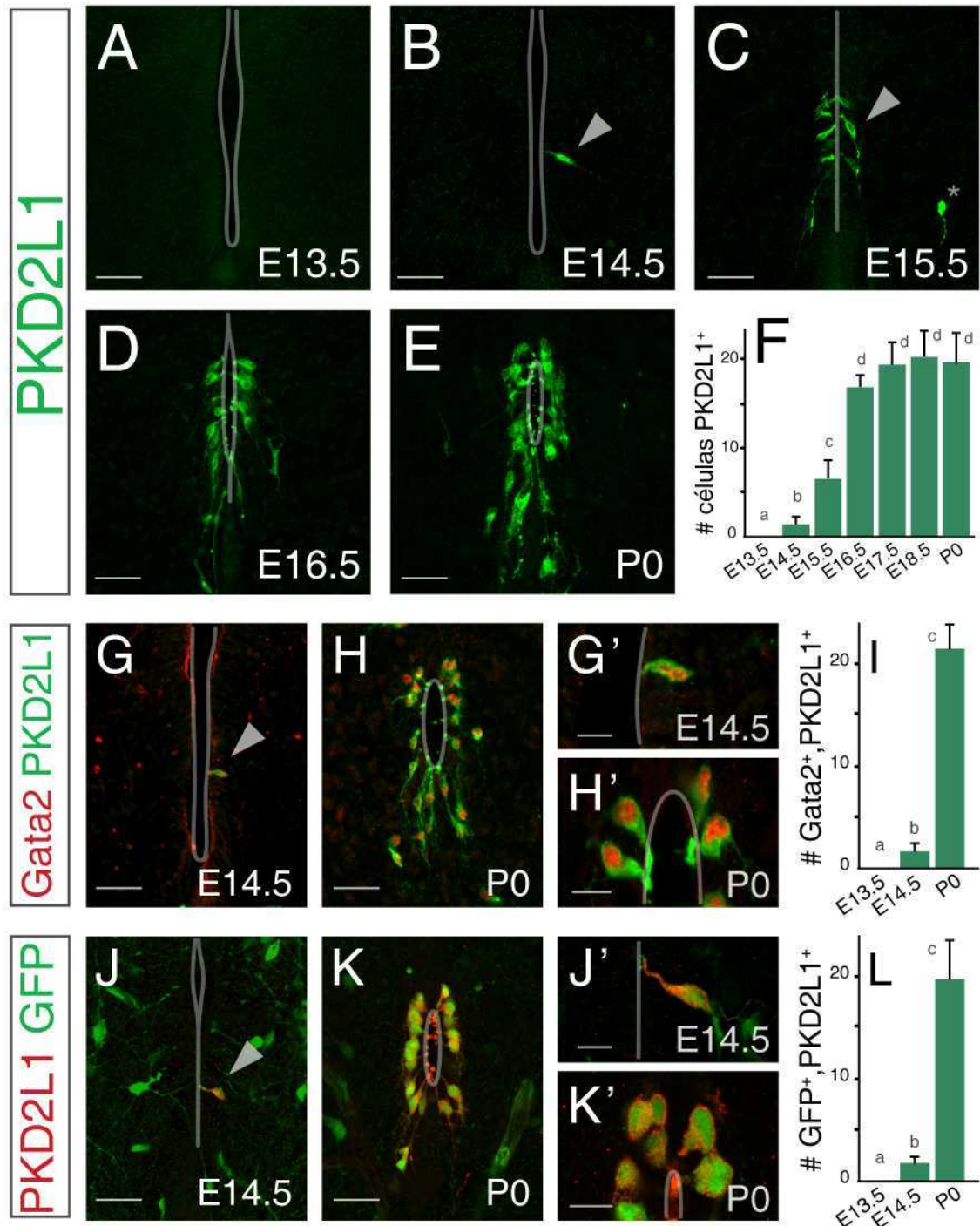


**Figura 12. Las interneuronas V2 se originan tempranamente en el desarrollo**

A-B') Diferenciación temprana de interneuronas V2. Inmunohistoquímica contra Chx10, marcador específico de V2a (A,A') y contra los marcadores de V2b, Gata3 (A-B') y Gata2 (B,B') en el cordón espinal E11.5. Barras de escala, 60  $\mu\text{m}$  en A y B y 6  $\mu\text{m}$  en A' y B'. C-G) Se administró BrdU a E10.5 y se analizaron las células espinales Gata2<sup>+</sup> (GFP<sup>+</sup>, Gata2<sup>GFP</sup>) a E13.5. Se encontró una amplia marcación de BrdU en las neuronas Gata2<sup>+</sup> en la médula espinal ventrolateral (V2b). En D-G se muestran células doble positivas representativas (cabezas de flecha), ver recuadro para el inmunomarcado de BrdU. Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$  en C y 10  $\mu\text{m}$  en D-G. H) Células Gata2<sup>+</sup> (GFP<sup>+</sup>) de origen tardío. Se inyectaron con BrdU hembras preñadas a E13.5 y se colectó tejido embrionario a E15.5. Las flechas en H señalan células Gata2<sup>+</sup>,BrdU<sup>+</sup> en el canal central y la cabeza de fleche señala células Gata2<sup>+</sup>, ubicadas en el cuadrante ventrolateral, que resultaron BrdU negativas. Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de establecer cuándo surgen las CSF-cNs, se examinó en primer término el curso temporal de la expresión de su marcador específico, PKD2L1 (Figura 13A-F). Las primeras células PKD2L1<sup>+</sup> fueron identificadas a E14.5 (1.3 $\pm$ 0.9 células/sección, Figura 13B,G,J). A medida que el desarrollo avanza, el número de células positivas aumenta progresivamente, detectándose 7 $\pm$ 2 células/sección a E15.5 (Figura 13C) y 17 $\pm$ 1.5 células/sección a E16.5 (Figura 13D). En etapas posteriores, el número permanece constante ( $\sim$ 20 células/sección, Figura 13E,H,K). Estos resultados

indican que al menos la expresión de PKD2L1 es un evento tardío en el desarrollo de la médula espinal.



**Figura 13. Las CSF-cNs son células espinales Gata2+ de origen tardío.**

A-F) Expresión de PKD2L1 durante el desarrollo embrionario. Inmunodetección de PKD2L1 en secciones de la médula espinal a E13.5 (A), E14.5 (B), E15.5 (C), E16.5 (D) y P0 (E). F) Cuantificación del número de células PKD2L1<sup>+</sup> por sección en distintos estadios (n=3-10 embriones cada uno). Las barras corresponden a la media±DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ , prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple *post*

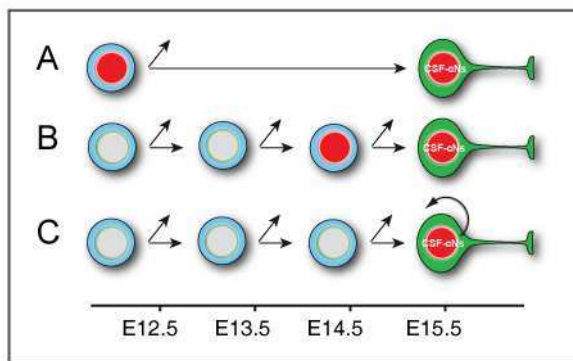
*hoc* de Dunn). Barras de escala, 30  $\mu\text{m}$ . G-L) Expresión de Gata2. Las células PKD2L1<sup>+</sup> expresan Gata2 tanto a E14.5 (G y J) como a P0 (H y K), como se muestra por inmunohistoquímica (G,H) o por la expresión de GFP en ratones *Gata2*<sup>GFP</sup>. El 99% de las células PKD2L1<sup>+</sup> expresan Gata2 (1389/1409 células PKD2L1<sup>+</sup> analizadas). G',H',J' y K' son ampliaciones representativas. I,L) Cuantificación del número de células PKD2L1<sup>+</sup>,Gata2<sup>+</sup> en distintos estadios (n=3-10 embriones cada uno): Inmunohistoquímica contra Gata2 (I, E14.5: 1.5 $\pm$ 0.9, P0: 21.4 $\pm$ 3.2 células Gata2<sup>+</sup>,PKD2L1<sup>+</sup>/sección) e inmunodetección de GFP en médulas *Gata2*<sup>GFP</sup> (L, E14.5: 1.6 $\pm$ 0.8, P0: 19.9 $\pm$ 3.8 células GFP<sup>+</sup>,PKD2L1<sup>+</sup>/sección). Las barras corresponden a la media $\pm$ DE. Las distintas letras indican diferencias significativas (p<0.001, prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple *post hoc* de Dunn). Barras de escala, 30  $\mu\text{m}$  en G,H,J,K y 10  $\mu\text{m}$  en G' H' J' K'.

Asimismo, la detección de células que expresan Gata2 en la zona ventricular a través de inmunohistoquímica contra Gata2 (Figura 13G-I) y el etiquetado con GFP en ratones *Gata2*<sup>GFP</sup> (Figura 13J-L), coincide extensamente con el inicio de la expresión de PKD2L1 (E14.5: 1.5 $\pm$ 0.9 células Gata2<sup>+</sup>,PKD2L1<sup>+</sup>/sección, Figura 13G; 1.6 $\pm$ 0.8 células GFP<sup>+</sup>,PKD2L1<sup>+</sup>/sección, Figura 13J). Además, se encontró que PKD2L1 siempre se co-expresa con Gata2, tanto a E14.5 como a P0 (1389 Gata2<sup>+</sup>/1409 células PKD2L1<sup>+</sup> analizadas, 99%, Figura 13G-H',J-K').

El inicio de la expresión de Gata2 y PKD2L1 en las CSF-cNs a E14.5 representa una diferencia con el grupo de interneuronas V2b que se generan temprano (Figura 12C-G) y que en este estadio ya migraron a la región ventrolateral.

### *Los progenitores de las CSF-cNs proliferan tarde en el desarrollo.*

Considerando que el inicio de la expresión del marcador PKD2L1 en la médula espinal ocurre tardíamente, realizamos una serie de experimentos de marcación con BrdU para evaluar si: a) la expresión de PKD2L1 y Gata2 refleja un paso avanzado en la diferenciación de células CSF-cNs postmitóticas que salieron del ciclo celular en las fases anteriores del desarrollo; b) las CSF-cNs se diferencian a partir de progenitores en activa división durante fases embrionarias avanzadas (>E13); o c) las células PKD2L1<sup>+</sup> son proliferativas (Figura 14). Particularmente, la hipótesis B se sustenta en las observaciones iniciales que mostraron que el epéndima contiene células de nacimiento tardío (Figura 9).



**Figura 14. Hipótesis sobre el momento del nacimiento y el carácter postmitótico de las CSF-cNs.**

A) Las CSF-cNs son células postmitóticas que se originan en estadios tempranos (>E12) pero expresan sus marcadores característicos en estadios más avanzados. B) Las CSF-cNs se generan a partir de progenitores en activa división en estadios embrionarios avanzados (>E13). C) Las CSF-cNs son células proliferativas. En rojo, la incorporación de marca de BrdU.

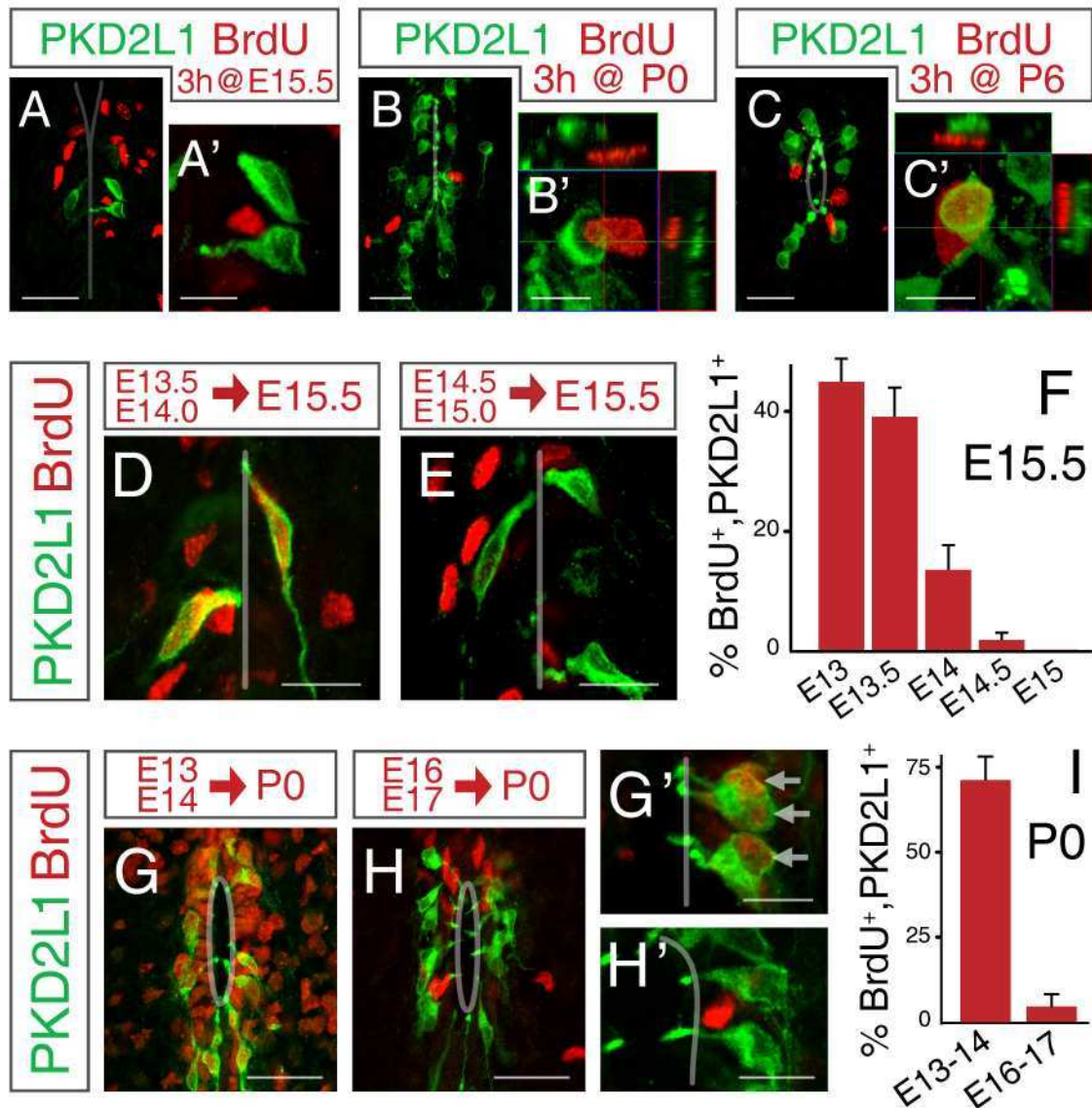
En primer lugar se buscó responder si las CSF-cNs son células proliferantes (hipótesis C). Se administraron pulsos cortos de BrdU para marcar células en división (3 hs. antes de la colecta del tejido, Figura 14C). No se encontraron células PKD2L1<sup>+</sup>,BrdU<sup>+</sup> en las secciones de médulas espinales E15.5 (n=0/360 células PKD2L1<sup>+</sup> analizadas, 4 embriones, Figura 15A,A'). De forma similar, cuando se administró BrdU a animales neonatos o P6 tampoco se hallaron células con ambas marcas (n=0/413 células PKD2L1<sup>+</sup> analizadas a P0, Figura 15B,B' y 0/425 células PKD2L1<sup>+</sup> analizadas a P6, Figura 15C,C'). Estos resultados evidencian que las CSF-cNs son células postmitóticas.

A continuación, se evaluó si el grupo de células de origen tardío observadas en la región del epéndima (Figura 9), corresponde efectivamente a las células PKD2L1<sup>+</sup> (hipótesis B), o bien si las CSF-cNs se generan en estadios más tempranos del desarrollo (hipótesis A). Se administró BrdU durante intervalos de 12 hs. a hembras en distintos estadios de preñez, comenzando a E12 (Figura 14A,B). Se cubrieron diferentes ventanas de desarrollo (de medio día de duración) y se analizó por inmunohistoquímica el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup>,PKD2L1<sup>+</sup> en la médula espinal E15.5 (Figura 15D-F). Se eligió este estadio porque permite estimar el momento en que se dividieron por última vez los progenitores de las primeras células PKD2L1<sup>+</sup> que aparecen.

No se detectaron células PKD2L1<sup>+</sup> marcadas con BrdU cuando el pulso se aplicó 12 hs. antes de la colecta del tejido (pulso E15-E15.5; Figura 15F), mientras que sólo un número pequeño de células PKD2L1<sup>+</sup> se producen de precursores que se encontraban



en fase S 24 hs. antes de las disecciones (~2%, pulso E14.5-E15, Figura 15E,F). Cuando el análogo de timidina se administró a E13-E13.5 o a E13.5-E14, se encontró que entre el 39% y el 44% de las células PKD2L1<sup>+</sup> eran BrdU<sup>+</sup> a E15.5 (Figura 15D,F). Estos resultados indican que los progenitores de las CSF-cNs proliferan activamente en estadios tardíos del desarrollo, a E13-E14 (confirmación de la hipótesis B).



**Figura 15. Las CSF-cNs son células espinales de origen tardío.**

A-C) Las CSF-cNs son células post-mitóticas. Se administró BrdU en los estadios E15.5 (A, A'), P0 (B, B') y P6 (C, C') y se preparó el tejido 3 hs. después. No se detectó colocalización en inmunohistoquímicas con anticuerpos contra PKD2L1 y BrdU (0/360 células PKD2L1<sup>+</sup> en 4 embriones E15.5, 0/413 células PKD2L1<sup>+</sup> de 3 embriones P0 y 0/425 células PKD2L1<sup>+</sup> de 3 embriones P6). B' y C' muestran proyecciones en z donde se evaluaron posibles colocalizaciones. Barras de escala, 30  $\mu$ m en A-C, 10  $\mu$ m en A'-C'.

D-I) Análisis del nacimiento de las CSF-cNs. D-F) Se administró BrdU durante 12 hs. (un pulso

cada 4 hs.) y se analizaron las médulas espinales a E15.5. Los progenitores de las CSF-cNs se dividen activamente a E13-E13.5 como lo revela la marcación con BrdU (D,F,  $\sim 40\% \#BrdU^{+}PKD2L1^{+}/\#PKD2L1^{+}$ ). Una muy pequeña proporción de las células PKD2L1 se marcó cuando se aplicó BrdU a E14.5-E15 (E,F). F) Porcentaje de células PKD2L1<sup>+</sup> a E15.5 que incorporaron BrdU en las etapas de desarrollo indicadas (90-100 células PKD2L1<sup>+</sup>, 3 embriones analizados para cada tiempo). G-I) Las hembras preñadas fueron inyectadas con BrdU durante 24 hs. (un pulso cada 4 hs.) durante los períodos: E13-E14 (G,G') o E16-E17 (H,H') y se analizaron a P0. Se encontró que  $72\pm 7\%$  de células PKD2L1<sup>+</sup> se marcaron en el pulso E13-E14 (G,G'), mientras que su administración a E16-E17 sólo marcó una pequeña proporción (H,H',  $4\pm 4.4\%$ ). G' y H' son ampliaciones representativas. I) Porcentaje de células PKD2L1<sup>+</sup> a P0 marcadas con BrdU a E13-E14 o E16-E17 (27 secciones, 3 animales por cada pulso). Las barras son la media $\pm$ DE. Barras de escala, 30  $\mu$ m en D,E,G,H y 10  $\mu$ m en G',H'.

Se realizaron experimentos adicionales con aplicaciones más prolongadas de BrdU (24 hs.) en los estadios E13 o E16, y se analizó la progenie celular a P0 (Figura 15G-I). La gran mayoría de las CSF-cNs se hallaban marcadas con BrdU al administrarse en el período E13-E14 ( $\sim 70\%$  de las células PKD2L1<sup>+</sup>, Figura 15G,G',I). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de células se marcaron cuando se aplicó entre E16 y E17 ( $\sim 2.5\%$ , Figura 15H,H',I).

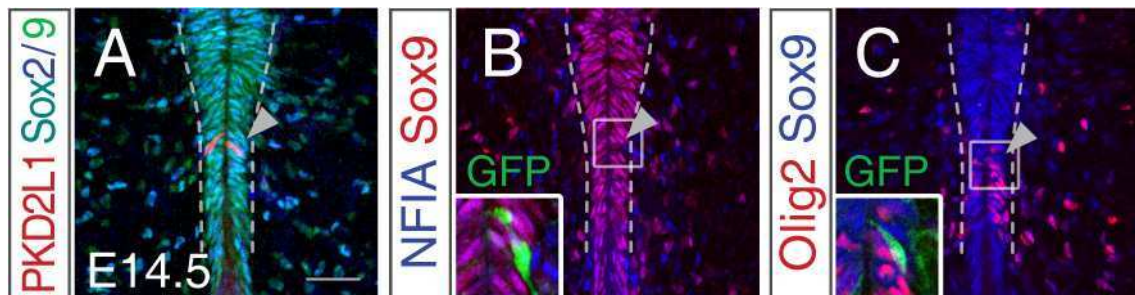
Estas observaciones demuestran que los progenitores de las CSF-cNs están en división en estadios tardíos del desarrollo, a partir de E13, evento que precede en aproximadamente un día y medio a la aparición de los marcadores que identifican a las CSF-cNs postmitóticas (PKD2L1 y Gata2). Además, estos experimentos confirmaron que el nacimiento de las CSF-cNs es enteramente prenatal.

### *Las CSF-cNs se producen en el período gliogénico.*

Resulta importante destacar que la etapa "tardía" del desarrollo del tubo neural ventral ha sido considerada como exclusivamente gliogénica (Altman and Bayer, 1984; Richardson et al., 2006; Hochstim et al., 2008; Rowitch and Kriegstein, 2010; Molofsky et al., 2012). Sin embargo, los experimentos revelan que la generación de la primera cohorte de CSF-cNs ocurre luego del inicio de la diferenciación de astrocitos y oligodendrocitos. Esto se evidencia en el cordón espinal E14.5, donde junto a las primeras células PKD2L1<sup>+</sup> se detecta la presencia de un número importante de

astrocitos Sox2<sup>+</sup>, Sox9<sup>+</sup>, NFIA<sup>+</sup> y de oligodendrocitos Olig2<sup>+</sup> migrando desde la zona ventricular hacia regiones laterales de la médula espinal (Figura 16).

Este resultado no solo confirma la generación tardía de las neuronas del canal central, sino que además demuestra que en el ratón, coexiste la neurogénesis y la gliogénesis.



**Figura 16. Las CSF-cNs surgen junto con las células gliales.**

A-C) A E14.5, estadio en el cual aparecen las primeras CSF-cNs (punta de flecha), pueden identificarse precursores astrocíticos fuera de la zona ventricular (línea de puntos) por la expresión de Sox2 y Sox9 (A). La astroglíogénesis también se evidencia por la detección células NFIA<sup>+</sup>,Sox9<sup>+</sup> migrando a la sustancia blanca (B). Se identificaron oligodendrocitos fuera de la zona ventricular a E14.5 por la expresión de Olig2 (C). Las puntas de flecha y recuadros muestran células PKD2L1 o GFP (ratón *Gata2*<sup>GFP</sup>) en la misma sección. Barra de escala, 30µm.

En resumen, nuestros análisis indican que si bien las CSF-cNs y las interneuronas V2b comparten la expresión de Gata2 y Gata3, se distinguen por su posición diferencial en la médula espinal postnatal, así como también por el momento de su nacimiento. Mientras que las interneuronas V2b se ubican en la lámina VII y se generan entre E10 y E12.5 (Figura 12C-G), los precursores de las CSF-cNs se encuentran en división alrededor de E13 (Figura 15D,F,G,I), y su diferenciación comienza después de E14 (Figura 13B,G,J). Estas observaciones respaldan la idea de que las neuronas pre-motoras V2b y las CSF-cNs son poblaciones celulares ventrales distintas de nacimientos temprano y tardío, respectivamente. Por consiguiente y en contraste con el modelo establecido, la generación de las CSF-cNs en el ratón constituye un evento neurogénico “tardío”, en un momento del desarrollo gliogénico.

