



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Genética del origen y especificación de las neuronas tardías del canal central

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

Lic. Carla Agustina Campetella

Director de tesis: Dr. Guillermo M. Lanuza

Consejero de estudios: Dr. Pablo Wappner

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 28 de Marzo de 2025.

RESUMEN

El sistema nervioso central está compuesto por una amplia variedad de tipos celulares, cuya correcta formación en espacio y tiempo es esencial para el ensamblado de circuitos funcionales. Estudios previos han identificado que ciertos progenitores de la médula espinal conservan la capacidad de generar neuronas después de la transición de la neurogénesis a la gliogénesis. Esta diferenciación neuronal tardía produce exclusivamente las Neuronas en Contacto con el Líquido Cefalorraquídeo (CSF-cN), un tipo neuronal discreto de la región endimaria, caracterizado por la expresión selectiva del canal iónico Pkd2l1. Los mecanismos que regulan la génesis de estas neuronas no han sido dilucidados completamente. Aquí describimos que este tipo neuronal está compuesto por cuatro subclases que designamos como Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral según su ubicación, morfología y perfil de expresión molecular. Mediante rastreo de linaje, identificamos su origen en progenitores embrionarios tardíos que expresan *Ascl1* en los dominios ventrales p2-pO1 y p3 del tubo neural. *Ascl1* juega un rol crucial en la producción de los grupos Lateral, Ventral y Distal-Lateral, pero es prescindible para la especificación del Distal-Ventral. Empleando estrategias de genética de ratón, realizamos una disección de los factores de transcripción *Gata3* y *Gata2* en el curso del desarrollo postmitótico de estas neuronas. Encontramos que las proteínas *Gata* siguen secuencias diferentes de activación en cada dominio y que regulan transiciones entre fases de la diferenciación. Mediante la generación de ratones con combinaciones de alelos nulos y/o condicionales, descubrimos que si bien los cuatro grupos de CSF-cN tienen requisitos distintivos de *Gata3/2*, las proteínas *Gata* cumplen algunas funciones redundantes. En este trabajo identificamos que la diferenciación neuronal tardía en la médula espinal produce cuatro subtipos de neuronas en contacto con el líquido cefalorraquídeo y describimos aspectos centrales de los programas transcripcionales del desarrollo de tal diversidad.

Palabras Clave: canal central, CSF-cN, desarrollo neuronal, diferenciación celular, médula espinal

ABSTRACT

Genetics Behind the Origin and Specification of Late-Born Central Canal Neurons

The central nervous system is comprised of a wide variety of cell types, whose proper formation in both space and time is essential for the assembly of functional circuits. Previous studies have identified that certain progenitors in the spinal cord retain the ability to generate neurons once the transition from neurogenesis to gliogenesis has taken place. This late neuronal differentiation exclusively produces CerebroSpinal Fluid-contacting Neurons (CSF-cN), a distinct neuron class of the ependymal region, characterized by the selective expression of the ionic channel Pkd2l1. The mechanisms behind the genesis of these neurons have not been fully elucidated. Here we describe that this neuron type is composed of four subclasses, which we named Lateral, Ventral, Distal-Ventral and Distal-Lateral based on their location, morphology, and molecular expression profile. Through lineage tracing, we tracked their origin to late *Ascl1*-expressing embryonic progenitors of the p2-pO1 and p3 ventral domains of the neural tube. *Ascl1* plays a crucial role in the production of the Lateral, Ventral, and Distal-Lateral groups but is dispensable for the specification of the Distal-Ventral group. Using mouse genetics, we dissected the role of transcription factors *Gata3* and *Gata2* during the postmitotic development of these neurons. We found that *Gata* proteins follow different activation sequences in each domain and regulate transitions between differentiation stages. Through generating mice with combinations of null and/or conditional alleles, we discovered that while the four CSF-cN groups have distinct *Gata3/2* requirements, *Gata* proteins are partially redundant. Thus, here we identified that late neuronal differentiation in the spinal cord produces four subtypes of CerebroSpinal Fluid-contacting Neurons and describe key aspects of the regulatory programs responsible for generating such diversity.