### ***Las V2b y las CSF-cNs se distinguen por su dependencia de Foxn4.***

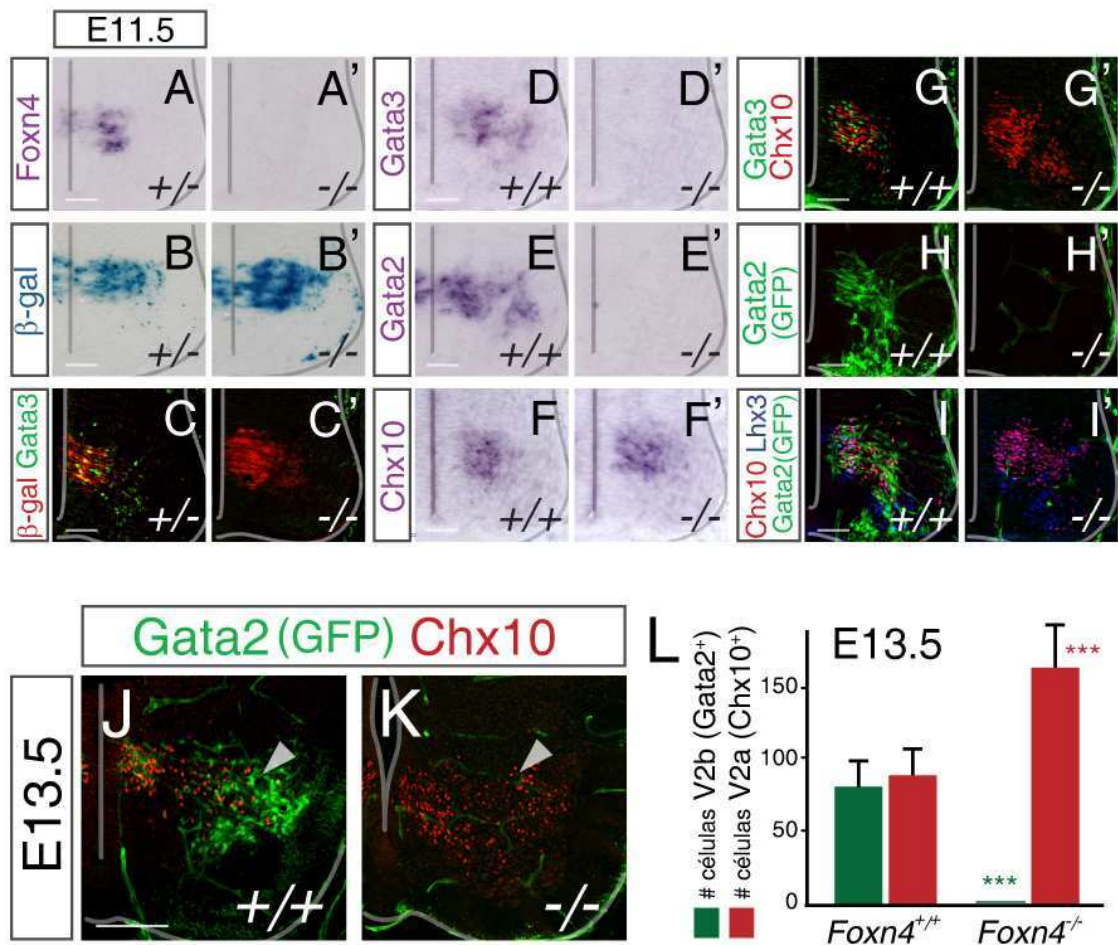
Los resultados hasta aquí presentados indican que las CSF-cNs constituyen una población de células Gata2<sup>+</sup> distinta de las interneuronas V2b, conclusión basada fundamentalmente en el momento de su generación. Para poner a prueba esta hipótesis, se analizó si la diferenciación de las neuronas Gata2 tempranas (V2b) y de las CSF-cNs está controlada por mecanismos genéticos comunes.

#### *Foxn4 controla la especificación V2b temprana.*

El factor de transcripción Foxn4 se expresa en los progenitores p2 que tempranamente producen interneuronas V2, como se evidencia por hibridación *in situ* en médulas espinales *wild type* (Figura 17A) y por la detección de la  $\beta$ -galactosidasa en animales *Foxn4*<sup>lacZ/+</sup> E11.5 (Figura 17B,C). Se ha descrito previamente que Foxn4 tiene un rol fundamental en las decisiones de destino celular binario que regulan la identidad de neuronas V2, resultando necesario para la especificación de interneuronas V2b (Li et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Panayi et al., 2010).

Ensayos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en médulas espinales E11.5 muestran que la neuronas V2b Gata2<sup>+</sup>,Gata3<sup>+</sup> no se desarrolla en los animales mutantes *Foxn4* (Figura 17A',D',E',G',H'). En contraposición, el número de neuronas V2a Chx10<sup>+</sup>,Lhx3<sup>+</sup> se incrementa. (Figura 17F',I',I').





**Figura 17. Foxn4 controla el desarrollo temprano de las neuronas V2b Gata2<sup>+</sup>.**

A-C') Foxn4 se expresa en los progenitores p2. Análisis de la expresión de Foxn4 en secciones transversales de cordones espinales E11.5 *wild type* (*Foxn4*<sup>+/lacZ</sup>, +/+, A-C) y mutantes (*Foxn4*<sup>lacZ/lacZ</sup>, -/-, A'-C') por hibridación *in situ* (A,A'), por revelado de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (B,B') y por inmunohistoquímica contra  $\beta$ -gal (C,C'). La colocalización de Foxn4 ( $\beta$ -gal) y Gata3 indica que el primero se expresa en el linaje V2 (C). Inmunohistoquímica contra Gata3 revela la ausencia de V2b en la médula espinal mutante (C'). Barras de escala, 100  $\mu$ m.

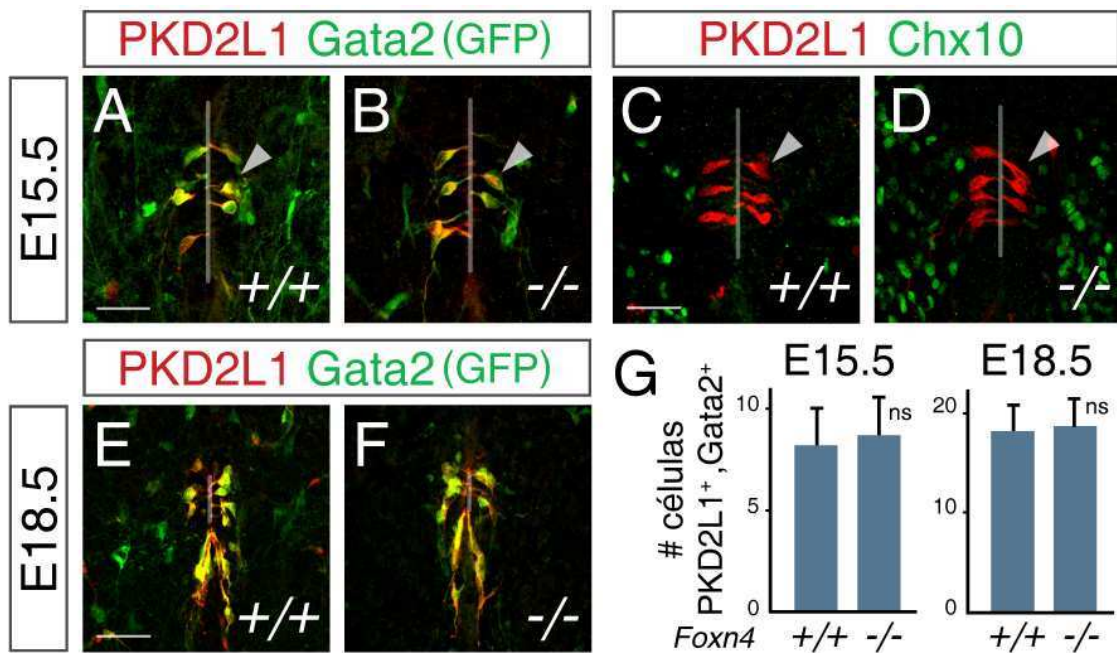
D-L) Los mutantes *Foxn4* carecen de interneuronas V2b. D-F') Hibridación *in situ* contra Gata3 (D,D'), Gata2 (E,E') y Chx10 (F,F') en cordones espinales *wild type* (D-F) y *Foxn4* mutantes (D'-F') E11.5. En los embriones *Foxn4*<sup>-/-</sup> no se detectan células Gata2<sup>+</sup> (D') o Gata3<sup>+</sup> (E'), mientras que aumenta la expresión de Chx10 (F'). G-I') Secciones de cordones espinales E11.5 de embriones *Foxn4*<sup>+/+</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> (D-I) o *Foxn4*<sup>-/-</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> (D'-I') teñidos con anticuerpos contra Gata3 (G,G'), GFP (H,H,I,I'), Chx10 (G,G',I,I') y Lhx3 (I,I'). Las células V2b (Gata2<sup>+</sup>, Gata3<sup>+</sup>) no se desarrollan en los mutantes *Foxn4* (G'-I') y el número de células V2a (Chx10<sup>+</sup>, Lhx3<sup>+</sup>) se incrementa (G',I'). J-L) Secciones de médula espinal E13.5 de embriones *Foxn4*<sup>+/+</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> (J) o *Foxn4*<sup>-/-</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> (K) teñidos con anticuerpos contra GFP y Chx10. En las médulas espinales deficientes en *Foxn4* E13.5, las puntas de flecha muestran que las neuronas V2b (Gata2<sup>+</sup>) son sustituidas por un aumento de la población Chx10. L) Cuantificación del número de neuronas V2a y V2b por hemisección en cordones *wild type* y *Foxn4*<sup>-/-</sup>. Las barras son la media  $\pm$  DE (15 secciones, 3 embriones cada uno; \*\*\*p<0.001, prueba de Mann Whitney). Barras de escala, 100  $\mu$ m.

En concordancia con lo descrito a E11.5, las médulas espinales de embriones E13.5 *Foxn4*<sup>-/-</sup> carecen de interneuronas V2b (*wt*: 81±19, mutante *Foxn4*: 0 células *Gata2*<sup>+</sup>/sección,  $p < 0.001$ ), y la población V2a *Chx10*<sup>+</sup> se expande a expensas de las primeras (*wt*: 89±20, mutante *Foxn4*: 164±29 células *Chx10*<sup>+</sup>/sección,  $p < 0.001$ ). Es decir, las V2b se re-especifican en V2a (Figura 17J-L).

#### *Las CSF-cNs no requieren de Foxn4 para su desarrollo.*

Para determinar si las neuronas *Gata2* tempranas (V2b) y tardías se encuentran gobernadas por mecanismos genéticos comunes, se analizó la diferenciación de las CSF-cNs en mutantes *Foxn4*. A E15.5 se detectaron células *GFP*<sup>+</sup> en contacto con la superficie ventricular de la médula espinal de ratones *Foxn4*<sup>-/-</sup>;*Gata2*<sup>GFP</sup> (Figura 18B). La presencia de este grupo de células *Gata2*<sup>+</sup> contrasta con la ausencia completa de células V2b *GFP*<sup>+</sup> en la región lateral de las médulas mutantes (Figura 18A,B, la marca que se observa en regiones laterales del mutante son vasos *GFP*<sup>+</sup>). Se encontró que todas las células *GFP*<sup>+</sup> co-expresan *PKD2L1*, no hallándose diferencias significativas en su número (*wt*: 8.1±2.3, mutante *Foxn4*: 8.7±2.0 células *PKD2L1*<sup>+</sup>/sección, n.s., no significativo, Figura 18A,B,G). Además, las células *PKD2L1*<sup>+</sup> son negativas para *Chx10* (Figura 18C,D). Esto sugiere que, en oposición a la re-especificación de las interneuronas V2b en los mutantes *Foxn4*, la expresión de *Gata2* en las CSF-cNs no se ve afectada.

El mismo fenotipo se encontró en animales *Foxn4*<sup>-/-</sup> a E18.5, donde el número, la ubicación y morfología de las CSF-cNs eran indistinguibles de las del canal central de los *wild type* (*wt*: 18.4±2.5, mutante *Foxn4*: 18.9±2.9 células *PKD2L1*<sup>+</sup>/sección, n.s., Figura 18E-G).



**Figura 18. Foxn4 no es necesario para el desarrollo de CSF-cNs Gata2<sup>+</sup>.**

A-G) Secciones de médulas espinales E15.5 (A-D) y E18.5 (E,F) de embriones *Foxn4*<sup>+/+</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> (A,C,E) o *Foxn4*<sup>-/-</sup>; *Gata2*<sup>GFP</sup> (B,D,F) teñidas con anticuerpos contra PKD2L1, GFP y Chx10. Las CSF-cNs (Gata2<sup>+</sup>, PKD2L1<sup>+</sup>, punta de flecha) se desarrollan normalmente en los mutantes *Foxn4*, lo que contrasta con la ausencia de las neuronas tempranas Gata2<sup>+</sup> (B,F). En los animales *Foxn4*<sup>-/-</sup>, todas las células GFP<sup>+</sup> co-expresan PKD2L1, indicando que las CSF-cNs son las únicas células Gata2<sup>+</sup> que se diferencian en el *background* nulo (B,F). G) Cuantificación del número de células Gata2<sup>+</sup>, PKD2L1<sup>+</sup> por sección en médulas espinales *wild type* y *Foxn4*<sup>-/-</sup> E15.5 y E18.5. Las barras son la media ± DE (20 secciones, 3 embriones cada uno); n.s., no significativo (prueba de Mann Whitney). Barras de escala 30 μm en A-D y 50 μm en E,F.

En resumen, mientras que la generación de interneuronas V2b de origen temprano requiere la actividad del factor de transcripción Foxn4, la diferenciación de las CSF-cNs no está alterada en el ratón *Foxn4* mutante. Estos resultados indican que mecanismos genéticos diferenciales controlan las decisiones de destino celular de los progenitores ventrales tempranos y tardíos. Por lo tanto, conjuntamente con nuestros estudios sobre el momento del desarrollo y su ubicación diferencial, estas evidencias demuestran que las CSF-cNs constituyen una población distinta de las neuronas espinales Gata2<sup>+</sup>, Gata3<sup>+</sup> previamente descritas.

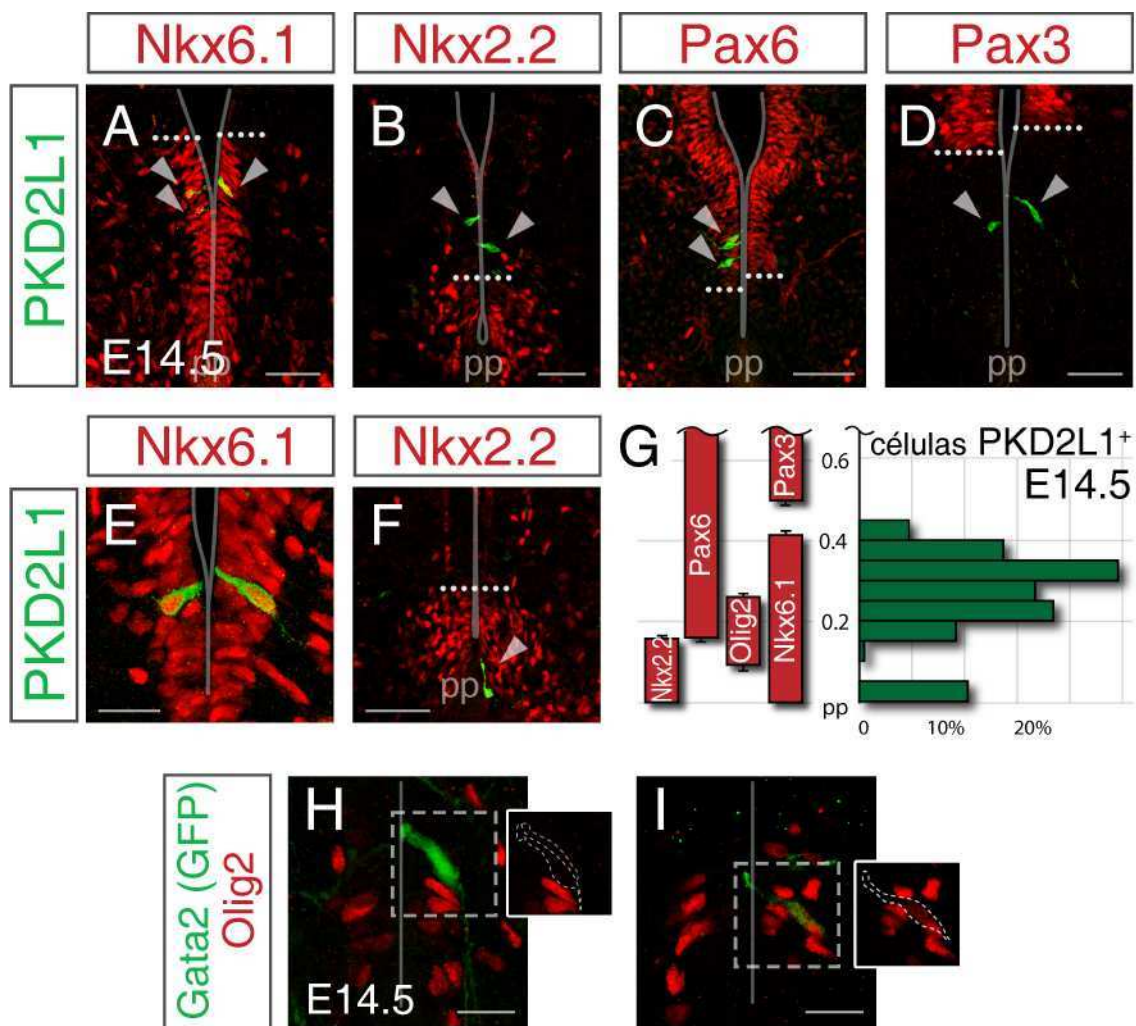
### ***Las CSF-cNs derivan de progenitores espinales ventrales tardíos.***

Con el objeto de identificar cuál es el origen de las CSF-cNs, se llevó a cabo un mapeo del posicionamiento de las células PKD2L1<sup>+</sup> en el eje dorso-ventral del tubo neural a E14.5, etapa en la que se detectan las primeras células de esta clase (Figura 13B,G,J). La ubicación de las CSF-cNs se comparó con los territorios de expresión de varios factores de transcripción (genes de *patterning*) que definen la identidad de dominios progenitores dorso-ventrales del tubo neural, entre ellos Nkx6.1, Pax6, Nkx2.2 y Pax3 (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000) (Figura 19A-F).

Se llevaron a cabo inmunohistoquímicas en secciones transversales de médulas espinales E14.5, y se observó que la totalidad de las células PKD2L1<sup>+</sup> se excluyen de la zona ventricular dorsal Pax3<sup>+</sup> (Figura 19D). Asimismo, se encontró que la mayoría de las CSF-cNs surgen de regiones de progenitores ventrales que expresan los factores de transcripción Nkx6.1 y Pax6 (Figura 19A,C,E), dorsal al dominio de precursores p3, Nkx2.2<sup>+</sup> (Figura 19B).

Se realizó un análisis cuantitativo de la distribución dorso-ventral de las células PKD2L1<sup>+</sup> (n=222 células, 17 embriones; Figura 19G, panel derecho) en referencia a los dominios de expresión de Nkx2.2, Nkx6.1, Olig2, Pax6 y Pax3 a E14.5 (Figura 19G, panel izquierdo). De acuerdo con lo expuesto más arriba, el 90% de las células PKD2L1<sup>+</sup> recientemente generadas, surgen del neuroepitelio ventral Nkx6.1<sup>+</sup>, Pax6<sup>+</sup> dorsal a la región Nkx2.2<sup>+</sup> (Figura 19A-C, E-G). Este patrón sugiere que la mayor fuente de CSF-cNs es el dominio de progenitores “p2 tardíos” y una porción del pMN/OL (Figura 19G, evidenciado por un solapamiento parcial con Olig2). Consistentemente con este resultado, se encontró que el 15% de las células PKD2L1<sup>+</sup> expresan Olig2 a E14.5 (Figura 19H,I).

El análisis posicional también mostró que un subgrupo relativamente menor de CSF-cNs (~10% del total a E14.5) se origina en el polo ventral del tubo neural, en el límite entre el neuroepitelio Nkx2.2<sup>+</sup> y la placa de piso (pp) (Figura 19F,G). La ubicación de este subgrupo, sugiere la existencia de un segundo sitio de origen ventral de CSF-cNs, diferente de la región p2 y pOL tardía.



**Figura 19. Las CSF-cNs derivan de progenitores ventrales.**

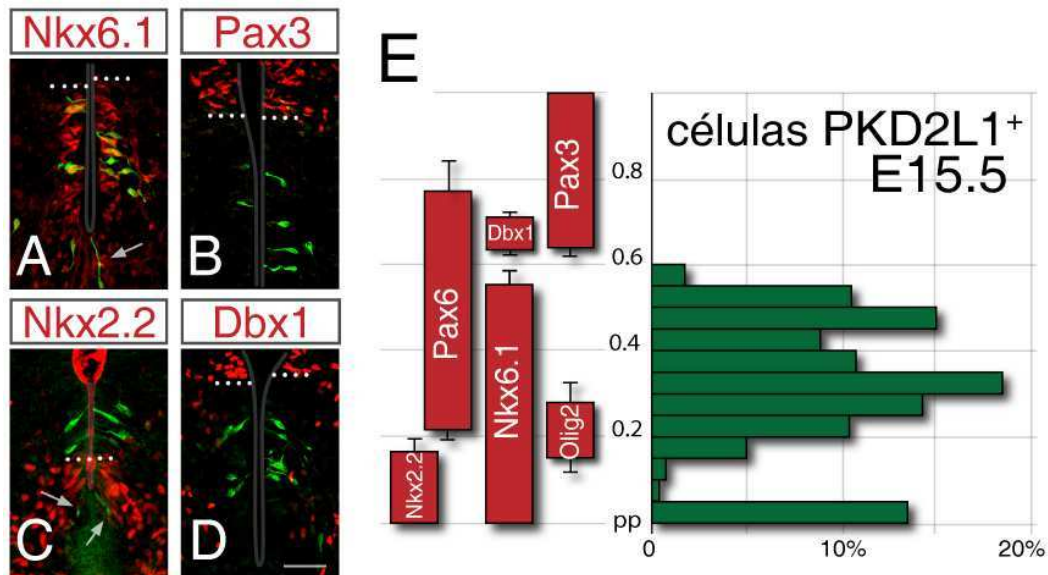
A-G) Origen de las CSF-cNs respecto a la región de expresión de distintos genes de *patterning*. Secciones transversales de médula espinal E14.5 teñidas contra PKD2L1 y Nkx6.1 (A y E), Nkx2.2 (B y F), Pax6 (C), o Pax3 (D). Las puntas de flecha indican células PKD2L1<sup>+</sup> presentes a E14.5. La mayoría de las células PKD2L1<sup>+</sup> recién generadas se ubican en territorios de progenitores que expresan Nkx6.1 y Pax6. Un subgrupo de CSF-cNs se desarrolla en el límite entre la placa de piso (pp) y el neuroepitelio ventral Nkx2.2<sup>+</sup> (F, punta de flecha). Barras de escala, 40  $\mu$ m.

G) Histograma de la posición de 222 células PKD2L1<sup>+</sup> a lo largo del eje dorso-ventral a E14.5 (17 embriones): el 90% de las células se ubica en el área Pax6<sup>+</sup>,Nkx6.1<sup>+</sup> (64% en el dominio p2, 26% en región Olig2<sup>+</sup>) y el 10% restante está adyacentes a la placa del piso. Como referencia, se muestra el patrón de expresión de genes que delimitan dominios ventriculares. La distancia de cada célula a la placa del piso y la posición de los marcadores ventriculares se expresa en relación a la apertura ventricular. Las barras son la media $\pm$ DE.

H-I) Olig2 sólo se expresa en algunas CSF-cNs que se diferencian del dominio de progenitores Pax6<sup>+</sup>,Nkx6.1<sup>+</sup>. En H) se muestran dos CSF-cNs negativas para Olig2 (ver recuadro, línea punteada), identificadas en un cordón espinal *Gata2*<sup>GFP</sup>. Notar que estas células se ubican en el dominio p2 tardío, dorsal a la región Olig2<sup>+</sup>. En I) se muestra una célula que expresa Olig2 que se encuentra inmersa en el dominio pOL. Barras de escala, 40  $\mu$ m.



Luego se llevó a cabo el mismo análisis dorso-ventral en embriones E15.5. Como se muestra en la Figura 20E la distribución de CSF-cNs, tomando como referencias la expresión de los genes Pax3, Nkx6.1, Nkx2.2, Pax6, Dbx1 (Figura 20A-E) y Olig2, fue similar a la hallada a E14.5, evidenciando también los dos orígenes ventrales.



**Figura 20. Análisis posicional del origen de las CSF-cNs a E15.5.**

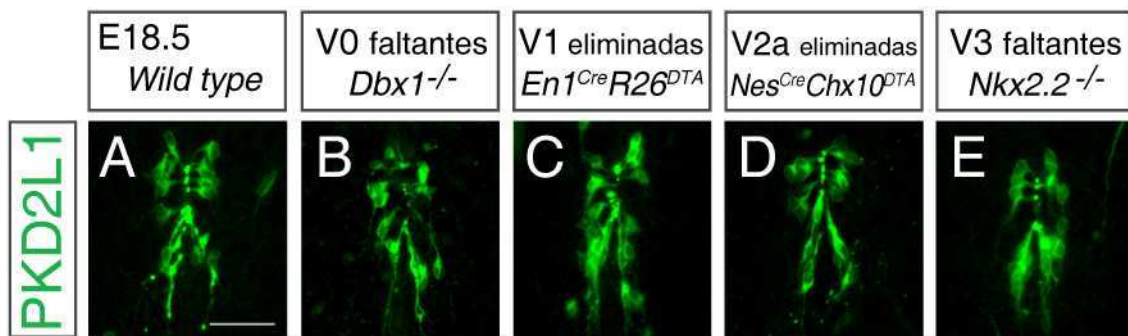
A-D) Secciones transversales de médula espinal E15.5 teñidas contra PKD2L1 y Nkx6.1 (A), Pax3 (B), Nkx2.2 (C), o Dbx1 ( $\beta$ -gal, D). Las células PKD2L1<sup>+</sup> recién nacidas se ubican en el territorio Nkx6.1<sup>+</sup> ventral al dominio p0 (Dbx1<sup>+</sup>). Un subgrupo de células PKD2L1<sup>+</sup> se encuentra lateral a la placa de piso (flechas en A,C). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

E) Histograma de la distribución dorso-ventral de 297 células PKD2L1<sup>+</sup> de la médula espinal E15.5 (7 embriones). Como referencia, se determinó el patrón de expresión de genes que delimitan dominios de progenitores ventriculares. La distancia de cada CSF-cN a la placa del piso y la posición de los marcadores ventriculares se expresa en relación a la apertura ventricular. Las barras son la media  $\pm$  DE.

De manera consistente con los resultados que indican que las CSF-cNs no pertenecen a las poblaciones V0, V1, V2a o V3 (Figura 10), se observó que se desarrollaban normalmente en embriones con alteraciones en estos grupos ventrales (Figura 21). No se encontraron diferencias en el número de células PKD2L1<sup>+</sup> en las médulas espinales de embriones E18.5 *Dbx1*<sup>-/-</sup> que carecen de neuronas V0 (Pierani et al., 2001; Lanuza et al., 2004) (Figura 21B) y en animales deficientes de Nkx2.2 que no desarrollan neuronas V3 (Briscoe et al., 1999) (Figura 21E). Los mismo se detectó en ratones *En1*<sup>Cre</sup>; *R26*<sup>DTA</sup> (Gosgnach et al., 2006) (Figura 21C). y *Nestin*<sup>Cre</sup>; *Chx10*<sup>DTA</sup> (Crone

et al., 2008) (Figura 21D)., donde las células V1 o V2a, fueron eliminadas por ablación genética.

En resumen, estos experimentos indican que las CSF-cNs se generan de dos fuentes distintas en el cordón espinal embrionario avanzado. Aunque la mayoría provienen del dominio de precursores tardíos p2-pOL, un porcentaje inferior se desarrolla en la frontera de la placa del piso. El hecho de que distintos grupo de CSF-cNs presenten diferentes orígenes abre la posibilidad de se trate de una población heterogénea y de que existan distintas subpoblaciones con otras características distintivas.



**Figura 21. Desarrollo de CSF-cNs médulas espinales E18.5 que carecen de distintas poblaciones neuronas ventrales.**

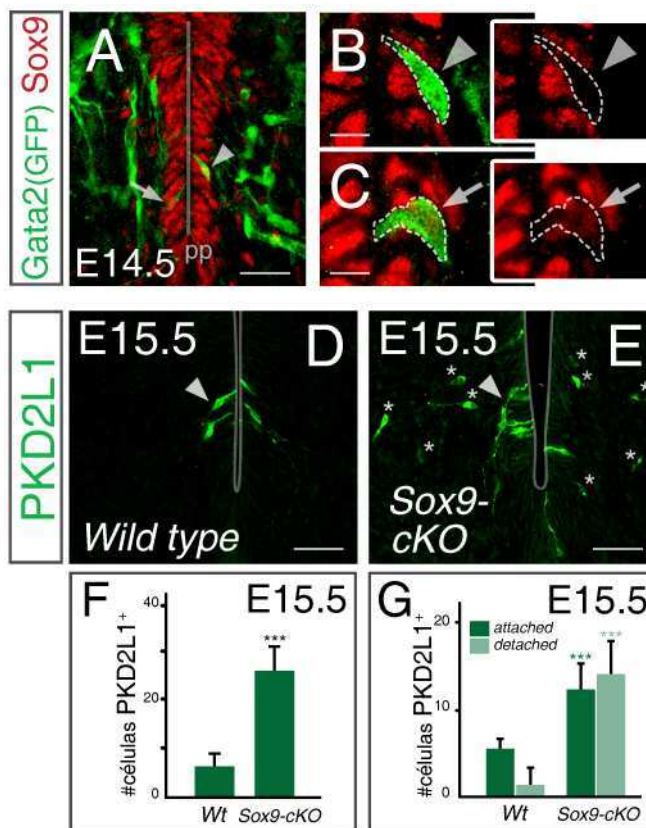
A-E) Inmunohistoquímicas contra PKD2L1 en secciones transversales de la médula espinal E18.5 *wild type* (A), *Dbx1<sup>lacZ/lacZ</sup>* (B), *En1<sup>Cre</sup>;R26<sup>DTA</sup>* (C), *Nestin<sup>Cre</sup>;Chx10<sup>DTA</sup>* (D) y *Nkx2.2<sup>-/-</sup>* (E) donde las poblaciones de neuronas indicadas estaban ausentes. No se encontraron diferencias en el número de células PKD2L1<sup>+</sup> (*wt*: 19.6±2.7, *Dbx1<sup>-/-</sup>*: 20.8±2.9, *En1<sup>Cre</sup>;R26<sup>DTA</sup>*: 20.0±2.4, *Nestin<sup>Cre</sup>;Chx10<sup>DTA</sup>*: 19.5±1.4 y *Nkx2.2<sup>-/-</sup>*: 20.2±2.6 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, 15-18 secciones, 3 embriones cada uno, n.s., prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple *post hoc* de Dunn). Barra de escala, 40 μm.

### ***Astroglénesis alterada produce un aumento de las CSF-cNs.***

Distintos estudios han determinado que el gen *Sox9* cumple un rol esencial en el control de la adquisición de identidad glial en la médula espinal (Stolt et al., 2003; Kang et al., 2012; Molofsky et al., 2013). El hallazgo de que las CSF-cNs se diferencian simultáneamente con astrocitos ventrales nos motivó a investigar si existe una re-especificación de los precursores astrocíticos hacia otros destinos cuando la

diferenciación de este tipo celular se encuentra alterada. Bajo esta hipótesis, se analizó el desarrollo de las CSF-cNs en los mutantes *Sox9*.

En primer lugar, se evaluó la expresión de *Sox9* en cordones espinales E14.5 y se detectaron células positivas en la zona ventricular (Stolt et al., 2003; Finzsch et al., 2008; Scott et al., 2010) (Figura 22A). Asimismo, se encontró que las células *PKD2L1*<sup>+</sup> o *Gata2*<sup>+</sup> (*GFP*<sup>+</sup>) no expresan (Figura 22B) o presentan niveles bajos de *Sox9* (n=24/81 células con marca tenue, Figura 22C). Esto sugiere que dicho factor de transcripción se regula negativamente durante la diferenciación de las CSF-cNs, y se mantiene en precursores astrocíticos que migran lateralmente (Figura 16).



**Figura 22. Desarrollo de las CSF-cNs en médulas espinales *Sox9-cKO* E15.5.**

A-C) *Sox9* se regula negativamente en la diferenciación de las CSF-cNs. A) Secciones transversales de médula espinal *Gata2*<sup>GFP</sup> E14.5 teñidas contra *GFP* y *Sox9*. Una limitada proporción de las CSF-cNs (*GFP*<sup>+</sup>) expresan tenuemente *Sox9* (n=24 de 81 células analizadas, 3 embriones, flecha). B) Magnificación de una CSF-cN *Sox9* negativa (cabeza de flecha, ver línea punteada en recuadro). C) Magnificación de una CSF-cN *Sox9*<sup>+</sup> (flecha, ver línea punteada en recuadro). Barras de escala, 60  $\mu$ m en A y 15  $\mu$ m en B,C. D-E) Alteración en el número y distribución de las células *PKD2L1*<sup>+</sup> en médulas espinales *Sox9-cKO*. Secciones transversales de cordones

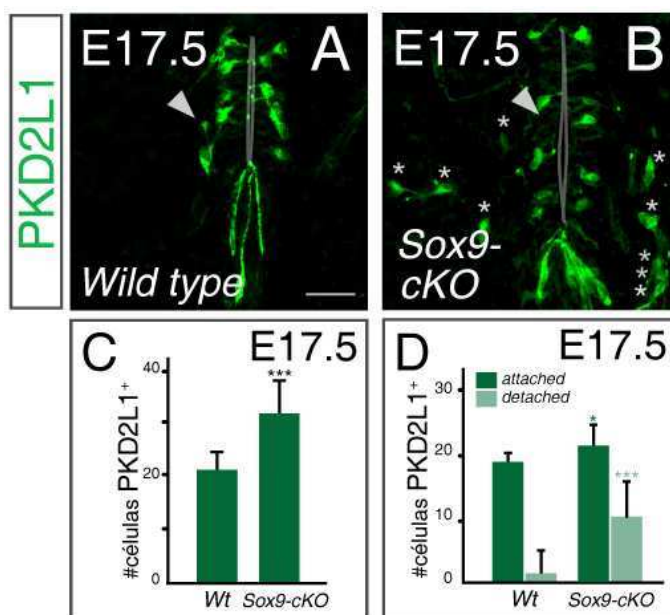
espinales *wt* o *Sox9-cKO* E15.5 teñidos contra *PKD2L1*. Se detectó un aumento significativo del número de células *PKD2L1*<sup>+</sup> en los embriones mutantes (E). La punta de flecha señala las células en contacto con el ventrículo (D,E, *attached*). Notar las numerosas células *PKD2L1*<sup>+</sup> sin contacto apical en regiones laterales apartadas del canal central *Sox9-cKO* (E, asterisco). Barras de escala, 40  $\mu$ m. F-G) Cuantificación del número total de células *PKD2L1*<sup>+</sup> por sección (F) o del número de células *PKD2L1*<sup>+</sup> clasificadas según mantengan contacto apical (*attached*, punta de flecha D,E) o que se ubiquen en el cordón espinal lateral (*detached*, asteriscos E) (G), en cordones *wild type* y *Sox9-cKO* E15.5. Las barras son la media $\pm$ DE (15 secciones, 3 embriones cada uno; \*\*\*p<0.001, prueba de Mann Whitney).



Se analizó la expresión de PKD2L1 en embriones E15.5 mutantes condicionales *Sox9* en el SNC (*Nes:Cre;Sox9<sup>fl/fl</sup>*) (Figura 22D-G), que presentan una diferenciación astrocítica alterada (Stolt et al., 2003; Kang et al., 2012; Molofsky et al., 2013).

Se registró un aumento significativo del número de células PKD2L1<sup>+</sup> en los embriones *Sox9-cKO* (Figura 22D-F; *wild type*: 6.8±1.2, *Sox9-cKO*: 26.4±5.2 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, p<0.001). Además, a diferencia de los animales control, una proporción importante de las CSF-cNs en los embriones mutantes pierden su contacto apical y se localizan más lateralmente, alejándose de la zona ventricular (Figura 22D,E,G; *wt*: 1±0.9, *Sox9-cKO*: 14.1±4.3 células PKD2L1<sup>+</sup> *detached*/sección, p<0.001,).

En concordancia con estos resultados, hallamos también un incremento del número de CSF-cNs en los animales *Sox9-cKO* E17.5 en comparación con las médulas *wild type* de la misma camada (*wt*: 22.5±2.8, mutante *Sox9*: 33.5±4.8 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, p<0.001, Figura 23A-C). En este estadio, también se observaron modificaciones en su ubicación y morfología (Figura 23A,B), encontrándose un fuerte incremento de las células PKD2L1<sup>+</sup> por fuera de la región del canal central (*wt*: 2.2±1.4, mutante *Sox9*: 10.9±3.4 células PKD2L1<sup>+</sup> *detached*/sección, p<0.001, Figura 23A,B,D).



**Figura 23. Desarrollo de las CSF-cNs en *Sox9-cKO* E17.5.**

A-B) Inmunohistoquímica contra PKD2L1 en médulas espinales *wild type* o *Sox9-cKO* E17.5. Además de su aumento, se destaca la presencia de CSF-cNs asentadas lateralmente, fuera del epéndima (*detached*, asterisco). La punta de flecha señala células con contacto apical (*attached*) Barra de escala, 30  $\mu$ m.

C-D) Cuantificación del número total de células PKD2L1<sup>+</sup> por sección (C) o del número de células PKD2L1<sup>+</sup> que mantienen el

contacto con el canal central (*attached*) o que se ubican fuera del área del epéndima (*detached*) (D) en animales *wild type* y *Sox9-cKO* E17.5. Las barras son la media±DE (18 secciones, 3 embriones cada uno; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, prueba de Mann Whitney).

Dado que Sox9 es necesario para diferenciación astrocítica (Stolt et al., 2003; Kang et al., 2012; Molofsky et al., 2013), estos hallazgos sugieren que el aumento del número de células PKD2L1<sup>+</sup> podría deberse al bloqueo de este destino celular y la re-especificación consecuente de dichos precursores hacia el destino CSF-cNs. El incremento de células PKD2L1<sup>+</sup> sin su contacto con la pared ventricular en los embriones *Sox9-cKO*, se fundamenta en que los precursores astrocíticos inician su proceso migratorio pero, en ausencia de Sox9 falla su diferenciación y se re-especifican a CSF-cNs. Estas observaciones constituyen la primera evidencia de que Sox9 está involucrado en el balance de los tipos celulares CSF-cNs vs. astrocitos que se originan simultáneamente de progenitores tardíos ventrales.

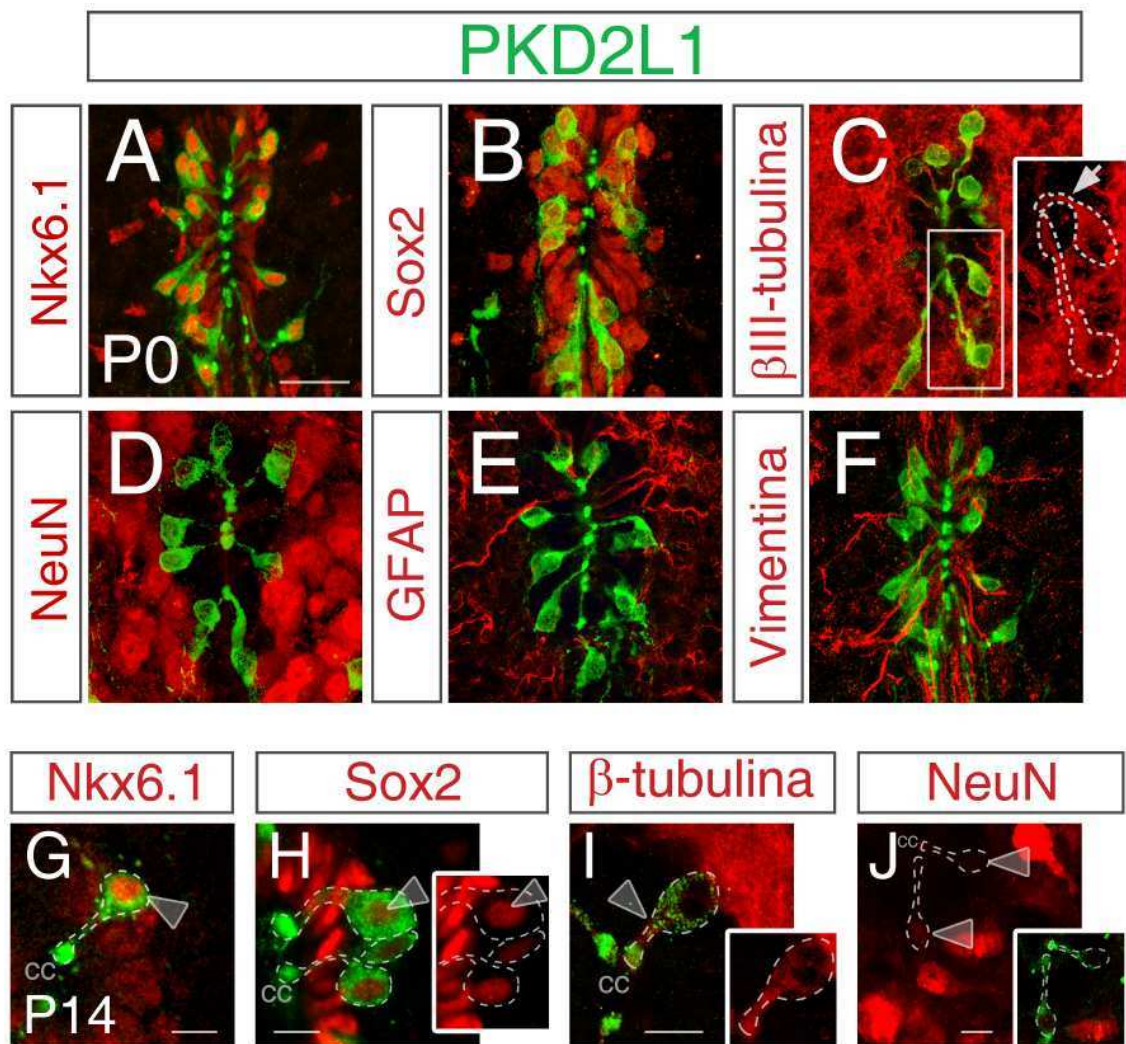
### ***Las CSF-cNs son neuronas GABAérgicas inmaduras.***

A pesar de que las CSF-cNs espinales han sido identificadas a principios del siglo XX y descritas en numerosas especies de vertebrados (Vigh and Vigh-Teichmann, 1971; Vigh et al., 1977; Vigh et al., 1983; Stoeckel et al., 2003; Marichal et al., 2009; Djenoune et al., 2014), sus características no han sido completamente estudiadas en el ratón. Por este motivo, decidimos llevar a cabo una caracterización fenotípica, morfológica y funcional de esta población.

#### *Las CSF-cNs expresan marcadores moleculares de neuronas inmaduras.*

En primer lugar, se evaluó la expresión de diferentes marcadores celulares. Se realizaron inmunohistoquímicas en la médula espinal de animales P0 con anticuerpos contra PKD2L1, en combinación con Nkx6.1 o Sox2. Se encontró que la totalidad de las CSF-cNs expresan Nkx6.1 (Figura 24A) y presentan una marca mayor que los ependimocitos. Llamativamente, las CSF-cNs también son positivas para Sox2 (Figura 24B), un factor de transcripción relacionado con células madres o progenitores neurales con potencial auto-replicativo en el SNC y cuya expresión normalmente disminuye en la diferenciación neuronal (Bylund et al., 2003).

Se encontró que las células PKD2L1<sup>+</sup> son positivas para el marcador neuronal  $\beta$ -III-tubulina (ver los procesos celulares en el cc, Figura 24C, recuadro), pero que no expresan la proteína nuclear NeuN, un marcador característico de neuronas maduras (Figura 24D) (Mullen et al., 1992). Tampoco se encontró colocalización entre PKD2L1 y el marcador astrocítico GFAP (Figura 24E) o la proteína vimentina expresada por las células del epéndima (Figura 24F) (Bodega et al., 1994). Este fenotipo molecular sugiere que las CSF-cNs comprenden una población neuronal inmadura. El patrón de expresión descrito se mantiene sin modificaciones en la médula espinal P14 (Figura 24G-J).



**Figura 24. Las CSF-cNs  $Gata2^+$  son neuronas inmaduras.**

A-F) Expresión de marcadores en las CSF-cNs a P0. El canal central de médulas espinales P0 se analizó con anticuerpos contra PKD2L1 y Nkx6.1 (A), Sox2 (B),  $\beta$ III-tubulina (C), NeuN (D), GFAP (E) o vimentina (F). Las CSF-cNs expresan Sox2, Nkx6.1 y son positivas para  $\beta$ III-tubulina (ver procesos en el canal central, recuadro en C) pero negativas para NeuN, GFAP o vimentina. Barra de escala, 30  $\mu$ m.

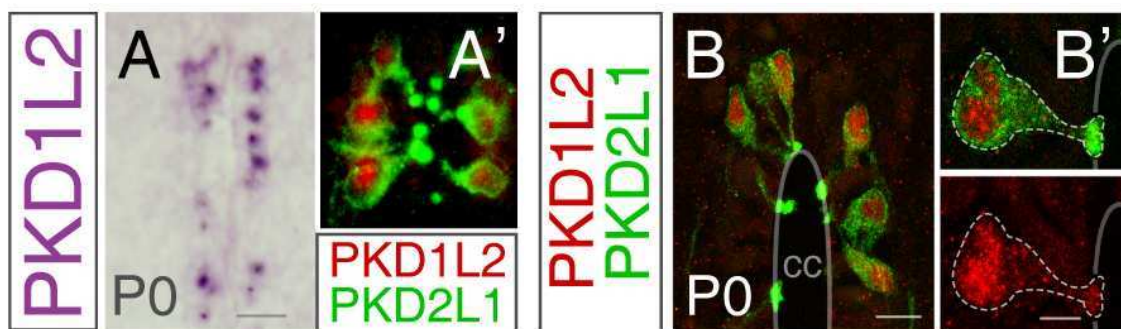
G-J) Expresión de marcadores en las CSF-cNs a P14. Secciones transversales de la médula espinal P14 teñidas con anticuerpos anti-PKD2L1 en combinación con Nkx6.1 (G), Sox2 (H),  $\beta$ III-tubulina (I) o NeuN (J) (cc, canal central). Las CSF-cNs son positivas para Nkx6.1 (mayor marca que células circundantes), Sox2 (marca inferior que en los endimocitos, ver recuadro) y  $\beta$ III-tubulina (ver recuadro), pero son negativas o expresan niveles muy bajos de NeuN (ver recuadro). Barras de escala, 10  $\mu$ m.

*Las CSF-cNs expresan la polycistina 1, PKD1L2.*

En otros sistemas celulares, los canales iónicos del tipo PKD2 se ensamblan con los pertenecientes a la familia PKD1 y forman complejos receptor-canal funcionales

(Semmo et al., 2014). Por esta razón se decidió buscar posibles *partners* de PKD2L1 en las CSF-cNs mediante un rastreo de las imágenes de expresión producidas en el *Mouse Spinal Cord Project del Allen Brain Atlas*. Encontramos que PKD1L2 se expresa en la región del canal central, mientras que otros miembros de la familia están ausentes en el cordón espinal o están presentes en otras regiones espinales.

Luego de la amplificación de un fragmento del cDNA de PKD1L2 en el laboratorio, se analizó su expresión mediante hibridación *in situ* y se confirmó que PKD1L2 se expresa selectivamente alrededor del canal central del cordón espinal P0 y con un patrón similar al de PKD2L1 (Figura 25A). Lo que es más, en ensayos de hibridación *in situ* en combinación con inmunohistoquímica, se determinó que PKD1L2 se co-expresa con PKD2L1 (Figura 25A'). Además, se confirmó por inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra PKD1L2 producido en el laboratorio, la colocalización con PKD2L1 en cordones espinales P0 (Figura 25B,B'). La co-expresión de estas dos proteínas sugiere que PKD1L2 podría funcionar como el *partner* de PKD2L1 en las CSF-cNs.