Keywords: cellular differentiation, central canal, CSF-cNs, neural development, spinal cord

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL	2
EVENTOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	2
Formación del tubo neural	2
Establecimiento del patrón dorso-ventral	3
DIFERENCIACIÓN NEURONAL	6
Proteínas proneurales.....	6
Absción Neuronal	6
Dominios progenitores ventrales	7
EL SWITCH GLIOGÉNICO Y LA PRODUCCIÓN GLIAL	7
LAS NEURONAS EN CONTACTO CON EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO	9
Las CSF-cN en vertebrados	9
Funciones quimo y mecanosensorial de las CSF-cN	10
Origen embrionario	12
LOS FACTORES DE TRASCRIPTIÓN GATA2 Y GATA3	13
Gata2 y Gata3 en el desarrollo del sistema nervioso central	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RATONES	18
GENOTIPADO DE ANIMALES	22
Extracción de ADN genómico	22
Reacción de PCR	22
Fenotipado	22
TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS	24
Inducción de la actividad recombinasa.....	24
Rescate farmacológico de los mutantes nulos Gata3	24
PREPARACIÓN DE TEJIDO ESPINAL	25
INMUNOFLUORESCENCIA	26
HIBRIDACIÓN IN SITU	28
MICROSCOPÍA	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30

RESULTADOS	31
DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS DEL CANAL CENTRAL.....	32
Las CSF-cN derivan de dos regiones progenitoras ventrales tardías	32
Marcación genética de progenitores <i>Ascl1</i> ⁺ tardíos	34
Los reporteros <i>Gata2</i> ^{GFP} y <i>Gata3</i> ^{LacZ} reflejan la expresión <i>Gata3/2</i> endógena	34
<i>Gata3</i> y <i>Gata2</i> se expresan en la diferenciación de las CSF-cN	36
La secuencia <i>Gata3/2</i> distingue la diferenciación entre dominios	39
La expresión de <i>Pkd2l1</i> define la fase final de la diferenciación.....	41
Los progenitores p2-pOL y p3 siguen distintos programas de diferenciación	43
CLUSTERS DE NEURONAS DEL CANAL CENTRAL	48
Las neuronas <i>Pkd2l1</i> ⁺ se dividen en cuatro subgrupos.....	48
Los cuatro subgrupos comparten un perfil molecular.....	51
Las poblaciones <i>Pkd2l1</i> distales derivan de progenitores neurales <i>Ascl1</i> ⁺	54
<i>Foxa2</i> es un marcador específico del subgrupo Ventral	56
El grupo Distal-Ventral es heterogéneo en la expresión de <i>Foxa2</i>	57
La dependencia de <i>Pax6</i> revela el origen dual de las células Distal-Ventral	58
La diferenciación de las neuronas Distal-Ventral es independiente de <i>Ascl1</i>	62
Las células Distal-Ventral delaminan y migran hacia el surco ventral	65
GATA3/2 REGULAN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS PKD2L1⁺	69
La especificación de células Lateral y Distal-Lateral depende de <i>Gata3</i>	69
<i>Gata3</i> actúa dentro de una ventana temporal crítica	74
La diferenciación de los cuatro grupos de neuronas <i>Pkd2l1</i> depende de <i>Gata3/2</i>	77
DISCUSIÓN	82
LAS NEURONAS DEL CANAL CENTRAL SE SUBDIVIDEN EN CUATRO GRUPOS ...	83
DOS FUENTES PROGENITORAS PARA CUATRO SUBTIPOS NEURONALES	85
PROGRAMAS DE LA ESPECIFICACIÓN NEURONAL PKD2L1	87
Secuencias de activación génica en la diferenciación neuronal	87
Modelo de la especificación de los subgrupos de neuronas <i>Pkd2l1</i> ⁺	89
DETERMINANTES APICALES, DIFERENCIACIÓN NEURONAL Y DELAMINACIÓN .	91
Las células Lateral y Ventral no sufren la abscisión apical	91
Delaminación de los grupos distales	92
CONCLUSIONES	93
ANEXO I	94
BIBLIOGRAFÍA	102