**Figura 25. Expresión del marcador específico de las CSF-cNs, PKD1L2.**

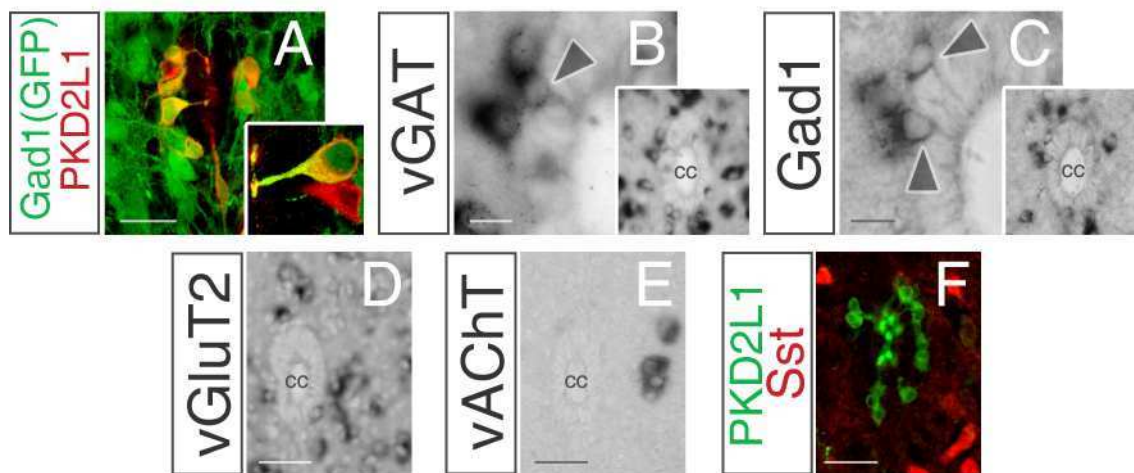
A-A') Hibridación *in situ* contra PKD1L2 (A). En A' se muestra el ARNm de PKD1L2 (rojo), en combinación con una inmunohistoquímica contra PKD2L1 (verde). Barra de escala, 30  $\mu$ m.

B-B') Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PKD2L1 y anti-PKD1L2, este último desarrollado en el laboratorio, en secciones transversales de médula espinal P0. PKD1L2 sólo se detecta en las CSF-cNs co-expresándose con PKD2L1 (cc, canal central). Barras de escala, 10  $\mu$ m en B y 3  $\mu$ m en B'.



*La mayoría de las CSF-cNs son neuronas GABAérgicas.*

Con el objeto de profundizar la caracterización de las CSF-cNs, se evaluó la expresión de marcadores asociados a distintos tipos de neurotransmisión. Encontramos que el 80% de las células PKD2L1<sup>+</sup> se marcan con GFP en cordones espinales *Gad1<sup>GFP</sup>* P0, donde la expresión de la proteína fluorescente verde está bajo el control del promotor de la enzima glutamato descarboxilasa 67 implicada en la síntesis de GABA (Figura 26A). Luego, mediante el análisis de marcadores a P14, se confirmó el fenotipo GABAérgico. Se detectaron por hibridación *in situ* células ubicadas en la región del epéndima con las características morfológicas de las CSF-cNs que expresan el transportador vesicular de GABA, vGAT y la enzima Gad1 (Figura 26B,C, puntas de flecha, ver los procesos de teñidos en contacto con el canal). Asimismo, no se observó la expresión de los transportadores vesiculares de glutamato o acetilcolina, vGluT2 (Figura 26D) y vAChT (Figura 26E), respectivamente.



**Figura 26. Las CSF-cNs son mayoritariamente GABAérgicas.**

A) La mayoría de las CSF-cNs están marcadas con GFP en ratones *Gad1<sup>GFP</sup>* P0, lo que revela un fenotipo GABAérgico (99 células GFP<sup>+</sup> de 114 células PKD2L1<sup>+</sup> analizadas, 2 embriones). El recuadro muestra tanto una CSF-cN positiva, como otra negativa para Gad1. Barra de escala, 30  $\mu$ m. B-E) Hibridación *in situ* en médulas espinales P14 con sondas contra vGAT (B), Gad1 (C), vGluT2 (D) o vAChT (E). Notar la expresión de vGAT y Gad1 en neuronas con procesos en el canal central (puntas de flecha, cc). No hay células que expresan vGluT2 o vAChT en la región del epéndima. Barras de escala, 10  $\mu$ m en B,C, 40  $\mu$ m en D,E. F) Inmunohistoquímica contra PKD2L1 y td-Tomato en médulas espinales *Sst<sup>Cre</sup>;Ai14td-Tomato* P0. La ausencia de marca revela que las CSF-cNs no expresan somatostatina. Barra de escala, 40  $\mu$ m.

En concordancia con lo descrito en lamprea, peces, anfibios y mamíferos (Barber et al., 1982; Dale et al., 1987b, a; Wyart et al., 2009; Djenoune et al., 2014; Jalalvand et al., 2014), estas evidencias indican que la mayoría de las CSF-cNs en el ratón son GABAérgicas. Además, la ausencia de células marcadas con td-Tomato en el canal central de los cordones espinales *Sst<sup>Cre</sup>;Ai14 td-Tomato* P0 revela que, en contraste con lo hallado también en lamprea (Jalalvand et al., 2014), las CSF-cNs en el ratón no producen somatostatina (Figura 26F).

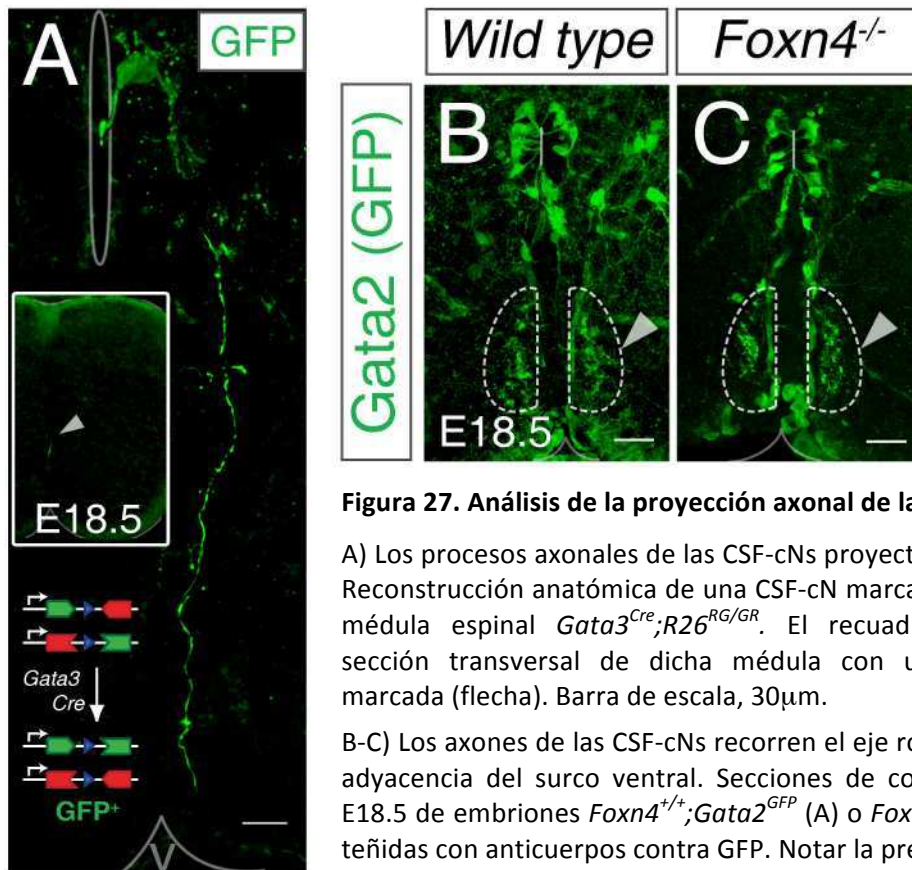
### *El axón de las CSF-cNs proyecta rostralmente.*

Como mencionamos anteriormente las CSF-cNs presentan una serie de características morfológicas únicas: 1) Se encuentran distribuidas rodeando el canal central con el soma en el epéndima o en el subepéndima y 2) Presentan un proceso dendrítico en cuyos terminales se acumula el canal iónico PKD2L1 (Hugnot and Franzen, 2011) en estrecho contacto con el fluido cerebroespinal (Figura 11K,M). Sin embargo, aún no se ha determinado cómo es su proyección axonal.

Para iniciar esta tarea, se realizaron experimentos de marcación de células aisladas utilizando la estrategia MADM (Zong et al., 2005) en cordones espinales E18.5 *Gata3<sup>Cre</sup>;R26<sup>RG/GR</sup>*. Esta metodología se basa en la ocurrencia, a muy baja frecuencia, de eventos de recombinación intercromosómica mediada por el sistema *Cre-loxP*, que restituyen los marcos de lectura para la expresión de GFP o RFP en sólo unas pocas células (Figura 27A, ver Materiales y Métodos).

La reconstrucción anatómica de las CSF-cNs aisladas permitió observar el proceso dendrítico dentro del canal central y reveló la presencia de un proceso axonal (Figura 27A) que se dirige en dirección ventral sin cruzar la línea media. Estos axones, al llegar a la proximidad del surco ventral, aparentan cambiar su dirección hacia el eje rostro-caudal, y organizarse en fascículos próximos al surco ventral. Adicionalmente, dichos fascículos pueden detectarse en secciones transversales de tejido espinal *Gata2<sup>GFP</sup>* E18.5 en la región más ventral del cordón (Figura 27B,C punta de flecha). Es importante señalar que estas proyecciones axonales GFP<sup>+</sup> (*Gata2*<sup>+</sup>) corresponden a las

CSF-cNs ya que también están presentes en mutantes *Foxn4* que carecen de interneuronas V2b (Figura 27C, punta de flecha).



**Figura 27. Análisis de la proyección axonal de las CSF-cNs.**

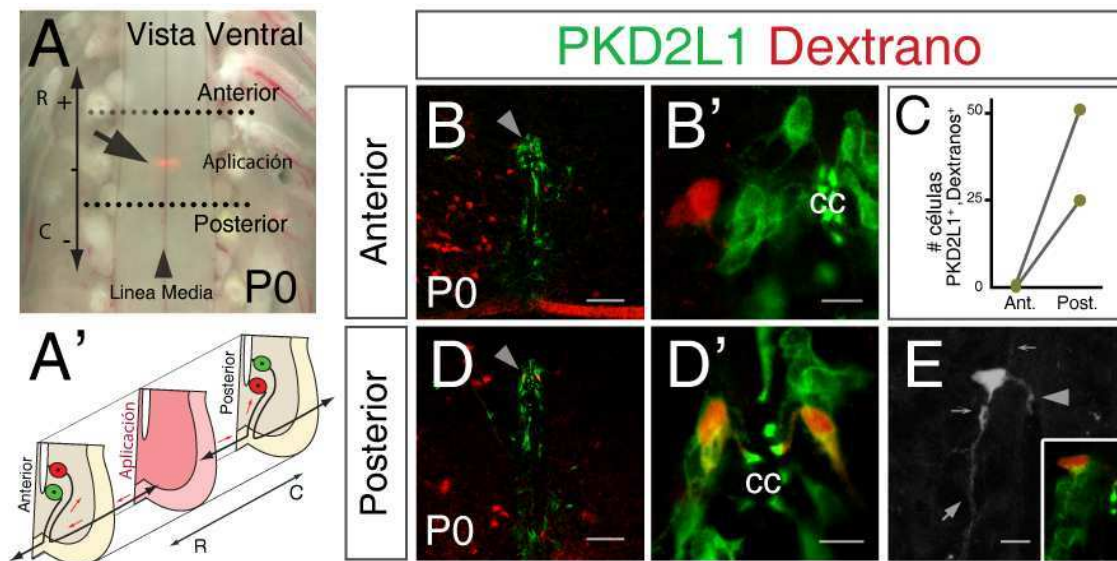
A) Los procesos axonales de las CSF-cNs proyectan ventralmente. Reconstrucción anatómica de una CSF-cN marcada con GFP en la médula espinal *Gata3<sup>Cre</sup>;R26<sup>RG/GR</sup>*. El recuadro muestra una sección transversal de dicha médula con una única célula marcada (flecha). Barra de escala, 30  $\mu$ m.

B-C) Los axones de las CSF-cNs recorren el eje rostro-caudal en la adyacencia del surco ventral. Secciones de cordones espinales E18.5 de embriones *Foxn4<sup>+/+</sup>;Gata2<sup>GFP</sup>* (A) o *Foxn4<sup>-/-</sup>; Gata2<sup>GFP</sup>* (B) teñidas con anticuerpos contra GFP. Notar la presencia de

procesos GFP<sup>+</sup> en el animal *wild type* y también en el mutante *Foxn4* aun cuando este último carece de otras neuronas GFP (línea punteada y punta de flecha). Barras de escala, 30  $\mu$ m.

Para elucidar el sentido rostro-caudal de las proyecciones axonales de las CSF-cNs, se realizaron ensayos de transporte axonal retrógrado de dextranos (Glover, 1995). Se aplicaron dextranos con rodamina en una pequeña incisión transversal en cordones P0 a la altura del segmento T7 (torácico 7) (Figura 28A) y se incubaron los cordones por 12 hs. para que procediera el transporte axonal. En este diseño experimental, las neuronas caudales al sitio de aplicación incorporarán la marca sólo si proyectan axones rostrales, y por el contrario, aquellas neuronas cuyos somas se asientan rostrales a la incisión se marcarán solo si proyectan axones caudales (Figura 28A').





**Figura 28. Las CSF-cNs se proyectan hacia regiones rostrales.**

A) Vista ventral de la médula espinal P0. La flecha señala el sitio de aplicación de los dextranos rodaminados (posición de referencia=0, secciones anteriores +, secciones posteriores -).

A') Esquema del experimento de transporte de dextranos. Sólo las neuronas cuyos axones atraviesan el sitio de aplicación incorporan y transportan retrógradamente el dextrano (soma rojo).

B-E) Se encontraron células PKD2L1<sup>+</sup>,Dextrano<sup>+</sup> en las secciones de la médula espinal P0 posteriores al sitio de aplicación (C-E), pero no en las anteriores (B-C), lo que indica que las CSF-cNs proyectan en sentido rostral (cc, canal central). C) Cuantificación del número de células PKD2L1<sup>+</sup>,Dextrano<sup>+</sup> presentes en segmentos anteriores, o posteriores al sitio de aplicación en dos animales neonatos (número total de neuronas marcadas entre posiciones  $\pm 0.68$  y  $\pm 1.9$ mm, lo que representa entre 1.5 y 4.2 segmentos espinales). E) Morfología de una CSF-cN marcada con dextranos rodaminados. La punta de flecha muestra el proceso dendrítico principal, las flechas pequeñas señalan otras proyecciones de tipo dendrítico, la flecha grande marca el proceso axonal hacia el surco ventral. Barras de escala, 60  $\mu$ m en B,D y 10  $\mu$ m en B',D' y E.

Se evaluó la presencia de CSF-cNs marcadas con dextranos en  $\sim 3$  segmentos espinales a cada lado del sitio de aplicación (posición= $\pm 1.5$ -4.2 segmentos, equivalentes a  $\pm 0.68$ -1.9 mm). El análisis mostró que los somas de las neuronas PKD2L1<sup>+</sup> ubicados en segmentos posteriores al sitio de aplicación incorporaron marca de dextranos (Figura 28C-E), pero no así aquellos localizados en segmentos anteriores (Figura 28B-C). Estos hallazgos indican que las CSF-cNs son neuronas con proyección rostral.

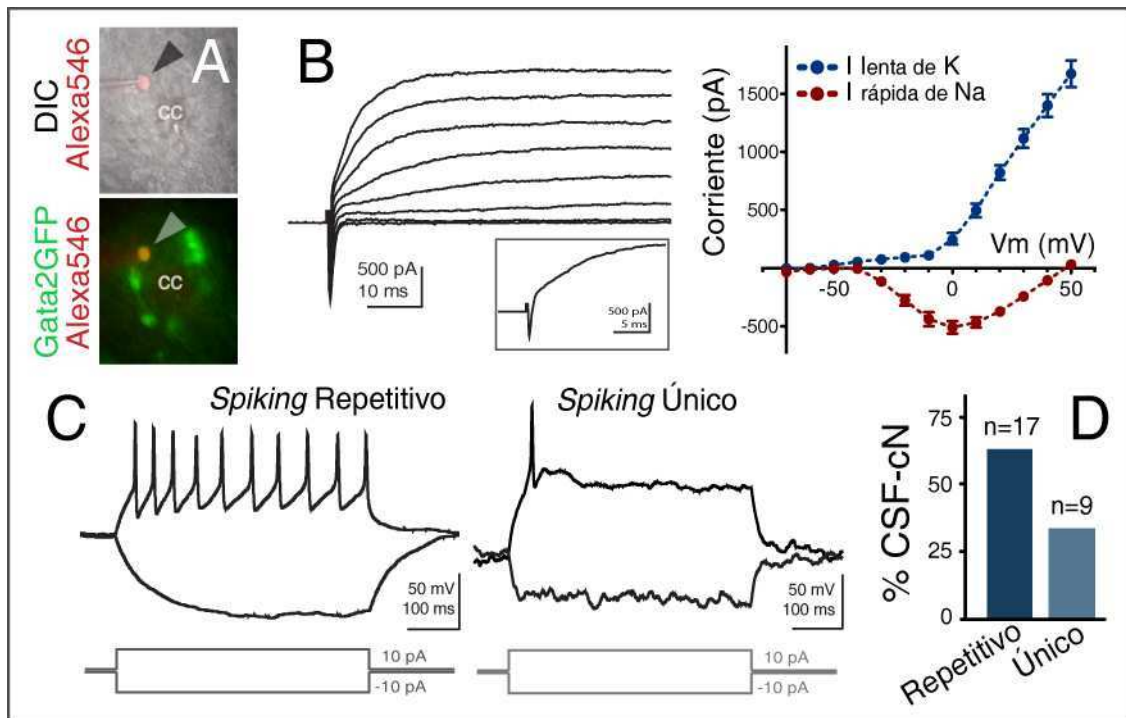
*Las CSF-cNs presentan propiedades electrofisiológicas inmaduras.*

También se analizaron las propiedades electrofisiológicas de las CSF-cNs a través de registros en la configuración *whole-cell patch-clamp* en rebanadas agudas del cordón espinal de animales P1-P2 *Gata2<sup>GFP</sup>*. Las CSF-cNs se identificaron por la expresión de GFP (*Gata2<sup>+</sup>*) y su localización alrededor del canal central (Figura 29A).

Mediante registros en *voltage-clamp* se encontró que las células GFP<sup>+</sup> en el canal central presentan corrientes voltaje-dependientes entrantes rápidas, correspondientes a Na<sup>+</sup> (-551±53 pA) y corrientes salientes más retrasadas de K<sup>+</sup> (1672±115 pA) (Figura 29B). Además, la totalidad de las células analizadas evocaron potenciales de acción en respuesta a pulsos despolarizantes escalonados (en incrementos de 10 pA; 500 ms) en registros de *current-clamp* (n=26/26 células analizadas, Figura 29C). Estos resultados demuestran que las CSF-cNs poseen propiedades activas de membrana.

Se observó que el 66% de las CSF-cNs presentan disparos repetitivos con adaptación reducida en respuesta a pulsos despolarizantes (n=17/26 neuronas registradas, Figura 29C,D), y que el 34% restante de las células GFP<sup>+</sup> (*Gata2<sup>+</sup>*) evaluadas producen un único potencial acción (n=9/26 células, Figura 29C,D). Adicionalmente, las CSF-cNs presentan una alta de resistencia de membrana (5.5±0.5 GΩ; n=25), un potencial de reposo levemente despolarizado (-47.6±1.1 mV; n=21), y una capacitancia de membrana de 8.8±0.7 pF (n=19).

Consistentemente con los resultados obtenidos de la expresión de marcadores moleculares, estos experimentos indican que las CSF-cNs tienen propiedades electrofisiológicas características de neuronas inmaduras.



**Figura 29. Las CSF-cNs presentan propiedades electrofisiológicas de neuronas inmaduras.**

A-D) Registros electrofisiológicos de CSF-cNs identificadas por la expresión de GFP en rebanadas agudas de médula espinal de animales *Gata2<sup>GFP</sup>* P1-P2. A) Ejemplo de una neurona GFP<sup>+</sup> marcada con Alexa Fluóro 546 con una pipeta de *patch* (cc, canal central). B) Panel izquierdo: escalones de voltaje despolarizantes (de -60mV a +10mV) provocan corrientes entrantes rápidas y salientes lentas en neuronas GFP<sup>+</sup>. Panel derecho: gráfico I-V del valor del pico de corriente entrante (rojo) y del valor del estado estacionario de la corriente saliente (azul), correspondiente a las corrientes voltaje-dependiente de sodio y de potasio, respectivamente. Los datos son la media±EE (n=19 células GFP<sup>+</sup>). C,D) Registros representativos de potenciales de acción provocados por escalones de corrientes despolarizantes (10 pA, 0.5 seg.). Se encontraron dos patrones de disparo diferentes en las CSF-cNs: potencial de acción repetitivo (n=17/26 neuronas analizadas), y potencial de acción único (n=9/26 neuronas analizadas). No se observaron patrones de disparo mixtos en la misma neurona, en 10 ensayos.

En resumen, las CSF-cNs presentan una morfología característica, con una proyección axonal que se dirige a la región ventral de la médula espinal y luego rostralmente. Las CSF-cNs espinales en el ratón expresan Sox2 y Nkx6.1, así como también el marcador neuronal temprano  $\beta$ -III-tubulina aunque no expresan NeuN. Además, expresan específicamente el canal iónico PKD1L2, posible *partner* funcional del PKD2L1. Estas evidencias, conjuntamente con estudio de las propiedades electrofisiológicas y del perfil de neurotransmisión, sugieren que las CSF-cNs son una novedosa población de neuronas GABAérgicas inmaduras.

## ***Dos subpoblaciones de CSF-cNs se distinguen anatómica y electrofisiológicamente.***

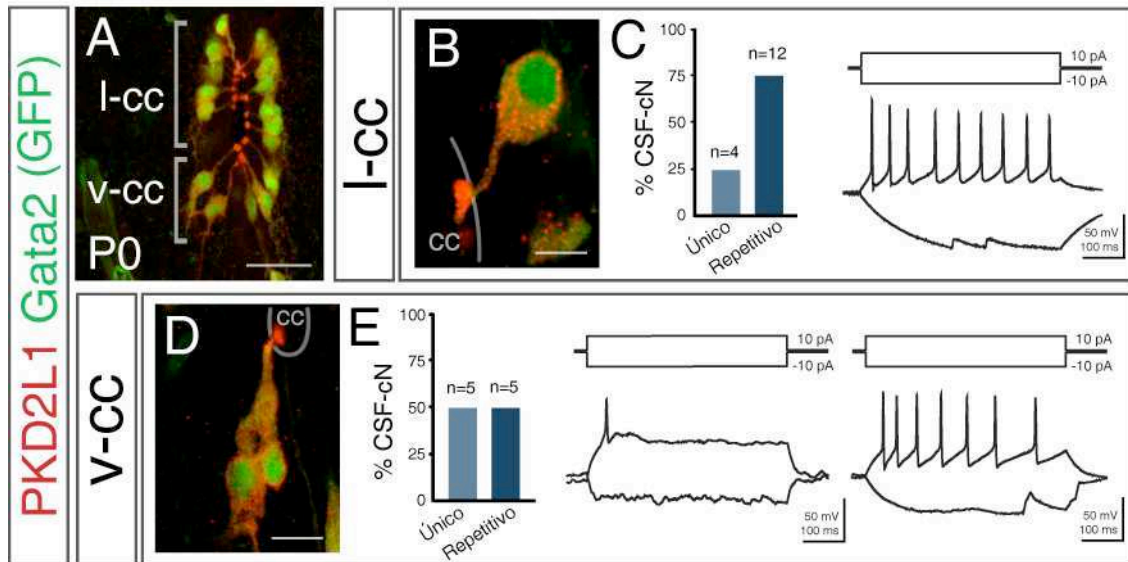
La distribución anatómica de las células PKD2L1<sup>+</sup>,Gata2<sup>+</sup> en la región del epéndima espinal postnatal permite la distinción de dos subgrupos de CSF-cNs de acuerdo a su posición en el canal central. El primer grupo se asienta lateral al canal central (denominadas l-cc o l-CSF-cNs) y representa el 71±5.7% de la población (12.8±2.8 células/sección a P0, Figura 30A,B). El segundo subgrupo (5.3±1.6 células/sección, 28±5.7% de la población P0, Figura 30A,D) se ubica en el extremo ventral al canal central (llamadas v-cc o v-CSF-cNs), próximas a la línea media de la médula. Aunque el soma de las v-cc CSF-cNs tiende a ubicarse más distante del canal central que el de las l-cc, también presentan el proceso característico en contacto con el líquido cerebroespinal (Figura 30D).

Para determinar si estos dos subgrupos de CSF-cNs presentan el mismo perfil electrofisiológico, se analizaron los registros de *patch-clamp* colectados previamente (sección anterior), separándolos en los dos grupos.

Tanto las l-CSF-cN como las v-CSF-cNs poseen propiedades activas de membrana y disparan potenciales de acción. Particularmente, presentan 1) Corrientes dependientes de voltaje no distinguibles en ambas subpoblaciones (I<sub>Na</sub> l-cc: -559±80 pA, I<sub>Na</sub> v-cc: -429±30 pA, n.s.; I<sub>K</sub> l-cc: 1788±146 pA, I<sub>K</sub> v-cc: 1473±460 pA, n.s.); 2) Alta resistencia de membrana, siendo significativamente superior la R<sub>m</sub> de las células laterales respecto de las ventrales (R<sub>m</sub> l-cc: 6.7±0.5 GΩ, R<sub>m</sub> v-cc: 3.6±0.7 GΩ, p<0.001); 3) Capacitancia similar (C<sub>m</sub> l-cc: 7.8±1 pF, C<sub>m</sub> v-cc: 10.3±1.1 pF, n.s.); 4) Potencial de reposo más despolarizado en las v-cc que el de las l-cc (V<sub>m</sub> l-cc: -50.4±1.1 mV, V<sub>m</sub> v-cc: -44.6±1.3 mV, p<0.001); y 5) *inputs* excitatorios.

En los registros realizados en la configuración *current clamp*, se observó que la mayoría de las l-CSF-cNs presentan *spikings* repetitivos (n=12/16 células analizadas, Figura 30C), mientras que sólo la mitad de las v-CSF-cNs muestran este patrón, y la otra mitad poseen un fenotipo de *spiking* único (n=5/10 células analizadas, Figura 30E).

El patrón de disparo (único o repetitivo) exhibido por cada una de las CSF-cNs analizadas se mantuvo durante la aplicación de los diferentes escalones de corriente (10 *trials* en incrementos de 10 pA; 500 ms), no detectándose fenotipos mixtos.



**Figura 30. Identificación de dos subpoblaciones de CSF-cNs, las I-cc y v-cc.**

A,B,D) Secciones transversales de la médula espinal *Gata2*<sup>GFP</sup> P0 teñidas con anticuerpos anti-PKD2L1 y anti-GFP. Se distinguen dos poblaciones de CSF-cNs por su posición respecto al canal central (cc), aquellas ubicadas lateralmente (I-cc, B) y las localizadas ventralmente (v-cc, D). C,E) Registros representativos de potenciales de membrana provocados por escalones de corrientes despolarizantes (10 pA, 0.5 seg.). Se encontraron que estas dos subpoblaciones también presentan diferencias en sus perfiles electrofisiológicos. Mientras que la mayoría de las I-cc presentan un patrón de disparo repetitivo (n=12/16, C), las v-cc exhiben tanto potenciales de acción únicos como repetitivos (n=5/10 potenciales de acción repetitivos, E). Barras de escala, 30  $\mu$ m en A, 5  $\mu$ m en B y 10  $\mu$ m en D.

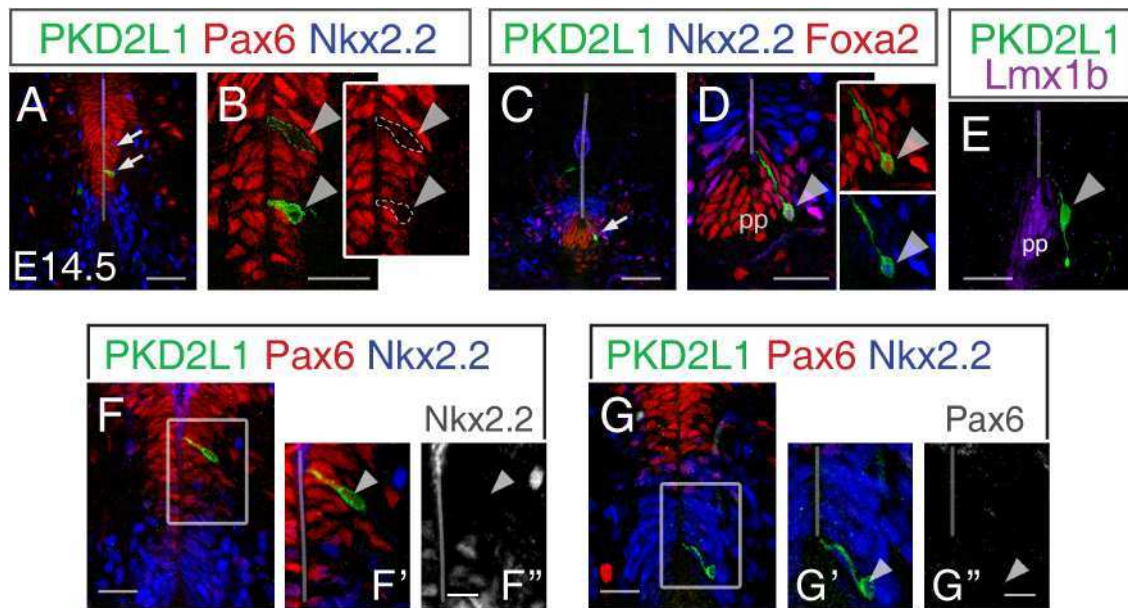
Por lo tanto, las v-CSF-cNs y las I-CSF-cNs presentan algunas diferencias en sus propiedades electrofisiológicas. Estas pueden atribuirse a la presencia de diversos estados de maduración celular o a diferencias intrínsecas de cada subgrupo.

### ***Las subpoblaciones de CSF-cNs surgen de distintos dominios progenitores.***

El análisis dorso-ventral del desarrollo de las células PKD2L1<sup>+</sup> mostró que las CSF-cNs derivan de dos fuentes distintas de la zona germinativa. Aunque la mayoría de las neuronas PKD2L1 se producen a partir de territorios Nkx6.1<sup>+</sup>,Pax6<sup>+</sup> (Figura 19A,C,G), una proporción de estas surge de precursores Pax6 negativos ubicados en los límites con la placa del piso (Figura 19B,F,G).

Se evaluaron en mayor detalle estos dos grupos y se encontró que la expresión del factor de transcripción Pax6 disminuye durante la diferenciación neurogénica de las CSF-cNs que se producen en la zona ventricular Pax6<sup>+</sup> (Figura 31<sup>a</sup>,B, ver recuadro, cabeza de flecha inferior). Sin embargo, aún se observan niveles bajos de Pax6 en aquellas células que presentan una incipiente expresión de PKD2L1 (Figura 31B, ver recuadro, cabeza de flecha superior), lo que confirma que este subgrupo de CSF-cNs se origina de precursores que expresan este factor de transcripción.

En contraposición, las neuronas PKD2L1<sup>+</sup> ventrales que se generan en regiones negativas para Pax6 (Figura 31G-G'', ver recuadro, flecha), son positivas para Nkx2.2 (Figura 31G',D, ver recuadro, flecha) y Foxa2 (Figura 31D, ver recuadro, flecha) (87 y 92% de las CSF-cNs ventrales a E14.5, respectivamente). La expresión de Nkx2.2 es característica del dominio ventral p3 (Briscoe et al., 1999; Jessell, 2000), mientras que el factor de transcripción Foxa2, marca el tercio ventral de dicho dominio, así como también las células de la placa de piso del tubo neural (Placzek, 1995) (Figura 31C,D). Por último, las CSF-cNs no expresan Lmx1b, un marcador específico de la porción no neurogénica de la placa del piso (Figura 31E). Estos resultados indican que las neuronas PKD2L1<sup>+</sup> ventrales se originan de precursores Nkx2.2 situados en la proximidad de la placa del piso. Consistentemente, la proyección apical de las CSF-cNs, que posteriormente mantendrá contacto con el canal central, viaja a lo largo de la frontera entre la placa del piso y el dominio p3 (Figura 31E).



**Figura 31. Las subpoblaciones de CSF-cNs se originan de distintos dominios de progenitores.**

A-B) Inmunohistoquímica de secciones transversales de médulas espinales E14.5 con anticuerpos contra PKD2L1, Pax6 y Nkx2.2 que muestra células PKD2L1<sup>+</sup> recién nacidas en territorios que expresan Pax6 (B, flechas). En la magnificación se observa que las CSF-cNs que expresan una menor marca de PKD2L1 (más recientemente diferenciadas), mantienen parte de la expresión de Pax6 (B, cabeza de flecha superior), mientras que aquellas con mayor marca del canal iónico (diferenciación más avanzada) son negativas para Pax6. C-E) El grupo de CSF-cNs ventrales se origina en el límite con la placa del piso (pp) (C, flecha, E14.5). La mayoría de las CSF-cNs en el área expresan los factores de transcripción Nkx2.2 y Foxa2 (D, cabeza de flecha) y están excluidas de la placa del piso no neurogénica, delimitada por Lmx1b (E). F-G) Secciones de embriones E14.5 teñidas contra Pax6 y Nkx2.2 en combinación con PKD2L1. Las CSF-cNs nacidas en territorio Pax6 no expresan Nkx2.2 (F-F''). Por otro lado, el subgrupo de CSF-cNs que se originan ventralmente (Nkx2.2 positivas) no expresan Pax6 (B-B''). Barras de escala, 40  $\mu$ m en A,C, 20  $\mu$ m en B,D,E,F y G, 10  $\mu$ m en F'',G''.

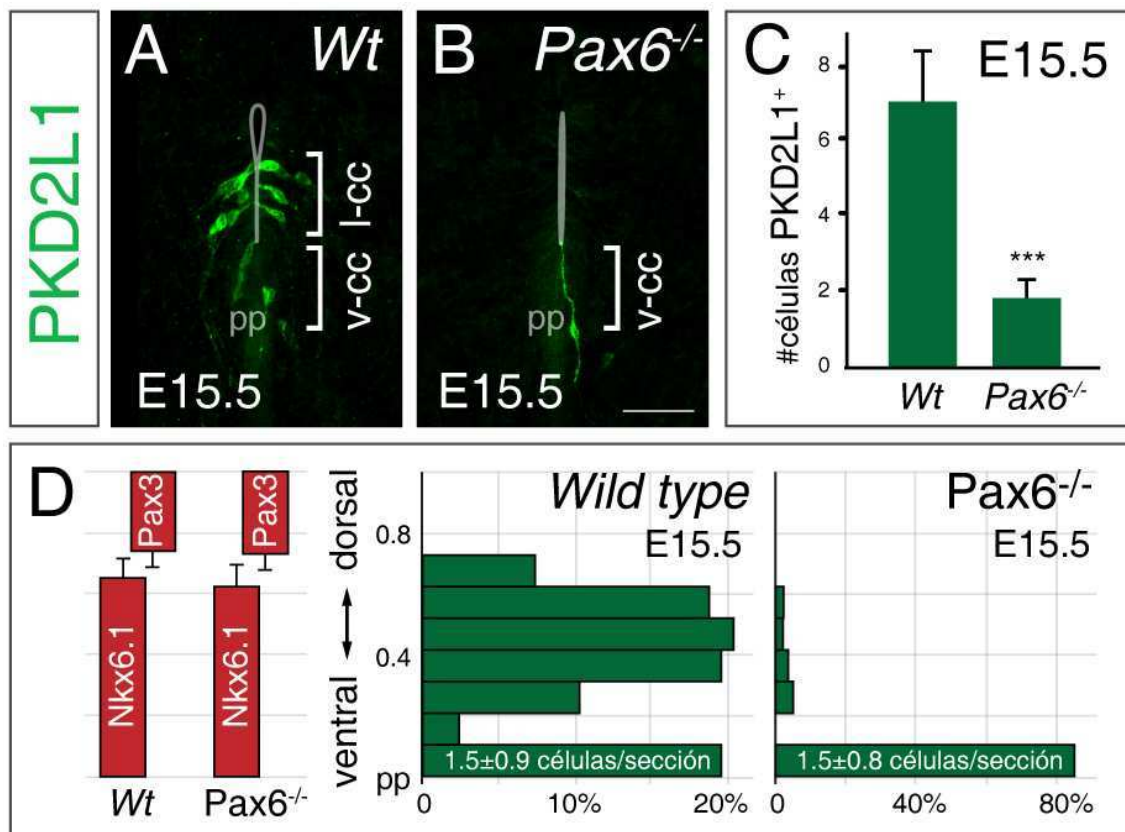
### ***Las l-CSF-cNs y v-CSF-cNs se especifican por distintos mecanismos genéticos.***

*Las l-CSF-cNs requieren de Pax6 para su desarrollo.*

Dado que los grupos de CSF-cNs se originan de progenitores que expresan Pax6 o Nkx2.2, se evaluó la relevancia de estos factores de transcripción en su ontogenia. En primer término, se analizó el desarrollo de las CSF-cNs en médulas espinales deficientes para Pax6 para responder si la ausencia de este factor de transcripción afecta la diferenciación de las CSF-cNs, o preferentemente la de alguno de los *subsets*.



Las médulas espinales *Pax6*<sup>-/-</sup> E15.5 mostraron una disminución del número de CSF-cNs (*wt*: 6.9±1.7, *Pax6*<sup>-/-</sup>: 1.6±0.8 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, p<0.001, Figura 32 A-C). Se observó que la gran mayoría de las células PKD2L1<sup>+</sup> que se conservan en los mutantes corresponden al subgrupo ubicado en el límite entre la zona ventricular p3 y la placa del piso, y que aquellas que se originan más dorsalmente (del dominio-p2 y parte del dominio pOL) están ausentes (Figura 32B).



**Figura 32. El desarrollo de las I-CSF-cNs requiere Pax6.**

A-D) Inmunohistoquímica contra PKD2L1 en médulas espinales *wild type* (A) o mutante *Pax6* (B) E15.5. Barra de escala, 40  $\mu$ m. C) Cuantificación del número total de células PKD2L1<sup>+</sup> por sección en médulas espinales *wild type* y *Pax6*<sup>-/-</sup> E15.5. Las barras son la media±DE (30-45 secciones, 3 embriones cada uno; \*\*\*p<0.001, prueba de Mann Whitney). D) Histograma de la posición de células PKD2L1<sup>+</sup> (*wt* n=237, *Pax6*<sup>-/-</sup> n=78 células analizadas) a lo largo del eje dorso-ventral a E15.5. En los mutantes *Pax6*, la mayoría de las CSF-cNs surgen de la región adyacente a la placa del piso (pp) (B). La distribución de estas células en embriones *wild type* reflejan dos fuentes distintas de células PKD2L1<sup>+</sup>: dominio Nkx6.1<sup>+</sup>, Pax6<sup>+</sup> (~80%) y el límite entre el dominio p3 y la placa del piso. El número de neuronas PKD2L1<sup>+</sup> cercanas a la placa del piso halladas son *wt*: 1.5±0.9 y *Pax6*<sup>-/-</sup>: 1.5±0.8 células por sección, n.s.

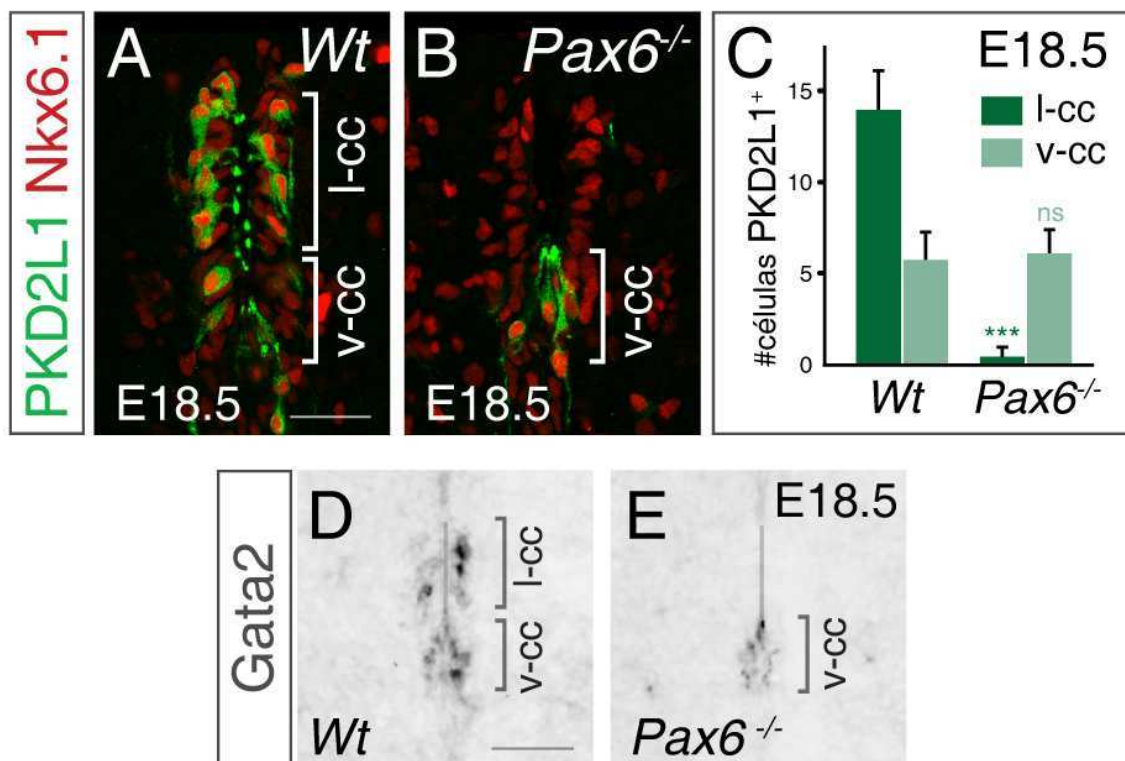


En la Figura 32D se muestra el análisis cuantitativo de la distribución de las células PKD2L1<sup>+</sup> en el eje dorso-ventral del tubo neural E15.5 *wild type* y mutante. En los ratones mutantes para Pax6, el grupo de células PKD2L1<sup>+</sup> cercanas a la placa de piso, constituye alrededor del 85% de las CSF-cNs remanentes, mientras que este subgrupo sólo representa aproximadamente el 20% de la totalidad de las PKD2L1<sup>+</sup> de los embriones *wild type*. Además, dado que el número de células PKD2L1<sup>+</sup> del subgrupo ventral no difiere significativamente entre los dos genotipos (*wt*: 1.5±0.9, *Pax6*<sup>-/-</sup>: 1.5±0.8 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, n.s.) se concluye que en el ratón deficiente en Pax6, existe una pérdida selectiva de las CSF-cNs que se originaron de progenitores tardíos p2 y pOL (indicados en la Figura 32A como l-cc, ver más adelante).

La dependencia diferencial del factor de transcripción Pax6 durante el desarrollo de los dos subgrupos de CSF-cNs que se producen en regiones distintas de la zona ventricular, confirma la existencia de diferencias ontogénicas entre ambos.

Este animal posibilita el seguimiento exclusivo de las CSF-cNs que se originan en el polo ventral y permite determinar cuál es su localización final en el canal central. Con este objetivo, se analizó la médula espinal de animales *Pax6*<sup>-/-</sup> a E18.5 (Figura 33). De forma consistente con lo observado a E15.5, se encontró una marcada reducción en el número de células PKD2L1<sup>+</sup> (*wt*: 20.6±2.7 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, *Pax6*<sup>-/-</sup>: 6.5±1.4 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, p<0.001) (Figura 33A,B). Asimismo, en estos cordones sólo se detectaron CSF-cNs ventrales al canal central (v-cc), mientras que aquellas localizadas en áreas laterales (l-cc) estaban ausentes (Figura 33A-C). Este hallazgo fue confirmado mediante la evaluación de la expresión Gata2 por hibridación *in situ* (Figura 33D,E).

En resumen, el análisis de los mutantes *Pax6* a E15.5 y E18.5 mostró una notable correlación entre el origen de las CSF-cNs en el desarrollo (dominio Nkx6.1<sup>+</sup>, Pax6<sup>+</sup> o el límite entre el dominio p3 y la placa del piso) y su ubicación en el médula espinal postnatal (l-cc y v-cc, respectivamente). Estas evidencias indican que la organización posnatal de las CSF-cNs en los *cluster* laterales (l-cc) y ventrales (v-cc) al canal central es un reflejo de las diferencias en la ontogenia de ambas poblaciones.



**Figura 33. Análisis del mutante *Pax6* a E18.5.**

A-C) Inmunohistoquímica contra PKD2L1 y Nkx6.1 en médulas espinales E18.5 *wild type* (A) y mutantes *Pax6* (B). El desarrollo de las CSF-cNs está drásticamente alterado en los embriones deficientes en *Pax6* (*wt*:  $20.6 \pm 2.7$ , *Pax6*<sup>-/-</sup>:  $6.5 \pm 1.4$  células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, 35-40 secciones, 3 embriones cada uno,  $p < 0.001$ , prueba de Mann Whitney). Barra de escala, 50  $\mu$ m. C) Cuantificación de células PKD2L1<sup>+</sup> de acuerdo a su posición a E18.5: lateral (I-cc) y ventral (v-cc) al canal central. Notar que mientras que las células I-cc PKD2L1<sup>+</sup> se vieron gravemente afectadas en los mutantes *Pax6*, el subgrupo de v-cc CSF-CNS se mantuvo inalterado. Las barras son la media  $\pm$  DE (I-cc *wt*:  $14.1 \pm 2.3$  células PKD2L1<sup>+</sup>/sección vs. mutantes *Pax6*:  $0.5 \pm 0.7$  células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, \*\*\* $p < 0.001$ , v-cc *wt*:  $6.5 \pm 1.4$  células PKD2L1<sup>+</sup>/sección vs. mutantes *Pax6*:  $6 \pm 1.5$  células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, n.s., prueba de Mann Whitney).

D-E) Hibridación *in situ* contra Gata2 en secciones de médulas espinales *wild type* y *Pax6*<sup>-/-</sup> E18.5 muestra que los mutantes *Pax6* carecen de la expresión de Gata2 lateral al canal central, pero mantienen la expresión más ventral, lo que refleja la pérdida selectiva de I-cc CSF-cNs. Barra de escala, 50  $\mu$ m.

### *Nkx2.2* es prescindible para el desarrollo de las CSF-cNs.

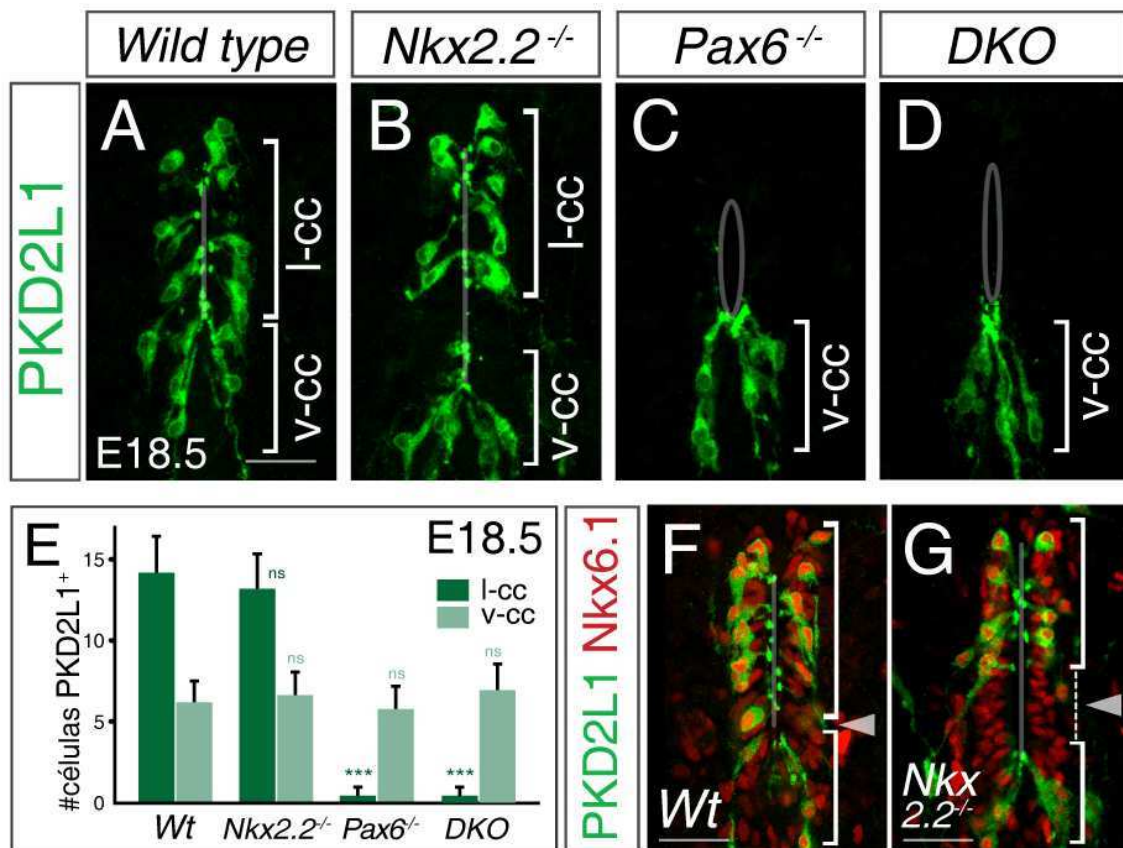
Como se describió anteriormente, Nkx2.2 se expresa en las PKD2L1<sup>+</sup> ventrales, que se generan en el límite entre el dominio p3 y la placa del piso (Figura 31D). Sin embargo, este factor de transcripción es prescindible para el desarrollo de las v-cc CSF-cNs. Los mutantes *Nkx2.2* E18.5 no mostraron diferencias significativas en el número

total de células PKD2L1<sup>+</sup> y tampoco en su distribución entre los grupos l-cc y v-cc (*wt*: 20.6±2.7, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>: 20.6±3.3 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, n.s., Figura 34A,B,E,F,G).