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL

La formación del sistema nervioso de vertebrados comienza con la gastrulación y la subsecuente formación del tubo neural. Conforme avanza el desarrollo, la médula espinal se va formando con el agregado de progenitores neurales al extremo posterior del tubo neural, que se diferencian a partir de células de origen mesodérmico de la región caudal del embrión. El resultado es un tubo epitelial pseudoestratificado con simetría bilateral, en cuya región apical se encuentran las células progenitoras neurales que originarán las células que conforman el sistema nervioso del individuo (Frith et al., 2024).

EVENTOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Formación del tubo neural

A diferencia del resto del sistema nervioso central, la médula espinal se forma siguiendo dos tipos de neurulación. La región anterior del tubo neural, que origina el cerebro y la parte anterior de la médula espinal, sigue la clásica ‘neurulación primaria’. En este proceso, las señales inductoras de los tejidos vecinos, principalmente FGF, Sonic hedgehog (Shh) y antagonistas de BMP4, inducen la formación de la placa neural en la región medial del ectodermo dorsal. La placa neural luego forma un pliegue que converge para finalmente fusionarse y formar el tubo neural primario (Figura 1A)(Tanabe and Jessell, 1996).

Desde el somito 31 de ratón hacia el extremo caudal, en cambio, tiene lugar la ‘neurulación secundaria’, donde el tubo neural es formado por progenitores neuromesodérmicos (NMP) (Figura 1 C) (Cambray and Wilson, 2007; Catala, 2021; Tzouanacou et al., 2009). Estas células se agregan al tubo neural primario durante la elongación, convergen y condensan en un cordón medular que se epitelializa y cavita (Figura 1 B) (Frith et al., 2024; Le Douarin et al., 1998). En simultáneo a estos movimientos morfogénicos, la expresión de Sox2 inicia la transición de NMP a

progenitor neural (NPC) mediante la modulación de proteínas efectoras de la vía de Wnt (Kinney et al., 2020).

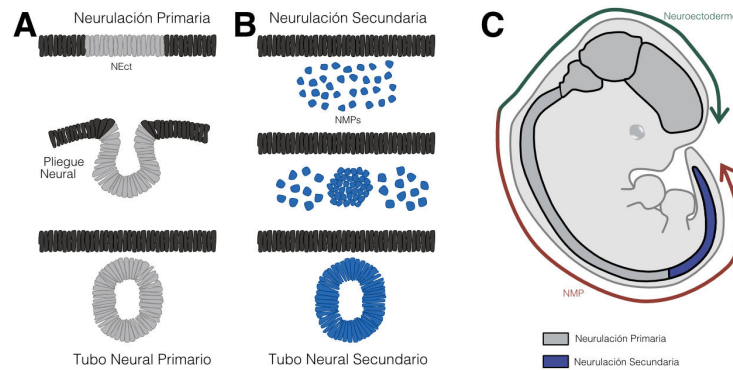


Figura 1. Neurulación primaria y secundaria

Representación esquemática que compara los procesos de neurulación primaria y secundaria.

A. La transición morfológica del neuroectodermo en la neurulación primaria establece el tubo neural primario por pliegue, convergencia y fusión del neuroepitelio. En el ratón ocurre en los estadios E8-E10.

B. Organización de las células al comienzo y fin de la neurulación secundaria. Los progenitores neuromesodérmicos (NMP) se originan del epiblasto caudal, y se diferencian a células preneurales que se agregan al tubo neural primario durante la elongación. Estas células condensan y luego sufren cavitación para formar el tubo neural caudal. En ratón, este proceso ocurre desde el somito 31.