No obstante, es interesante destacar que debido a los cambios anatómicos que muestra el canal central en las médulas *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> a E18.5, la separación que existe entre v-cc y l-cc aumenta sustancialmente (Figura 34F,G; flecha). Esta observación proporciona evidencia adicional de que ambos grupos tienen orígenes distintos.

Trabajos previos han descrito que Pax6 cumple un rol fundamental en el establecimiento de *patterning* dorso-ventral confinando la expresión de Nkx2.2 exclusivamente a las regiones más ventrales (Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 2000; Muhr et al., 2001). En su ausencia, el territorio de expresión de Nkx2.2 se expande hacia áreas más dorsales produciéndose una ventralización del tubo neural.

Con el objeto de determinar si el fenotipo descrito en los mutantes *Pax6* se debe a la “invasión” de Nkx2.2 en el área de origen de las l-cc, se analizaron embriones dobles mutantes *Pax6*<sup>-/-</sup>;*Nkx2.2*<sup>-/-</sup> (*DKO*). Se encontró que los *DKO* presentan el mismo fenotipo que los mutantes simple de *Pax6*, no hallándose diferencias en el número de CSF-cNs (*Pax6*<sup>-/-</sup>: 6.5±1.4, *Pax6*<sup>-/-</sup>;*Nkx2.2*<sup>-/-</sup>:6.9±1.9 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, n.s.), ni tampoco cambios en su distribución (Figura 34A,C-E). La ausencia de rescate fenotípico en los mutantes doble *Pax6*<sup>-/-</sup>;*Nkx2.2*<sup>-/-</sup> respecto al simple mutante *Pax6*, pone de manifiesto que la expansión dorsal de Nkx2.2 no es la responsable de la ausencia de l-cc CSF-cNs en estos animales. Además, sugiere que el factor de transcripción Pax6 es necesario para la especificación de esta población neuronal, más allá de su papel temprano en el establecimiento del *patterning* dorso-ventral espinal.



**Figura 34.** Análisis del desarrollo de las CSF-cNs en mutantes *Nkx2.2* y doble KO *Nkx2.2/Pax6*.

A-D) Inmunohistoquímica contra PKD2L1 en médulas espinales E18.5 *wild type* (A) mutantes *Nkx2.2* (B), mutantes *Pax6* (C) y doble mutantes *Nkx2.2/Pax6*. El desarrollo de las CSF-cNs está severamente afectado en los mutantes *Pax6*, pero no se detectan cambios en el número de células en los mutantes *Nkx2.2*. Sin embargo, el doble mutante *Nkx2.2/Pax6* presenta un fenotipo similar al del simple mutante *Pax6* (*wt*: 20.6±2.7, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>: 20.6±3.3 (n.s.), *Pax6*<sup>-/-</sup>: 6.5±1.4 (p<0.001), *Nkx2.2/Pax6*: 6.9±1.9 (p<0.001) células PKD2L1<sup>+</sup>/sección, 35-40 secciones, 3 embriones cada uno, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple *post hoc* de Dunn). Barra de escala, 30 μm.

E) Cuantificación de células PKD2L1<sup>+</sup> de acuerdo a su posición a E18.5: lateral (l-cc) y ventral (v-cc) al canal central. Notar que las células l-cc PKD2L1<sup>+</sup> no se encuentran presentes en los mutantes *Pax6* (l-cc: 0.5±0.7, v-cc=6±1.5 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección) y en los doble mutante *Nkx2.2/Pax6* (l-cc: 0.1±0.3, v-cc=6.8±1.6 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección), sin embargo, no se registran cambios en ninguno de los grupos de CSF-cNs en los mutantes *Nkx2.2* (*wt*: l-cc:14.8±2.3, v-cc=6.9±1.5, mutante *Nkx2.2* l-cc: 13.3±2.2, v-cc=7.3±1.4 células PKD2L1<sup>+</sup>/sección). Las barras son la media±DE (l-cc *wt* vs. mutantes *Pax6* o doble mutantes, \*\*\*p<0.001; l-cc *wt* vs. *Nkx2.2*, n.s.; comparación del grupo v-cc entre los distintos genotipos, n.s. Prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple *post hoc* de Dunn). F-G) Inmunohistoquímica contra PKD2L1 y Nkx6.1 en médulas espinales E18.5 *wild type* (A) y mutantes *Nkx2.2* (B). La punta de flecha señala la separación entre las l-cc y v-cc, notablemente agrandada en los mutantes *Nkx2.2* (línea punteada). Barra de escala, 30 μm.

*Las v-cc CSF-cNs están presentes en embriones wild type y Pax6<sup>-/-</sup>.*

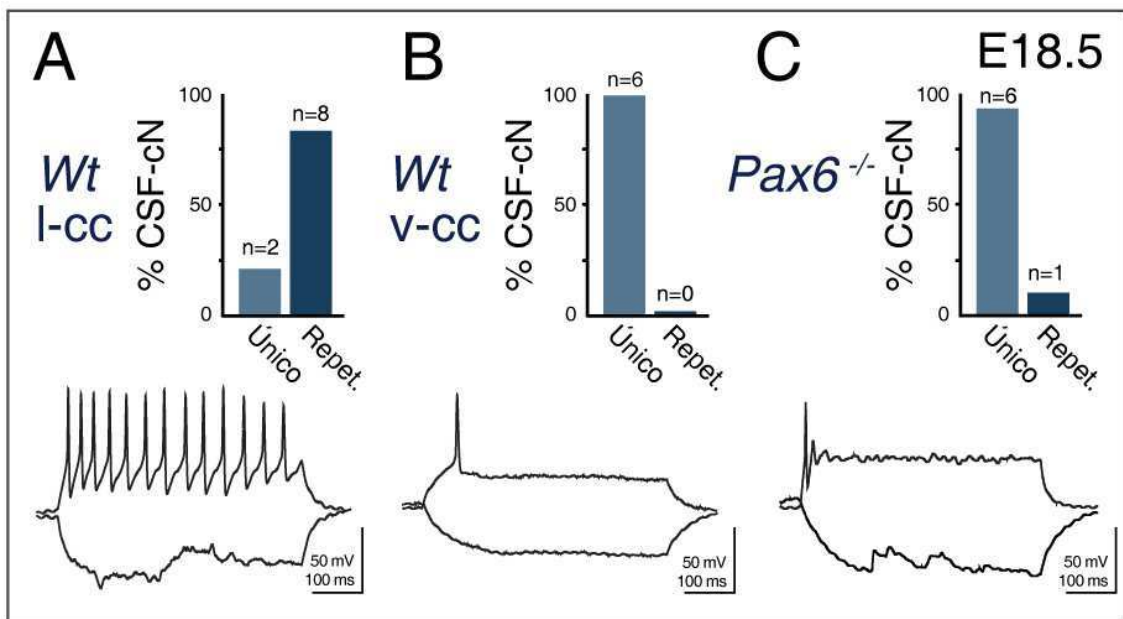
Para demostrar que el subgrupo de CSF-cNs que se distinguen en los Pax6 mutantes, son de la misma naturaleza que las v-CSF-cNs analizadas en los animales *wt*, evaluamos y comparamos las propiedades electrofisiológicas de las CSF-cNs en animales *Gata2<sup>GFP</sup>* E18.5, en el contexto *wt* y en el mutante *Pax6*, carente de l-CSF-cNs (Figura 35).

Primero se monitorearon las propiedades electrofisiológicas de las l-cc y v-cc en embriones *Gata2<sup>GFP</sup>* E18.5. Se detectó que el 80% de las células l-cc GFP<sup>+</sup>, presentan un fenotipo de *spiking* repetitivo (n=8/10 células analizadas, Figura 35A), mientras que la totalidad de las v-cc CSF-cNs analizadas gatillaron un único potencial de acción en respuesta a la despolarización (n=6/6 células analizadas, Figura 35B).

Luego se ensayó el fenotipo de disparo de las únicas CSF-cNs que se desarrollan en los embriones *Pax6<sup>-/-</sup>* E18.5 (Figura 35C). En estas médulas espinales, se observó, que la mayoría de las CSF-cNs exhiben un patrón *single-spiking* similar al del subgrupo de células v-cc de los animales *wild type* (n=6/7 células analizadas, 85% fenotipo *single-spiking*; *Pax6<sup>-/-</sup>* vs. *wt* v-cc: n.s., *Pax6<sup>-/-</sup>* vs. *wt* l-cc: p<0.05, prueba de Fisher).

Estos hallazgos demuestran que a E18.5, las l-ccs y v-ccs también exhiben propiedades electrofisiológicas diferentes, y que las CSF-cNs de los cordones espinales Pax6 nulas presentan las propiedades funcionales de v-cc CSF-cNs.

Por lo tanto, estos resultados confirman que las v-cc CSF-cNs procedentes de los precursores más ventrales cercanos a la placa de piso son aquellas que luego se localizan ventrales al canal central de la médula espinal postnatal.



**Figura 35. Análisis electrofisiológico de las CSF-cNs, identificadas por GFP, en médulas espinales *Gata2*<sup>GFP</sup> *wild type* y mutantes *Pax6* a E18.5.**

A-C) Las barras muestran la proporción de neuronas que gatillan potenciales de acción únicos o repetitivos en respuesta a la inyección de corriente (10 pA). Se encontró un patrón de disparo repetitivo en 8/10 I-cc CSF-cNs analizadas en los embriones *wild type* (A), mientras que las v-cc CSF-cNs *wild type* solo disparan un único potencial de acción (n=6/6, B). La comparación de la distribución de neuronas con un patrón de disparo único/repetitivo en los grupos de *Pax6*<sup>-/-</sup> vs. v-cc *wild type* no fue significativamente diferente, pero si se encontraron diferencias entre los *subsets Pax6*<sup>-/-</sup> vs. I-cc *wild type* (p<0.05, prueba de Fisher). Se muestran registros representativos de cada subgrupo de células GFP<sup>+</sup> provocados por la aplicación de escalones de corriente despolarizantes/hiperpolarizantes (0.5 seg., 10pA) en secciones *wild type* y *Pax6*<sup>-/-</sup>.

En resumen, las diferencias encontradas en la ontogenia, ubicación y fisiología revelan la existencia de dos grupos distintos de CSF-cNs:

a) las I-cc que se asientan laterales al canal central, nacen a partir de progenitores p2-“tardíos”/pOL y dependen de Pax6 para su adecuado desarrollo, y

b) las v-cc que se asientan ventralmente, se originan en la adyacencia de la placa del piso y su diferenciación es independiente de Pax6.

## **DISCUSIÓN**

## **Discusión.**

Distintos trabajos que han abordado el estudio del área del epéndima demuestran que en la región conviven diferentes tipos celulares que se distinguen morfológica y molecularmente (Bruni, 1998; Stoeckel et al., 2003; Meletis et al., 2008; Marichal et al., 2009; Sabourin et al., 2009). Sin embargo, aún se desconocen aquellos mecanismos que controlan su especificación y por tanto, la creación de la heterogeneidad celular encontrada. El objetivo de esta tesis fue caracterizar una población de neuronas del epéndima, las CSF-cNs de la médula espinal de mamíferos, así como también el proceso ontológico por el cual se producen, es decir cuándo y dónde se desarrollan.

### ***Caracterización morfológica y molecular de las CSF-cNs.***

Nuestra caracterización anatómica de las CSF-cNs muestra que estas células se organizan alrededor del canal central desde la base del cuarto ventrículo hasta los segmentos sacros. La morfología de las CSF-cNs es única, con un proceso dendrítico que atraviesa el epéndima y contacta con el líquido cerebroespinal (CSF). Es importante señalar que la estructura citológica de las CSF-cNs está muy conservada en las especies de cordados, desde la lamprea a mamíferos (Vigh et al., 1983; Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004). Además, considerando que el sistema nervioso del anfibio está principalmente constituido por células anatómicamente similares a las CSF-cNs, se ha postulado que este tipo celular representa a neuronas ancestrales del linaje de los vertebrados (Vigh et al., 1983; Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004; Arendt, 2008).

Las CSF-cNs son neuronas postmitóticas GABAérgicas ( $vGAT^+$ ,  $Gad1^+$ ) que se distinguen por la expresión específica de los miembros de la familia de los canales *TRP*, *PK2D2L1* y *PKD1L2*. Asimismo, encontramos que las CSF-cNs tienen características de neuronas inmaduras. Expresan los marcadores  $\beta$ III-tubulina y *DCX* así como también *Sox2* y *Nkx6.1*, proteínas usualmente propias de precursores neurales.



El análisis electrofisiológico de las CSF-cNs confirmó que poseen propiedades activas de membrana, aunque con un fenotipo inmaduro. Asimismo, nuestra caracterización preliminar muestra que las CSF-cNs tienen un proceso axonal que se extiende hacia el extremo ventral y luego proyecta hacia regiones más rostrales. En el futuro la caracterización de la conectividad de las CSF-cNs, particularmente la identificación de sus blancos post-sinápticos, será de suma importancia para obtener indicios y plantear hipótesis acerca de cuál es la función que las CSF-cNs cumplen en el sistema nervioso.

### ***Las CSF-cNs son una nueva población Gata2<sup>+</sup>,Gata3<sup>+</sup>.***

En el presente trabajo estudiamos la contribución de eventos neurogénicos tardíos a la diversificación neuronal en la médula espinal del ratón. Descubrimos que la proximidad del canal central contiene células que se originan a partir de progenitores que proliferan activamente en estadios avanzados del desarrollo.

A través de experimentos de marcación y de rastreo de linaje *in vivo* utilizando distintas líneas de ratones modificados genéticamente, se analizó la contribución de distintas poblaciones embrionarias ventrales a la región del epéndima y la lámina X espinal. Identificamos una nueva población de células que expresan los factores de transcripción Gata2 y Gata3 rodeando el canal central de la médula espinal. Estas se distinguen por su ubicación anatómica de las ya descritas interneuronas V2b (Gata2<sup>+</sup>,Gata3<sup>+</sup>) de la lámina VII (Karunaratne et al., 2002; Li et al., 2005; Lundfald et al., 2007; Zhang et al., 2014) (Figura 36A). Su morfología y la expresión de PKD2L1 permitió reconocerlas como las CSF-cNs.

Las CSF-cNs expresan los factores de transcripción Gata2 y Gata3, hasta este momento asignados en la bibliografía como un sinónimo de identidad V2b (Karunaratne et al., 2002; Lundfald et al., 2007; Peng et al., 2007). Se realizaron una serie de ensayos con el objeto de responder si las CSF-cNs constituyen un subgrupo de esta clase de interneuronas o si, por el contrario, son una población neuronal distinta que comparte la expresión de estas proteínas.

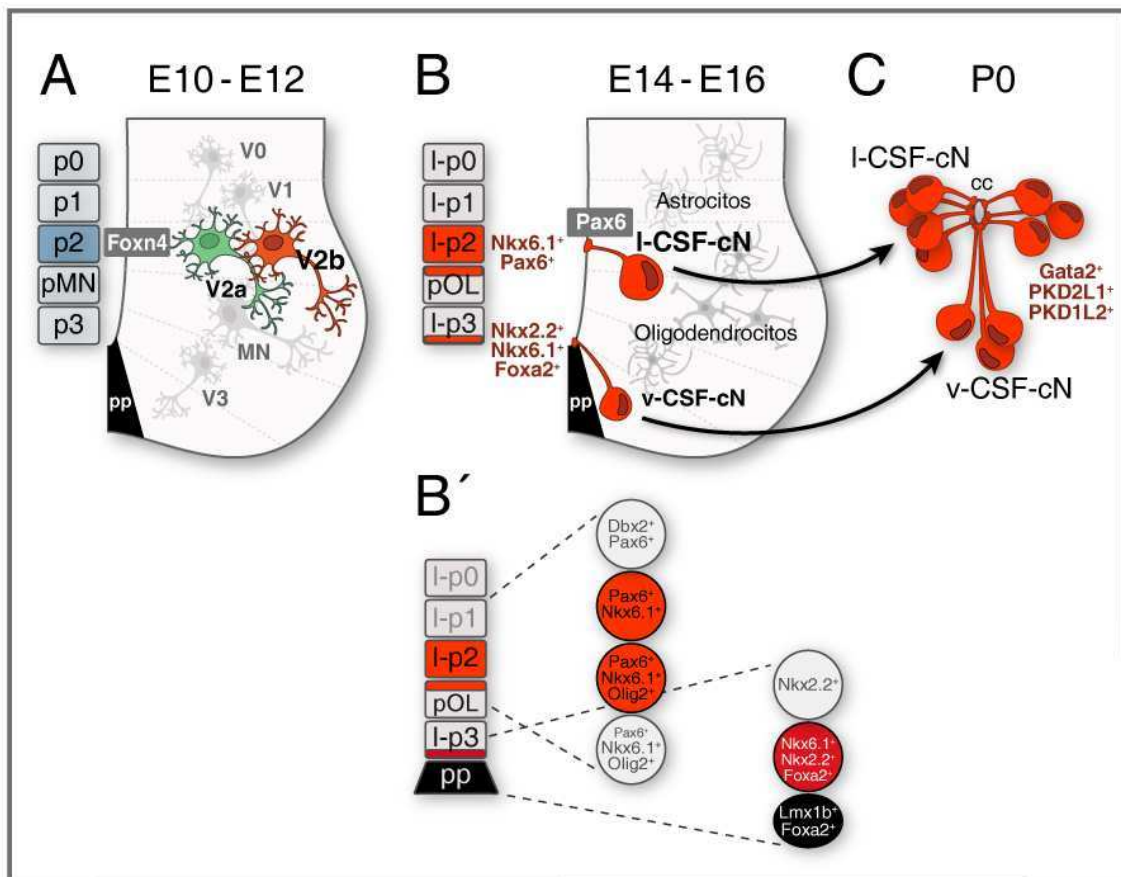
Experimentos de marcación con BrdU revelaron que las CSF-cNs se originan de progenitores que se encuentran en activa división mitótica aún en estadios avanzados del desarrollo espinal (~E13.5; Figura 36B). Este hallazgo se contrapone a lo descrito para las interneuronas V2b de la lámina VII que se originan tempranamente, durante el período neurogénico, en la región p2 del tubo neural ventral (E10-E12.5) (Ericson et al., 1997; Karunaratne et al., 2002; Li et al., 2005; Peng et al., 2007) (Figura 36A).

Además, cabe destacar que las CSF-cNs son producidas luego del inicio de la gliogénesis en la médula espinal (Stolt et al., 2003; Rowitch, 2004; Deneen et al., 2006; Richardson et al., 2006). Por consiguiente, y en contraste con el modelo establecido, la generación de las CSF-cNs en el ratón constituye un evento neurogénico tardío, en un momento del desarrollo considerado exclusivamente gliogénico y no-neurogénico (Figura 36B).

Otra evidencia de importancia para determinar que las CSF-cNs son una población distinta de las interneuronas V2b es que la especificación de neuronas *Gata2/3*<sup>+</sup> tempranas y tardías es controlada por distintos mecanismos genéticos. Estudios previos y resultados presentados en la tesis demuestran que la generación de neuronas tempranas V2 requiere la actividad del factor de transcripción *Foxn4* (Li et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Panayi et al., 2010) (Figura 36A). Sin embargo, en el análisis del ratón mutante para *Foxn4* se encontró que la producción de las CSF-cNs no se encuentra modificada. Asimismo, estos experimentos proponen que poblaciones restringidas de precursores del tubo neural ventral se diferencian secuencialmente en subtipos neuronales distintos, incluso, durante etapas del desarrollo en las cuales la neurogénesis espinal se ha casi extinguido.

Dado que nuestros experimentos revelan que las CSF-cNs no son un subgrupo de la población embrionaria V2b, nos propusimos identificar cuál es la región del neuroepitelio ventricular que les da origen. A través de un análisis posicional respecto de los territorios de expresión de los genes que definen dominios progenitores en el eje dorso-ventral (*Pax3*, *Nkx6.1*, *Pax6*, *Nkx2.2*, *Olig2*, *Dbx1*) se encontró que la mayoría de las CSF-cNs provienen del neuroepitelio ventral que expresa *Nkx6.1* y *Pax6*. Este

patrón señala que las CSF-cNs se originan principalmente de progenitores asentados en el dominio p2 tardío y parcialmente en la región más dorsal del pOL (Jessell, 2000; Jessell and Sanes, 2000). Sin embargo, un análisis exhaustivo demostró que una proporción más pequeña de las CSF-cNs se desarrolla más ventralmente, en el límite entre el dominio p3 (Nkx2.2<sup>+</sup>) y la placa del piso (Figura 36B,B').



**Figura 36- El desarrollo de las CSF-cNs en la médula espinal ventral**

A) Representación esquemática de la médula espinal E10-E12, donde se muestran los dominios de progenitores ventrales que dan origen a motoneuronas e interneuronas V0-V3 a lo largo del eje dorso-ventral. El factor de transcripción Foxn4, que se expresa en los progenitores p2, es esencial en la especificación de las interneuronas tempranas V2b *Gata2*<sup>+</sup>, *Gata3*<sup>+</sup>.

B-B') Diagrama de la médula espinal ventral E14-E16 mostrando la diferenciación de las CSF-cNs junto con astrocitos y oligodendrocitos. La mayoría de las CSF-cNs nacen de progenitores tardíos Nkx6.1<sup>+</sup>, Pax6<sup>+</sup> en los dominios p2 (I-p2) y pOL (Nkx6.1<sup>+</sup>, Pax6<sup>+</sup>, Olig2<sup>+</sup>). Una proporción menor de las CSF-cNs surgen de progenitores Nkx6.1<sup>+</sup>, Nkx2.2<sup>+</sup>, Foxxa2<sup>+</sup> en la frontera con la placa del piso (pp). El factor de transcripción Pax6 es necesario para el desarrollo de las I-CSF-cNs, pero es dispensable para la diferenciación de las v-CSF-cNs.

C) Las CSF-cNs que se ubican laterales (I-CSF-cNs) y ventrales (v-CSF-cNs) al canal central (cc) se originan de distintos grupos de progenitores (B). Las diferencias en su ontogenia, ubicación y fisiología sugieren que las células I-CSF-cNs y v-CSF-cNs son dos poblaciones distintas de CSF-cNs.

En resumen, los resultados de la tesis demuestran que las CSF-cNs constituyen una nueva población de neuronas ventrales, distinta de las interneuronas pre-motoras generadas en estadios tempranos del desarrollo. En concordancia con estas observaciones, encontramos que las CSF-cNs se desarrollan normalmente en distintas líneas de ratones mutantes que carecen de interneuronas V0, V1, V2a, V2b y V3.

La coincidencia espacio-temporal del nacimiento de las CSF-cNs con astrocitos y en menor medida oligodendrocitos espinales, nos llevó a preguntar si alteraciones en la diferenciación glial redundarían en cambios en el desarrollo de las CSF-cNs. Trabajos previos han propuesto que el factor de transcripción Sox9 es un componente clave en la adquisición de destinos gliales (Stolt et al., 2003; Guillemot, 2007; Rowitch and Kriegstein, 2010; Kang et al., 2012). Los experimentos de esta tesis revelan que los mutantes deficientes en Sox9 presentaron un incremento significativo del número de CSF-cNs. Este resultado sugiere que Sox9 participa de la consolidación de la identidad astrocítica y, de esta forma, previene la especificación de los precursores tardíos hacia un destino CSF-cN. Además, tomando en cuenta que Sox9 actúa en progenitores en la zona ventricular evitando su diferenciación neuronal e iniciando el programa de especificación glial (Stolt et al., 2003; Guillemot, 2007; Rowitch and Kriegstein, 2010; Kang et al., 2012), es posible que en los mutantes Sox9 exista también un adelantamiento temporal en la generación de CSF-cNs.

Investigaciones por fuera de este proyecto estudiarán la relación entre Sox9 y su potencial represión sobre el factor de transcripción Ascl1, que ha sido identificado en el laboratorio, como un regulador clave del desarrollo de las CSF-cNs.

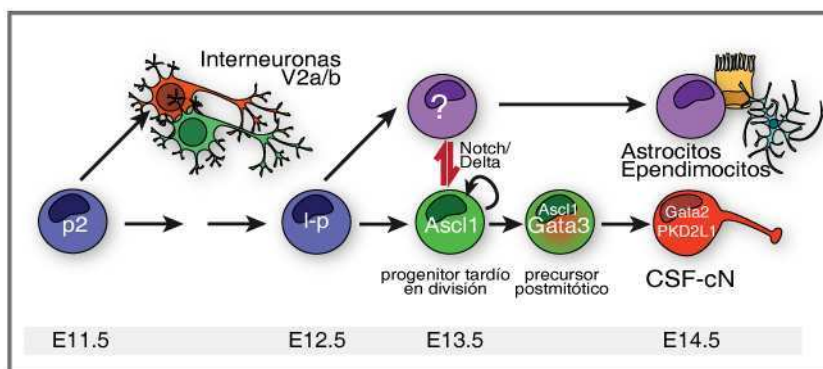
### ***La especificación de las CSF-cNs: rol de Ascl1 y Gata3.***

Estudios recientes del laboratorio (tesis de doctorado de D. Di Bella) muestran que, el factor de transcripción Ascl1, se expresa en la zona ventricular de la médula espinal con un patrón espacio-temporal coincidente con la ubicación de los progenitores que producen las CSF-cNs. Experimentos de mapeo genético de destino celular utilizando la línea de ratones *Ascl1<sup>CreER</sup>* en conjunto con reporteros

condicionales, demostró que las CSF-cNs derivan de progenitores que expresan *Ascl1* en las últimas divisiones mitóticas (~E13.5-E14) (Figura 37).

En los animales mutantes para *Ascl1* se encontró la ausencia completa de CSF-cNs tanto en estadios embrionarios E15.5 como en estadios perinatales. Estas observaciones sugieren que *Ascl1* especifica las CSF-cNs y es el responsable de conferir potencial neurogénico a los progenitores ventrales tardíos que, de otra manera, producirían células de la glía o endimocitos. En este sentido, se ha determinado mediante análisis de linaje y electrofisiología que, en ausencia de *Ascl1*, los progenitores “prospectivos” de las CSF-cNs se diferencian mayoritariamente en endimocitos (Di Bella,D; Carcagno,A; Lanuza,G, no publicado). Por lo tanto, la evidencia indica que *Ascl1* es un regulador clave para iniciar la especificación de las CSF-cNs, actuando de manera autónoma en progenitores ventrales en los cuales, simultáneamente, reprime su conversión en células endimarias y probablemente gliales (Figura 37).

Resultados de esta tesis demuestran que el factor de transcripción *Gata3*, además de expresarse en las interneuronas V2b (Li et al., 2005; Del Barrio et al., 2007; Peng et al., 2007; Zhang et al., 2014), se expresa en el linaje de las CSF-cNs (Figura 37). Experimentos posteriores del laboratorio revelaron que el inicio de expresión de *Gata3* coincide con la transición postmitótica, río abajo de *Ascl1* y que en la médula espinal de los mutantes *Gata3* la diferenciación de las CSF-cNs está severamente afectada.



**Figura 37- Resumen de los mecanismos de especificación de las CSF-cNs.**

*Ascl1* y *Gata3* se expresan en el neuroepitelio ventral tardío en los progenitores de CSF-cNs. *Ascl1* inicia la

diferenciación de las CSF-cNs ( $Gata2^+, PKD2L1^+$ ), mientras que *Gata3* controla su especificación río abajo de *Ascl1*. En ausencia de estos factores de transcripción, los progenitores prospectivos de las CSF-cNs producen endimocitos y probablemente astrocitos.

En resumen, estudios adicionales del grupo del laboratorio han encontrado que *Ascl1-Gata3-Gata2* se expresan secuencialmente a lo largo del proceso de diferenciación de las CSF-cNs. La acción de *Ascl1* en los progenitores mitóticos actúa como un selector de la especificación neuronal. Por su parte, *Gata3* y posiblemente *Gata2*, colaboran en el curso de su diferenciación. Mientras que *Gata3* actúa en los precursores postmitóticos, *Gata2* se expresa posteriormente en coincidencia con el canal iónico PKD2L1 y es posible que esté implicado en la diferenciación terminal de las CSF-cNs (Figura 37).

### ***El origen dual de las CSF-cNs.***

Nuestro análisis del desarrollo de las células PKD2L1<sup>+</sup> a lo largo del eje dorso-ventral indicó que las CSF-cNs derivan de dos fuentes distintas de la zona germinativa: los progenitores tardíos p2-pOL y la frontera del neuroepitelio con la placa del piso (Figura 36B,B'). De manera llamativa, cada uno de estos dominios progenitores generan neuronas que se posicionan en distintas áreas alrededor del canal central en la médula espinal posnatal (Figura 36C).

El primer subgrupo de neuronas PKD2L1<sup>+</sup> representa aproximadamente el 70% de la población, se asientan en la región lateral del epéndima (l-CSF-cNs) y son capaces de generar potenciales de acción repetitivos. El segundo subgrupo se localiza en el extremo ventral del canal central (v-CSF-cNs) y la mitad de ellas presentan un fenotipo de disparo único (Figura 36C).

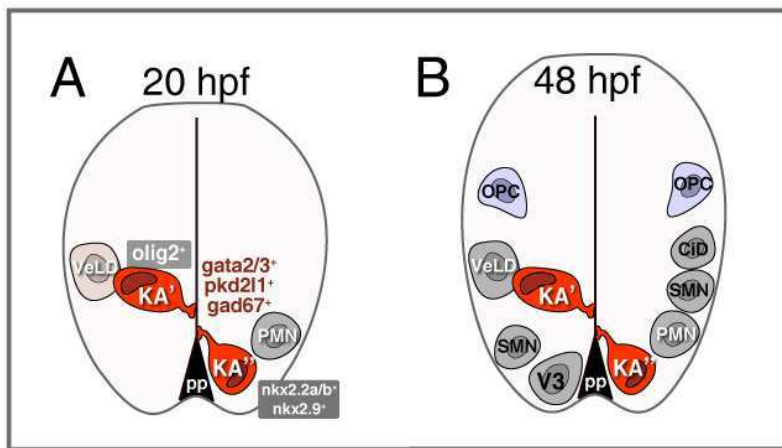
En los mutantes *Pax6* el desarrollo de las CSF-cNs que surgen de la región adyacente a la placa del piso permanece inalterado, mientras que aquellas que se originan más dorsalmente se encuentran ausentes. El análisis de estos animales en estadios más avanzados de desarrollo permitió concluir que el primer grupo corresponde a las v-CSF-cNs y el último a las l-CSF-cNs. Es decir, existe una estricta correlación entre el sitio de origen y la posición final de las CSF-cNs en la médula espinal y el desarrollo de ambos subgrupos está controlado por distintos mecanismos genéticos (Figura 36B,B',C).

Las diferencias halladas en la ontogenia, las propiedades electrofisiológicas y la ubicación de los dos subgrupos de células PKD2L1<sup>+</sup> revelan que existen al menos dos subpoblaciones de CSF-cNs, aquellas que se ubican laterales al canal central y que se originan a partir de progenitores tardíos p2/pOL (I-CSF-cNs), y las v-CSF-cNs que se originan y asientan más ventralmente (Figura 36B,B',C).

### *El doble origen de las CSF-cNs, ¿está conservado evolutivamente?*

Las CSF-cNs se encuentran presentes en numerosas especies de vertebrados: peces, reptiles, anfibios, aves y mamíferos. Estas fueron descritas hace más de un siglo por los científicos W. Kolmer (1921) y E. Agduhr (1922) por lo que en anfibios y peces recibieron el nombre de células Kolmer-Agduhr (KA) para distinguirlas de las células endodermales ciliadas (Dale et al., 1987b).

En el presente trabajo se encontró que, en el ratón, la población de CSF-cNs está constituida por al menos dos subpoblaciones que se originan a partir de distintas regiones del neuroepitelio ventral (Figura 36B,B',C). Estos hallazgos son reminiscentes de lo observado en el pez cebra, donde también se han caracterizado dos subpoblaciones de células KA (*gata2/3<sup>+</sup>,pkd2l1<sup>+</sup>,gad67<sup>+</sup>*) que surgen de distintas posiciones dorso-ventrales. Las KA', más dorsales, guardan similitud con las I-cc del ratón, y derivan de precursores *olig2<sup>+</sup>* del pMN. Por otra parte, las células KA'' se originan en el extremo más ventral, región previamente denominada en pez cebra como placa del piso lateral (pp-lat), y que por lo tanto guardan analogía con las v-cc (Park et al., 2004; Schafer et al., 2007; Shin et al., 2007; Yang et al., 2010; Huang et al., 2012) (Figura 38A).



**Figura 38- Resumen del desarrollo de distintas poblaciones neurales en el pez cebra.**

A) Representación esquemática de la médula espinal 20 hpf, donde se muestran los tipos neuronal de origen temprano. Las dos poblaciones de KA ( $gata2/3^+, pkd2l1^+, gad67^+$ )

se originan de distintos grupos de precursores. El factor de transcripción *olig2* se expresa en los progenitores p2/pOL que dan origen a las KA', motoneuronas primarias (PMN) e interneuronas VeLD, mientras que los precursores de la pp-lat ( $nkx2.2a/b^+, nkx2.9^+$ ) generan las KA''. B) Diagrama de la médula espinal a 48 hpf donde se observa que tardíamente en el desarrollo se diferencian, las motoneuronas secundarias (SMN) y las interneuronas CiD y luego, las V3 junto con los precursores de oligodendrocitos (OPC).

En el ratón, las I-CSF-cNs, se generan de precursores  $Pax6^+$  y dependen de este factor de transcripción para su desarrollo (Figura 36B,B',C). Este requerimiento podría deberse a cambios en el *patterning* temprano que modifiquen el establecimiento de los dominios progenitores. Sin embargo, dos evidencias experimentales presentadas sugieren que el fenotipo encontrado en los animales  $Pax6^{-/-}$  no son el resultado de acciones tempranas.

En primer lugar, las interneuronas V2a y V2b, que preceden al desarrollo de las CSF-cNs en el territorio ventral, se diferencian normalmente (Zhang et al., 2014). En segundo término, se ha establecido que en ausencia de la acción represora de Pax6, Nkx2.2 se expande hacia dominios más dorsales (Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 1999; Briscoe et al., 2000; Muhr et al., 2001). Bajo este escenario, la expresión ectópica de Nkx2.2 podría ser el mecanismo responsable de la ausencia de las I-CSF-cNs en los mutantes  $Pax6^{-/-}$ . No obstante, esta hipótesis puede desestimarse ya que en los animales doble *knock-out*  $Pax6;Nkx2.2$ , no encontramos un rescate fenotípico. Estos resultados sugieren que la ausencia de I-CSF-cNs en los animales  $Pax6^{-/-}$ , no sería consecuencia de la alteración del *patterning* dorso-ventral, sino que Pax6 posibilita el desarrollo de las CSF-cNs (subgrupo más dorsal, I-cc) actuando en los estadios



embrionarios que coinciden con la diferenciación de las CSF-cNs. De forma consistente con esta función, experimentos preliminares del laboratorio mostraron que en los animales *Pax6*<sup>-/-</sup> hay una disminución del número de células ventriculares que expresan *Ascl1*.

En el pez cebra, las células KA' análogas de las I-CSF-cNs, se diferencian de progenitores en regiones intermedias ventrales, es decir aproximadamente en los dominios p2-PMN. Experimentos de mapeo usando peces transgénicos *olig2:GFP* demuestran que precursores que expresan este factor de transcripción dan origen en su última división celular, a las neuronas KA' conjuntamente con motoneuronas primarias (PMN) (Park et al., 2004; Shin et al., 2007; Yang et al., 2010) (Figura 38A).

A pesar de que en el ratón las I-CSF-cNs se originan en una posición dorso-ventral similar a las KA' del pez cebra, en la médula espinal murina, encontramos que sólo una proporción minoritaria de neuronas PKD2L1<sup>+</sup> expresan *Olig2* (Figura 36B,B'). Estas diferencias podrían explicarse debido a que, en el ratón, *Olig2* se expresa transitoriamente en progenitores tempranos p2, aunque luego reprimido (Chen et al., 2011). Es decir, las CSF-cNs surgen varios días después de que *Olig2* se ha regulado negativamente en el dominio p2. Por el contrario, la producción temprana de las KA' en el pez cebra ocurre cuando la expresión de *olig2* no se ha extinguido (Figura 38A). Por lo tanto, es muy probable que estas diferencias en la marcación con *Olig2* entre ambas especies de vertebrados sea resultado del momento relativo en el desarrollo de la neurogénesis de las CSF-cNs vs. KA (ver más adelante). Queda pendiente dilucidar si *Olig2* tiene algún rol en la desarrollo de las I-CSF-cNs, aunque experimentos preliminares (no mostrados en esta tesis) demostraron que su desarrollo no se encuentra alterado en ratones mutantes *Olig2*.

En este trabajo también determinamos que en el ratón, las v-CSF-cNs surgen tardíamente en la zona del neuroepitelio aledaña a la placa del piso y expresan *Nkx2.2* y *Foxa2*, aunque son negativas para *Lmx1b* cuya marca se restringe a la placa del piso no neurogénica. Estas observaciones nos permitieron inferir que las v-CSF-cNs derivan

de los progenitores del extremo más ventral del dominio p3 que limitan con la placa del piso, en la región que denominamos p3-ventral (Figura 36B,B',C). Particularmente, es posible que, en los roedores y el pollo, el dominio p3 ( $Nkx2.2^+$ ) se divida en función de la expresión de *Foxa2* (Carcagno et al., 2014). Será interesante analizar si cada una de estas subregiones dorso-ventrales guardan relación con los distintos grupos de neuronas V3 que han sido caracterizados (Zhang et al., 2008; Borowska et al., 2013; Blacklaws et al., 2015).

De manera análoga, en el pez cebra se reveló que progenitores  $nkx2.2a/b^+, nkx2.9^+$  de la región de transición entre la placa del piso y el neuroepitelio ventricular, históricamente denominada placa del piso lateral (pp-lat) (Strahle et al., 2004; Yang et al., 2010), dan origen a las células KA'' y después, a las interneuronas V3 ( $sim1^+$ ) (Schafer et al., 2007) (Figura 38A,B).

Por otra parte, detectamos que a pesar de que las v-CSF-cNs son positivas para *Nkx2.2*, estas se desarrollan normalmente en los embriones deficientes para este factor de transcripción. En la médula ventral murina, la expresión de *Nkx2.9* se superpone transitoriamente con *Nkx2.2* en la pp y en la región más ventral del dominio p3 (hasta  $\sim E10$ ) (Briscoe et al., 1999; Holz et al., 2010). Si bien *Nkx2.2* es necesario para la especificación de las interneuronas V3 tempranas (Briscoe et al., 1999; Carcagno et al., 2014), sólo en los animales doble mutantes *Nkx2.2;Nkx2.9*, los progenitores p3 y la mayoría de las células  $Foxa2^+$  de la pp-lat son reemplazados de manera uniforme por precursores de MNs. Tomando en cuenta estas evidencias, y que además *Nkx2.2* y *Nkx2.9* presentan cierto grado de redundancia funcional (Briscoe and Ericson, 2001), inferimos que la correcta diferenciación de las v-CSF-cNs en los ratones mutantes de *Nkx2.2*, se debe al efecto compensatorio del gen *Nkx2.9*.

En consonancia con lo detectado en el ratón, las células KA'' se diferencian normalmente en los dobles mutantes *nkx2.2* (Schafer et al., 2007). Por el contrario, en el triple *KO nkx2* observamos una pérdida completa de las KA'' y las V3, con la concomitante expansión ventral del dominio precursores de MN (Yang et al., 2010).

Esto confirma que, tanto en el ratón como en el pez cebra, los factores de la familia *Nkx2* dirigen la especificación en el dominio p3 (Holz et al., 2010) y están involucrados en el desarrollo de las v-CSF-cNs y KA". El análisis de las CSF-cNs en ratones dobles mutantes *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>;*Nkx2.9*<sup>-/-</sup> permitirá elucidar el rol de estos factores de transcripción en su ontogenia.

### *¿Existen dos subtipos de CSF-cNs?*

Desde la perspectiva de la biología del desarrollo, una población celular se define frecuentemente de acuerdo a la región y el momento de su origen, los mecanismos genéticos que controlan su diferenciación y el perfil de expresión de marcadores moleculares. Dado que las CSF-cNs presentan algunas características heterogéneas, aún resta elucidar si constituyen una única población, o bien si existen diferentes grupos funcionales que se corresponden con aquellos que se desarrollan de distintos *pools* dorso-ventrales.

Como se ha descrito anteriormente, tanto las CSF-cNs que se originan de los dominios p2-pOL como del p3-ventral comparten ciertos mecanismos de control génico y de expresión de marcadores (Figura 36B,B',C). Es posible que las CSF-cNs sean, por lo tanto, una única población funcional, y el hecho de que se originen en distintas regiones podría ser un mecanismo reclutado en la evolución para garantizar su adecuada disposición en las regiones laterales y ventrales del canal central.

No obstante, las l-CSF-cNs y las v-CSF-cNs, no sólo presentan diferencias en su ontogenia, sino que también se distinguen en sus propiedades electrofisiológicas, lo que podría reflejar que son dos poblaciones distintas, funcionalmente diferentes. Estudios de conectividad posiblemente aportarán información adicional sobre las características de cada subgrupo neuronal.

Asimismo, la caracterización del origen celular, en conjunto con el análisis de expresión diferencial de marcadores moleculares, ha sido extremadamente útil para el reconocimiento de subtipos neuronales dentro de poblaciones aparentemente

homogéneas. Por ejemplo, se reportó que las células de Cajal-Retzius se producen de múltiples fuentes progenitoras en los límites del *pallium* posibilitando el reconocimiento de diferentes subtipos, que contribuyen cada uno a distintos aspectos del desarrollo cortical (Bielle et al., 2005). Por lo tanto, más allá de que aún no hemos identificado marcadores moleculares específicos para cada uno de los subgrupos de CSF-cNs, no se descarta la posibilidad de que estos sean encontrados en estudios posteriores. En el futuro, caracterizaciones moleculares y funcionales más profundas de las CSF-cNs permitirán definir cuál es el grado de heterogeneidad y eventualmente distinguir subpoblaciones con funciones específicas.

### ***Heterocronía en el desarrollo de las CSF-cNs.***

A pesar de que las CSF-cNs del ratón y las células KA del pez cebra muestran numerosas similitudes, también difieren en algunos aspectos importantes de su ontogenia y probablemente en su función.

Las CSF-cNs del ratón se producen en estadios embrionarios avanzados comenzando a E14 en un momento del desarrollo, posterior a la finalización del período neurogénico tanto en la región ventral como dorsal de la médula espinal, que es considerado casi exclusivamente gliogénico (Figura 36B). Sin embargo, en el pez cebra, las células KA se producen enteramente en una fase neurogénica espinal temprana (Figura 38A). A continuación, se analiza más detalladamente esta heterocronía, mediante la comparación del momento en que se diferencian las CSF-cNs respecto de la aparición de otros tipos celulares en el mismo tejido en cada una de las especies.

Las motoneuronas son la primera población espinal en diferenciarse en todas las especies de vertebrados estudiadas. En el pez, las MN se generan en dos oleadas neurogénicas sucesivas: las motoneuronas primarias (PMN) nacen entre 10-16 horas post fertilización (hpf) cuando culmina la formación de la placa neural (Figura 38A), y las secundarias (SMN) se originan entre 16-25 hpf (Park et al., 2004) (Figura 38B). Se ha encontrado que las KA' surgen junto con las PMN, a partir de progenitores olig2<sup>+</sup> (Shin

et al., 2007). Estas células comienzan a expresar *pkd2l1* a 16 hpf (Djenoune et al., 2014) y adquieren su fenotipo GABAérgico a ~20 hpf (Shin et al., 2007) (Figura 38A).

Otro punto de referencia es la producción de interneuronas ventrales en ambas especies. En el ratón, las interneuronas V2 y V3 se generan entre E10 y E12.5 (Briscoe et al., 1999; Park et al., 2004; Peng et al., 2007; Song et al., 2009; Zhang et al., 2014), al menos dos días antes que las neuronas *PKD2L1*<sup>+</sup> y la glía (Figura 36A). En cambio en el pez cebra, las interneuronas V2a/b (denominadas CiD y VeLD, respectivamente) se diferencian aproximadamente a las 22 hpf, a la par de las SMN y luego de la aparición de las KA' (Shin et al., 2007; Batista et al., 2008; Kimura et al., 2008) (Figura 38B). Asimismo, en el extremo más ventral, las neuronas V3 (*sim1*<sup>+</sup>) aparecen a las ~32-48 hpf, luego que las KA'' (Schafer et al., 2007; Yang et al., 2010; Huang et al., 2012) (Figura 38B). Es decir, en el pez cebra la diferenciación de las KA ocurre antes o simultáneamente a de la mayoría de las poblaciones espinales ventrales.

Como ya hemos mencionado, alrededor de E13, los progenitores del embrión de ratón demuestran mayoritariamente compromiso glial comenzando la producción de precursores de oligodendrocitos (OPC) y astrocitos (Rowitch and Kriegstein, 2010), conjuntamente con CSF-cNs (Figura 36B). En contraste, la producción de los dos grupos de células Kolmer-Agduhr (KA' y KA'') en el pez antecede claramente al comienzo de especificación de los OPC que ocurre entre las 36 y 48 hpf (Park et al., 2004; Kirby et al., 2006; Kucenas et al., 2008) (Figura 38A,B).

En resumen, mientras que las CSF-cNs del ratón se originan a partir de eventos neurogénicos tardíos conjuntamente con tipos gliales, las KA son una de las primeras poblaciones neuronales en generarse en la médula espinal del pez cebra.

### ***Sobre la función de las CSF-cNs en los vertebrados.***

Las CSF-cNs han sido descriptas en numerosas especies de vertebrados, sin embargo, su función aún no ha sido elucidada y se desconoce si estas neuronas

cumplen la misma rol en los distintos *taxa*. La gran cantidad y variedad de especies en las que se han identificado estas células hace pensar que tienen una función relevante.

La ubicación de las CSF-cNs en la médula espinal madura y su contacto con el líquido cerebroespinal en el canal central ha generado numerosas especulaciones sobre sus funciones. Sus características anatómicas sugieren que estas células podrían ser células quimiosensoras o mecanorreceptores (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998).

En el ratón, la acumulación robusta del canal iónico sensible a ácido, PKD2L1 (Huang et al., 2006) en el proceso de las CSF-cNs dentro del canal central, indica que estas células podrían participar de un sistema homeostático de monitoreo del pH del líquido cerebroespinal. Los resultados de esta tesis proponen que la asociación con PKD1L2 podría conferir funcionalidad al canal PKD2L1 (Ishimaru et al., 2006; Semmo et al., 2014 ).

En favor de esta hipótesis quimiorreceptora, se observó que las CSF-cNs de la rata se despolarizan y excitan en respuesta a descensos en el pH y que además expresan el receptor purinérgico sensible a pH, P2X2 (Stoeckel et al., 2003; Marichal et al., 2009). Se ha descrito también que los canales PKD2L1 de las CSF-cNs del romboencéfalo, aumentan su actividad frente a cambios en la osmolaridad extracelular (Orts-Del'Immagine et al., 2012).