C. Modelo del desarrollo del sistema nervioso central donde se marca la contribución de los linajes neuroectodérmico y neuromesodérmico en el ratón. Adaptado de Shaker, M (2021).

Luego del cierre del tubo neural, los movimientos y rearrreglos celulares dentro del epitelio continúan hasta el estadio embrionario E9.5, antes de dar lugar a los patrones rostro-caudal, mediolateral y dorsoventral de la médula espinal madura (Bocanegra-Moreno et al., 2023; Frith et al., 2024).

Establecimiento del patrón dorso-ventral

Una vez formado el tubo neural, se establecen gradientes de morfógenos a lo largo de los ejes ortogonales rostro-caudal y dorso-ventral, los cuales regulan las redes de expresión génica de los NPC. Estos determinarán qué identidades celulares serán producidas por cada tipo de progenitor (Frith et al., 2024; Guillemot, 2007; Jessell, 2000).

En el eje dorso-ventral, los extremos opuestos del tubo neural secretan señales inductivas que impactan gradualmente en los progenitores de la zona ventricular de

acuerdo a su arreglo espacial (Frith et al., 2024). Desde el polo ventral, la notocorda y placa de piso (fp) emiten Sonic Hedgehog (Shh) (Figura 2 A) (Krauss et al., 1993; Yamada et al., 1993) mientras que en la región opuesta, el ectodermo dorsal y placa de techo secretan ligandos BMP y Wnt (Muroyama et al., 2002). El efecto individual de cada morfógeno depende de su concentración, por lo que la combinación de estos gradientes opuestos asigna la identidad posicional a las células a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural. No obstante, en etapas más avanzadas, estos morfógenos por sí solos no son suficientes para mantener el patrón dorso-ventral. Por lo tanto, los límites entre los dominios de progenitores son sostenidos por interacciones entre factores de transcripción específicos de cada identidad progenitora inducida (Tanabe and Jessell, 1996). De esta forma se induce la expresión de determinados genes de *patterning* que operan como determinantes intrínsecos de la especificación del destino y diversidad de subtipos celulares (Figura 2 B), (Kicheva and Briscoe, 2023; Tanabe and Jessell, 1996).

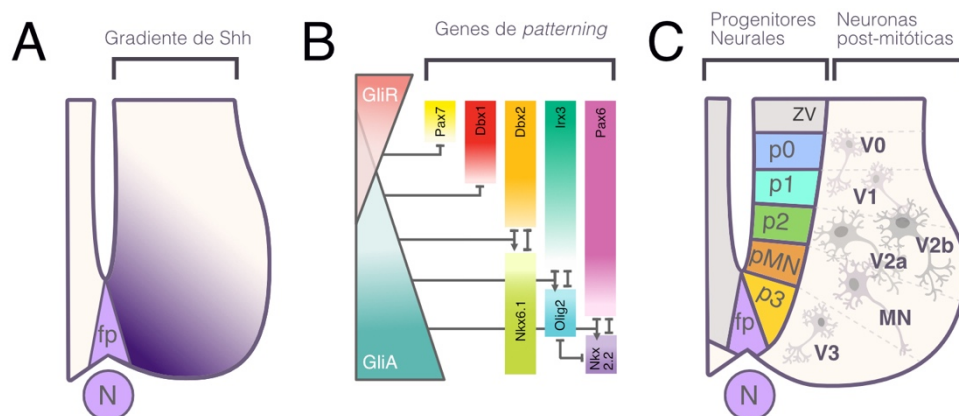


Figura 2. Gradientes de morfógenos especifican los dominios de progenitores neurales