Estudios clásicos de microscopía han mostrado que en algunas especies las CSF-cNs tienen un axón que alcanza el borde del tejido neural y contacta el CSF del espacio externo, a través de terminales del tipo neurosecretoras similares a las de áreas neurohemales (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004). Los materiales bioactivos liberados por dichas terminales entrarían en el CSF regulando su producción y/o composición y podrían difundir a los vasos sanguíneos en la zona (Vigh et al., 2004). Análisis comparativos sugieren que este tipo de contactos representan una forma no-sináptica de trasmisión de la información filogenéticamente ancestral.

La mayoría de las células que componen el sistema nervioso de especies ancestrales como el anfibio y equinodermos se asemejan a las CSF-cNs de vertebrados

(Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004). Se postula que estas neuronas perciben la composición del agua de mar (en la estrella de mar y la larva de anfibio) o del CSF (anfibio adulto) y modulan la actividad del sistema nervioso (Vigh et al., 2004). Las evidencias insinúan que las CSF-cNs tendrían un papel en la detección de señales circulantes y cambios en parámetros fisiológicos del ambiente extracelular.

Por otra parte, la anatomía de las CSF-cNs remeda a la de mecanorreceptores (como las células sensoriales del oído interno o del órgano de la línea lateral). Su proyección dendrítica presenta un número variable de estereocilios y un único cilio largo en su porción terminal en contacto con el CSF. Se ha sugerido que, en vertebrados anamniotas, estas células responden a cambios en el flujo o la presión del CSF y podrían colaborar en el control motor (Vigh and Vigh-Teichmann, 1971; Vigh et al., 1977; Vigh et al., 1983; Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh et al., 2004).

En la lamprea, las CSF-cNs producen GABA y somatostatina, y tienen axones que proyectan lateralmente hacia los márgenes de la médula espinal. Allí contactan a las neuronas espinales sensibles a estiramiento denominadas "*edge cells*" (Jalalvand et al., 2014). Tanto GABA como somatostatina son capaces de hiperpolarizar y reducir la sensibilidad de las *edge cells* (Alford et al., 1990; Christenson et al., 1991). Las *edge cells* son un componente importante de control motor de la lamprea que detectan los movimientos que ocurren durante la locomoción y proveen de un *feedback* a los generadores centrales de patrón (CPG) espinales que controlan el nado. Se infiere que la activación de las CSF-cNs afecta la sensibilidad de las *edge cells* y por lo tanto, el *feedback* sensorial-locomotor. Asimismo, se especula que la natación podría generar movimientos en el líquido cerebroespinal en el canal central y, por lo tanto, activar las CSF-cNs, que contribuirían al refinamiento de la función motora (Alford et al., 1990; Christenson et al., 1991).

En la larva del pez cebra, las KA cumplen un rol importante en la modulación de circuitos motores involucrados en la locomoción en vigilia, indispensables para tareas de forrajeo y exploración. Mediante abordajes optogenéticos, se ha demostrado que la

actividad de las KA es suficiente para activar los CPG locomotores larvales, cuando la transmisión GABAérgica es excitatoria. Asimismo, el silenciamiento de la actividad eléctrica de las KA disminuye la frecuencia de los eventos de nado espontáneo (Wyart et al., 2009).

Por su parte en los mamíferos, la locomoción no es necesaria en los estadios embrionarios de los amniotas. Además, a diferencia de la lamprea, las células PKD2L1<sup>+</sup> en el ratón parecen proyectar a centros superiores rostrales. Si se toma en cuenta los modelos actuales que describen la organización de los CPG ventrales motores de los mamíferos (Kiehn, 2006; Goulding, 2009), resulta difícil incluir a las CSF-cNs como moduladoras de la función motora, aunque no puede descartarse tal hipótesis.

Las evidencias aquí presentadas nos inclinan a favorecer la hipótesis que sugiere que las CSF-cNs de los mamíferos están involucradas en el control de la calidad del líquido cerebroespinal, es decir, cumplen una función quimiorreceptora. Las CSF-cNs podrían regular el balance ácido-base del sistema nervioso en respuesta a acidosis e hipercapnia del CSF, por ejemplo, mediante la modulación de la actividad de centros en el tallo cerebral que gobiernan respuestas compensatorias (Chandrashekar et al., 2009; Orts-Del'Immagine et al., 2012).

Resulta interesante especular que el momento del desarrollo en el cual se producen las CSF-cNs en el pez cebra y en el ratón guarda relación con las diferentes funciones que este tipo neuronal cumplen en cada una de las especies. Como hemos mencionado, en el pez las CSF-cNs (neuronas KA) se originan conjuntamente con motoneuronas y distintas clases de interneuronas premotoras. Suponemos que, dada la participación de las células KA en la regulación de los circuitos motores larvales (Wyart et al., 2009), existiría cierta presión de selección para que surgieran tempranamente en el desarrollo, asegurando la locomoción y por tanto la supervivencia de la larva.

Por otro lado, en el ratón, las células del plexo coroideo, productor primario del CSF embrionario y adulto, comienzan a diferenciarse a partir de E13 (Bueno et al.,



2014), por lo que las CSF-cNs serían requeridas para el control de la composición y calidad este fluido, a partir de estadios más avanzados el desarrollo.

Esperamos que las futuras investigaciones arrojen luz sobre el papel que cumplen las CSF-cNs en el SNC, y si este varía en los distintos *taxa*. Si tomamos en cuenta que estas células se generaron alrededor de 600 millones de años atrás (edad aproximada del anfibio) (Vigh et al., 2004) y que permanecen prácticamente invariables en los diferentes especies, resulta probable que constituyan un elemento activo en la función básica del SNC.

## ***Conclusiones.***

A pesar de que los estadios avanzados del desarrollo han sido considerados exclusivamente gliogénicos, los resultados de esta tesis demuestran que existen eventos neurogénicos tardíos en la médula espinal ventral y que estos originan a las CSF-cNs. Además, nuestras observaciones revelan que existen dos subpoblaciones distintas de CSF-cNs que se distinguen por su ubicación en el canal central postnatal, su fenotipo electrofisiológico y su ontología. En particular, los progenitores tardíos p2/pOL generan al grupo de las CSF-cNs que se ubica en el epéndima lateral, las l-CSF-cNs. Otro grupo minoritario, las v-CSF-cNs, se origina de la región de progenitores que limita con la placa del piso y se ubica ventral al canal central. Mientras que el factor de transcripción Pax6 es necesario para el desarrollo de las l-CSF-cNs, no participa en la diferenciación de v-CSF-cNs. Este trabajo pone de manifiesto la importancia del factor temporal en la generación de diversidad neuronal espinal, y apoya el modelo según el cual, a lo largo del desarrollo, los progenitores del tubo neural ventral dan origen secuencialmente a distintos tipos celulares.

## REFERENCIAS.

- Agduhr E (1922) Über ein zentrales Sinnesorgan (?) bei den Vertebraten. *Z Anat Entwicklungsgesch* 66:223- 360.
- Agduhr E (1932) Choroid plexus and ependyma. In: *Cytology and cellular pathology of the nervous system*, pp 537-573: Hoeber New York.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813-2828.
- Alford S, Sigvardt KA, Williams TL (1990) GABAergic control of rhythmic activity in the presence of strychnine in the lamprey spinal cord. *Brain Res* 506:303-306.
- Altman J, Bayer SA (1984) The development of the rat spinal cord. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 85:1-164.
- Alvarez FJ, Jonas PC, Sapir T, Hartley R, Berrocal MC, Geiman EJ, Todd AJ, Goulding M (2005) Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *J Comp Neurol* 493:177-192.
- Amaral DG (2000) The anatomical organization of the central nervous system. In: *Principles of neural science* (Kandel ER, Schwartz, J.H. y Jessell, T.M., ed), pp 317-336: McGraw-Hill Companies Inc. New York.
- Arendt D (2008) The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nature Reviews Genetics* 9:868-882.
- Balaskas N, Ribeiro A, Panovska J, Dessaud E, Sasai N, Page KM, Briscoe J, Ribes V (2012) Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* 148:273-284.
- Barber RP, Vaughn JE, Roberts E (1982) The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res* 238:305-328.
- Barth KA, Kishimoto Y, Rohr KB, Seydler C, Schulte-Merker S, Wilson SW (1999) Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126:4977-4987.
- Batista MF, Jacobstein J, Lewis KE (2008) Zebrafish V2 cells develop into excitatory CiD and Notch signalling dependent inhibitory VeLD interneurons. *Dev Biol* 322:263-275.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2015) Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020362.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8:1002-1012.
- Blacklaws J, Deska-Gauthier D, Jones CT, Petracca YL, Liu M, Zhang H, Fawcett JP, Glover JC, Lanuza GM, Zhang Y (2015) Sim1 is required for the migration and axonal projections of V3 interneurons in the developing mouse spinal cord. *Dev Neurobiol*.

- Bodega G, Suarez I, Rubio M, Fernandez B (1994) Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. *Histochemistry* 102:113-122.
- Borowska J, Jones CT, Zhang H, Blacklaws J, Goulding M, Zhang Y (2013) Functional subpopulations of V3 interneurons in the mature mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 33:18553-18565.
- Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11:43-49.
- Briscoe J, Novitsch BG (2008) Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:57-70.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, 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, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J (1999) Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398:622-627.
- Brockschneider D, Lappe-Siefke C, Goebbels S, Boesl MR, Nave KA, Riethmacher D (2004) Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Mol Cell Biol* 24:7636-7642.
- Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41:2-13.
- Bueno D, Parvas M, Hermelo I, Garcia-Fernandez J (2014) Embryonic blood-cerebrospinal fluid barrier formation and function. *Front Neurosci* 8:343.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by *Sox1-3* activity. *Nat Neurosci* 6:1162-1168.
- Carcagno AL, Di Bella DJ, Goulding M, Guillemot F, Lanuza GM (2014) Neurogenin3 restricts serotonergic neuron differentiation to the hindbrain. *The Journal of Neuroscience* 34:15223-15233.
- Caspary T, Anderson KV (2003) Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* 4:289-297.
- Crone SA, Quinlan KA, Zagoraoui L, Droho S, Restrepo CE, Lundfald L, Endo T, Setlak J, Jessell TM, Kiehn O, Sharma K (2008) Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron* 60:70-83.
- Chandrashekar J, Yarmolinsky D, von Buchholtz L, Oka Y, Sly W, Ryba NJ, Zuker CS (2009) The taste of carbonation. *Science* 326:443-445.
- Chen JA, Huang YP, Mazzoni EO, Tan GC, Zavadil J, Wichterle H (2011) Mir-17-3p controls spinal neural progenitor patterning by regulating *Olig2/Irx3* cross-repressive loop. *Neuron* 69:721-735.
- Cheng L, Arata A, Mizuguchi R, Qian Y, Karunaratne A, Gray PA, Arata S, Shirasawa S, Bouchard M, Luo P, Chen CL, Busslinger M, Goulding M, Onimaru H, Ma Q (2004) *Tlx3* and *Tlx1* are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat Neurosci* 7:510-517.

- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Christenson J, Alford S, Grillner S, Hokfelt T (1991) Co-localized GABA and somatostatin use different ionic mechanisms to hyperpolarize target neurons in the lamprey spinal cord. *Neurosci Lett* 134:93-97.
- Dale N, Roberts A, Ottersen OP, 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, 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.
- Dasen JS, Liu JP, Jessell TM (2003) Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* 425:926-933.
- Dasen JS, De Camilli A, Wang B, Tucker PW, Jessell TM (2008) Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. *Cell* 134:304-316.
- Del Barrio MG, Taveira-Marques R, Muroyama Y, Yuk DI, Li S, Wines-Samuelson M, Shen J, Smith HK, Xiang M, Rowitch D, Richardson WD (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, Anderson DJ (2006) The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* 52:953-968.
- Dessaud E, Yang LL, Hill K, Cox B, Ulloa F, Ribeiro A, Mynett A, Novitch BG, Briscoe J (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450:717-720.
- Dessaud E, Ribes V, Balaskas N, Yang LL, Pierani A, Kicheva A, Novitch BG, Briscoe J, 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, 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, Kiehn O (2013) Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons. *Neuron* 80:920-933.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, 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, Briscoe J (1997) Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-180.
- Finzsch M, Stolt CC, Lommes P, Wegner M (2008) Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development* 135:637-646.
- Fortini ME (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* 16:633-647.
- Francius C, Harris A, Rucchin V, Hendricks TJ, Stam FJ, Barber M, Kurek D, Grosveld FG, Pierani A, Goulding M, Clotman F (2013) Identification of multiple subsets of ventral interneurons and differential distribution along the rostrocaudal axis of the developing spinal cord. *PLoS ONE* 8:e70325.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Hu X, Liu Z, Jensen J, 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, Bianchi B, Coskun V, Nguyen L, Wu X, Zhao J, Heng JI, Martinowich K, Tao J, Wu H, Castro D, Sobeih MM, Corfas G, Gleeson JG, Greenberg ME, Guillemot F, Sun YE (2006) Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1319-1324.
- Genethliou N, Panayiotou E, Panayi H, Orford M, Mean R, Lapathitis G, Gill H, Raouf S, De Gasperi R, Elder G, Kessar N, Richardson WD, Malas S (2009) SOX1 links the function of neural patterning and Notch signalling in the ventral spinal cord during the neuron-glia fate switch. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1114-1120.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.
- Glover J (1995) Retrograde and anterograde axonal tracing with fluorescent dextran-amines in the embryonic nervous system. *Neurosci Prot* 30:1-13.
- Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O, 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. *Nat Rev Neurosci* 10:507-518.
- 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.
- Gross MK, Moran-Rivard L, Velasquez T, Nakatsu MN, Jagla K, 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, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476.

- Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522-525.
- Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ (2008) Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 133:510-522.
- Holz A, Kollmus H, Ryge J, Niederkofler V, Dias J, Ericson J, Stoeckli ET, Kiehn O, Arnold HH (2010) The transcription factors Nkx2.2 and Nkx2.9 play a novel role in floor plate development and commissural axon guidance. *Development* 137:4249-4260.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934-938.
- Huang P, Xiong F, Megason SG, Schier AF (2012) Attenuation of Notch and Hedgehog signaling is required for fate specification in the spinal cord. *PLoS Genet* 8:e1002762.
- Hugnot JP, Franzen R (2011) The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. *Front Biosci* 16:1044-1059.
- Ille F, Atanasoski S, Falk S, Ittner LM, Marki D, Buchmann-Moller S, Wurdak H, Suter U, Taketo MM, Sommer L (2007) Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol* 304:394-408.
- Inada H, Kawabata F, Ishimaru Y, Fushiki T, Matsunami H, Tominaga M (2008) Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3–PKD2L1. *EMBO Rep* 9:690-697.
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12569-12574.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallen P, Hill RH, Grillner S (2014) Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *J Comp Neurol* 522:Spc1.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Jessell TM, Sanes JR (2000) Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* 10:599-611.
- Joshi K, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2009) LMO4 controls the balance between excitatory and inhibitory spinal V2 interneurons. *Neuron* 61:839-851.
- Kang P, Lee HK, Glasgow SM, Finley M, Donti T, Gaber ZB, Graham BH, Foster AE, Novitsch BG, Gronostajski RM, Deneen B (2012) Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron* 74:79-94.
- Karunaratne A, Hargrave M, Poh A, Yamada T (2002) GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Dev Biol* 249:30-43.
- 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, Tominaga M (2010) Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J Biol Chem* 285:17277-17281.

- Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306.
- Kiehn O, Butt SJ (2003) Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog Neurobiol* 70:347-361.
- Kimura Y, Satou C, 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, Appel B (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 9:1506-1511.
- Kolmer W (1921) Das "Sagittalorgan" der Wirbeltiere. *Z Anat Entwicklungsgesch* 60:652-717.
- Kucenas S, Snell H, Appel B (2008) *nkx2. 2a* promotes specification and differentiation of a myelinating subset of oligodendrocyte lineage cells in zebrafish. *Neuron glia biology* 4:71-81.
- Lanuza GM, Gosgnach S, Pierani A, Jessell TM, Goulding M (2004) Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* 42:375-386.
- Laplagne DA, Zylberman V, Ainciart N, Steward MW, Sciotto E, Fossati CA, Goldbaum FA (2004) Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins* 57:820-828.
- Lee KJ, Jessell TM (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22:261-294.
- Lek M, Dias JM, Marklund U, Uhde CW, Kurdija S, Lei Q, Sussel L, Rubenstein JL, Matise MP, Arnold H-H, Jessell TM, Ericson J (2010) A homeodomain feedback circuit underlies step-function interpretation of a Shh morphogen gradient during ventral neural patterning. *Development* 137:4051-4060.
- Lewis KE (2006) How do genes regulate simple behaviours? Understanding how different neurons in the vertebrate spinal cord are genetically specified. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:45-66.
- Li S, Misra K, Xiang M (2010) A Cre transgenic line for studying V2 neuronal lineages and functions in the spinal cord. *Genesis* 48:667-672.
- Li S, Misra K, Matise MP, Xiang M (2005) *Foxn4* acts synergistically with *Mash1* to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10688-10693.
- Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM, Xiang M (2004) *Foxn4* controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* 43:795-807.
- Litingtung Y, Chiang C (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between *Shh* and *Gli3*. *Nat Neurosci* 3:979-985.
- Liu IS, Chen JD, Ploder L, Vidgen D, van der Kooy D, Kalnins VI, McInnes RR (1994) Developmental expression of a novel murine homeobox gene (*Chx10*): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* 13:377-393.



- Liu JP, Laufer E, Jessell TM (2001) Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* 32:997-1012.
- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, 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.
- Lundfald L, Restrepo CE, Butt SJ, Peng CY, Droho S, Endo T, Zeilhofer HU, Sharma K, 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. *J Neurobiol* 66:726-738.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133-140.
- Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH (2001) Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97:324-326.
- Marichal N, Garcia G, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O, 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, 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.
- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12:1438-1452.
- Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisen J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182.
- Miller MW, Nowakowski RS (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457:44-52.
- Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH (2012) Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26:891-907.
- Molofsky AV, Glasgow SM, Chaboub LS, Tsai HH, Murnen AT, Kelley KW, Fancy SP, Yuen TJ, Madireddy L, Baranzini S, Deneen B, Rowitch DH, Oldham MC (2013) Expression profiling of Aldh1l1-precursors in the developing spinal cord reveals glial lineage-specific genes and direct Sox9-Nfe2l1 interactions. *Glia* 61:1518-1532.
- Muhr J, Andersson E, Persson M, Jessell TM, Ericson J (2001) Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104:861-873.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.
- Muroyama Y, Fujiwara Y, Orkin SH, Rowitch DH (2005) Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature* 438:360-363.

- National Research Council (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nguyen VH, Trout J, Connors SA, Andermann P, Weinberg E, Mullins MC (2000) Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway. *Development* 127:1209-1220.
- Orts-Del'Immagine A, Wanaverbecq N, Tardivel C, Tillement V, Dallaporta M, 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.
- Panayi H, Panayiotou E, Orford M, Genethliou N, Mean R, Lapathitis G, Li S, Xiang M, Kessaris N, Richardson WD, Malas S (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.
- Park HC, Shin J, Appel B (2004) Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Development* 131:5959-5969.
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ, Guillemot F (2002) Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16:324-338.
- Peng CY, Yajima H, Burns CE, Zon LI, Sisodia SS, Pfaff SL, Sharma K (2007) Notch and MAML signaling drives Scl-dependent interneuron diversity in the spinal cord. *Neuron* 53:813-827.
- Pierani A, Moran-Rivard L, Sunshine MJ, Littman DR, Goulding M, Jessell TM (2001) Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* 29:367-384.
- Placzek M (1995) The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr Opin Genet Dev* 5:499-506.
- Richardson WD, Kessaris N, Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 7:11-18.
- Roberts RC (1967) Small eyes-A new dominant eye mutant in the mouse. *Genet Res* 9:121-122.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, 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. *Nat Rev Neurosci* 5:409-419.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214-222.
- Sabourin JC, Ackema KB, Ohayon D, Guichet PO, Perrin FE, Garces A, Ripoll C, Charite J, Simonneau L, Kettenmann H, Zine A, Privat A, Valmier J, Pattyn A, Hugnot JP (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, 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, Goulding M (2004) Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of renshaw cell development. *J Neurosci* 24:1255-1264.
- Sciutto E, Toledo A, Cruz C, Rosas G, Meneses G, Laplagne D, Ainciart N, Cervantes J, Fragoso G, Goldbaum FA (2005) Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* 23:2784-2790.
- Scott CE, Wynn SL, Sesay A, Cruz C, Cheung M, Gomez Gaviro MV, Booth S, Gao B, Cheah KS, Lovell-Badge R, Briscoe J (2010) SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat Neurosci* 13:1181-1189.
- Schafer M, Kinzel D, Winkler C (2007) Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish. *Dev Biol* 301:117-129.
- Semmo M, Kottgen M, Hofherr A (2014) The TRPP subfamily and polycystin-1 proteins. *Handb Exp Pharmacol* 222:675-711.
- Shimizu T, Janssens A, Voets T, Nilius B (2009) Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 457:795-807.
- Shin J, Poling J, Park HC, Appel B (2007) Notch signaling regulates neural precursor allocation and binary neuronal fate decisions in zebrafish. *Development* 134:1911-1920.
- Shirasaki R, Pfaff SL (2002) Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25:251-281.
- Song MR, Sun Y, Bryson A, Gill GN, Evans SM, Pfaff SL (2009) Islet-to-LMO stoichiometries control the function of transcription complexes that specify motor neuron and V2a interneuron identity. *Development* 136:2923-2932.
- Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70-71.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-18.
- Stam FJ, Hendricks TJ, Zhang J, Geiman EJ, Francius C, Labosky PA, Clotman F, Goulding M (2012) Renshaw cell interneuron specialization is controlled by a temporally restricted transcription factor program. *Development* 139:179-190.
- Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein MJ, Mutterer J, Freund-Mercier MJ, 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, Wegner M (2003) The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* 17:1677-1689.
- Strahle U, Lam CS, Ertzer R, Rastegar S (2004) Vertebrate floor-plate specification: variations on common themes. *Trends Genet* 20:155-162.
- Strausberg RL et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16899-16903.

- Sugimori M, Nagao M, Bertrand N, Parras CM, Guillemot F, 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.
- Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, German MS (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125:2213-2221.
- Suzuki N, Ohneda O, Minegishi N, Nishikawa M, Ohta T, Takahashi S, Engel JD, Yamamoto M (2006) Combinatorial Gata2 and Sca1 expression defines hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2202-2207.
- Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M, 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. *Mech Dev* 99:143-148.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
- Tanabe Y, Jessell TM (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274:1115-1123.
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ (2011) A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71:995-1013.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.
- Thaler J, Harrison K, Sharma K, Lettieri K, Kehrl J, 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, Hotamisligil GS (2000) Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 290:134-138.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I (1971) Structure of the medullo-spinal liquor contacting neuronal system. *Acta Biol Acad Sci Hung* 22:227-243.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I (1973) Comparative ultrastructure of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Int Rev Cytol* 35:189-251.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I (1998) Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microsc Res Tech* 41:57-83.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B (1974) Intraependymal cerebrospinal fluid contacting neurons and axon terminals on the external surface in the filum terminale of the carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res* 148:359-370.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I, 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, 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.
- Vigh B, Manzano e Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirok SJ, Szabo A, Lukats A, 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.
- Wolpert L (1968) The French Flag problem: a contribution to the discussion on pattern development and regulation. *Towards a theoretical biology* 1:125-133.
- Wolpert L (1989) Positional information revisited. *Development* 107:3-12.
- Wyart C, Del Bene F, Warp E, Scott EK, Trauner D, Baier H, Isacoff EY (2009) Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 461:407-410.
- Yang L, Rastegar S, Strähle U (2010) Regulatory interactions specifying Kolmer-Agduhr interneurons. *Development* 137:2713-2722.
- Yang X, Tomita T, Wines-Samuelson M, Beglopoulos V, Tansey MG, Kopan R, Shen J (2005) Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Dev Neurosci* 28:102-117.
- Yeo S-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* 104:5913-5918.
- Zhang J, Lanuza GM, Britz O, Wang Z, Siembab VC, Zhang Y, Velasquez T, Alvarez FJ, Frank E, 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, Fan CM, Goulding M (2008) V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron* 60:84-96.
- Zhou Y, Yamamoto M, Engel JD (2000) GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development* 127:3829-3838.
- Zong H, Espinosa JS, Su HH, Muzumdar MD, Luo L (2005) Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* 121:479-492.