A. Gradientes opuestos de morfógenos definen el *patterning* dorso-ventral y establecen los dominios de progenitores ventriculares. En la especificación del tubo neural ventral, Sonic hedgehog (Shh) es el morfógeno de mayor importancia. **B.** La actividad de Shh se traduce en dos gradientes opuestos de Gli activador (GliA) y Gli represor (GliR), que activan y reprimen la expresión de genes de *patterning*. Estos genes se expresarán según el balance de la actividad GliA/GliR, la actividad de genes panneuronales de la familia SoxB1 y la represión cruzada de los genes de *patterning*. **C.** El código combinatorio de factores de transcripción determina el establecimiento de los distintos dominios de progenitores en el eje dorso-ventral (p0-p3, pMN). Cada identidad progenitora produce una población de interneuronas postmitóticas (V0-V3) y motoneuronas (MN) que presenta un perfil de expresión molecular característico. Figura adaptada de Jessell (2000)

La combinación y concentración de los morfógenos en los polos dorsal y ventral imparte información posicional a los progenitores de la zona ventricular. Esta información organiza los progenitores neurales en once dominios, cada uno con un perfil de expresión característico y la capacidad de generar subtipos neuronales funcionalmente distintos (Figura 2 C), (Alaynick et al., 2011; Sagner and Briscoe, 2019).

La interpretación de gradientes de morfógenos en identidades progenitoras está particularmente bien descrita para la señalización por Shh en el tubo neural ventral (Figura 2) (Frith et al., 2024). En esta región, los progenitores decodifican los niveles y duración de Shh, y la respuesta intracelular está mediada por la conversión de la proteína Gli en sus variantes activadoras (GliA) o represoras (GliR) (Hui and Angers, 2011). El balance de GliA/R en respuesta al nivel de actividad de Shh lleva a la expresión de factores de transcripción ventrales y a la represión de factores dorsales (Figura 2B). Mediante la unión de Gli a elementos regulatorios de genes ventrales, el gradiente de Shh se traduce en un código de expresión génica que caracteriza a los progenitores en distintas posiciones del eje dorso-ventral (Oosterveen et al., 2012; Vokes et al., 2007).

Sumado a esto, las identidades de los dominios progenitores son establecidas por mecanismos de de-represión que involucran los factores de transcripción Olig2, Nkx2.2, Irx3 y Pax6. Estos factores se activan río abajo de Shh, y se regulan mutuamente mediante represión cruzada (Figura 2 B). Se unen a motivos regulatorios de genes de destinos alternativos para reprimirlos y favorecer así una identidad progenitora no híbrida (Kutejova et al., 2016; Nishi et al., 2015).

El conjunto de estos mecanismos conduce a la activación de programas de especificación celular definidos y establece límites discretos entre dominios progenitores. De esta forma, las dinámicas de la red transcripcional transforman la señalización graduada en identidades progenitoras discretas y definidas espacialmente (Frith et al., 2024).

DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Proteínas proneurales

Las proteínas proneurales son factores de transcripción con motivo bHLH (*basic helix-loop-helix*), cuya acción es necesaria y suficiente para inducir la diferenciación neuronal en progenitores neurales de la zona ventricular (Bertrand et al., 2002; Guillemot, 2007; Imayoshi and Kageyama, 2014). La diferenciación neuronal depende principalmente de las proteínas Neurog1-3, Ascl1 y Atoh (Alaynick et al., 2011; Sagner and Briscoe, 2019). Estos factores proneurales integran la información posicional durante la neurogénesis, lo que les permite expresarse en dominios específicos, y disparan las transiciones clave de progenitor a neurona (Guillemot, 2007; Sagner and Briscoe, 2019).

La expresión transitoria de las proteínas proneurales induce la neurogénesis mediante la inhibición del ciclo celular y de la multipotencialidad. Actúan además como factores pioneros que remodelan la cromatina, permitiendo la activación de las cascadas transcripcionales de los programas de diferenciación neuronal (Aydin et al., 2019). Además de la regulación directa de la neurogénesis, los factores proneurales inhiben la diferenciación de progenitores vecinos a través de la inhibición lateral mediada por la vía de Delta-Notch (Bertrand et al., 2002; Frith et al., 2024).

Abscisión Neuronal

La "abscisión neuronal" se refiere al proceso mediante el cual una neurona en diferenciación pierde el contacto apical que la ancla a la zona ventricular (Itoh et al., 2013; Kawaguchi, 2020). Este proceso involucra la reducción de N-cadherinas y de proteínas del complejo de polaridad apical, y es inducido por proteínas proneurales. Inicialmente, se forma un botón en la membrana apical, seguido de una constricción apical, el afinamiento de la membrana y, finalmente, la abscisión. Luego de esto el proceso apical se retrae, y la porción de membrana eliminada, que concentra los componentes apicales, queda abandonada en el ventrículo (Das and Storey, 2014; Itoh et al., 2013). Este evento separa las neuronas nacientes de la superficie ventricular y resulta en la pérdida tanto del complejo apical como de la polaridad apical. La abscisión apical es un evento crítico en el programa de diferenciación neuronal, ya que

desencadena la reorganización de la neurona y su retracción del ambiente ventricular (Das and Storey, 2014).

Dominios progenitores ventrales

La expresión de los genes de *patterning* define los distintos dominios progenitores en el eje dorso-ventral de la zona ventricular. El tubo neural atraviesa primero una fase neurogénica (E9.5-E12.5 en el ratón), en que los progenitores neurales proliferan y producen las distintas poblaciones neuronales. En el tubo neural ventral, los dominios ventriculares p0, p1, p2 y p3 generan interneuronas V0, V1, V2 y V3 respectivamente, mientras que el dominio pMN produce motoneuronas (Figura 3), (Briscoe and Ericson, 2001). Cada uno de estos grupos de neuronas se distingue por su perfil de expresión molecular, fenotipo de neurotransmisión y proyección axonal, y cumple funciones definidas en los circuitos locomotores espinales (Cote et al., 2018).

Existen mecanismos adicionales que expanden la diversidad neuronal de un dominio progenitor. Por ejemplo, en la región p2 la interacción Dll4-Notch produce dos subclases: las neuronas excitatorias glutamatérgicas V2a y las V2b inhibitorias. Además, la temporalidad de la neurogénesis amplía el repertorio neuronal en el dominio p2, donde se producen tardíamente las neuronas del canal central (ver más adelante), (Petracca et al., 2016).

EL SWITCH GLIOGÉNICO Y LA PRODUCCIÓN GLIAL

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la especificación de neuronas y células gliales está separada temporalmente en dos etapas secuenciales. En la fase neurogénica temprana (E9-12.5 en ratón), los progenitores neurales caudales generan los diversos tipos neuronales de la médula espinal. Luego sufren una transición en su potencial y, desde aproximadamente E13, comienzan a producir células gliales (Rowitch and Kriegstein, 2010) (Figura 3).

Este *switch* entre neurogénesis y gliogénesis se debe a una restricción intrínseca de célula del potencial de los progenitores neurales (Mukoyama et al., 2006). Hacia el final de la fase neurogénica, la expresión de las proteínas proneurales Neurog1/2 y Ascl1 disminuye, reduciendo la producción de neuronas (Frith et al., 2024). Al mismo tiempo, se activa la expresión de genes progliales, como Sox9 y Nfia/b, que favorecen la diferenciación glial (Deneen et al., 2006; Kang et al., 2012; Stolt et al., 2003) y contribuyen a la finalización de la neurogénesis.

Durante la fase gliogénica, la producción de células gliales sigue también un patrón dorso-ventral. Los oligodendrocitos se originan en el dominio pOL (pMN, que previamente produjo motoneuronas), mientras que los astrocitos son generados sin especificidad de dominio (Rowitch and Kriegstein, 2010) (Figura 3 C). No obstante, se ha demostrado que el código transcripcional heredado de la etapa neurogénica controla la formación de distintos subtipos astrocíticos en distintos dominios dorso-ventrales (Hochstim et al., 2008; Sartoretti et al., 2022; Tsai et al., 2012). Por último, las células remanentes de las regiones p2 y pOL se diferencian en los endotelios que recubren el canal central (Yu et al., 2013).

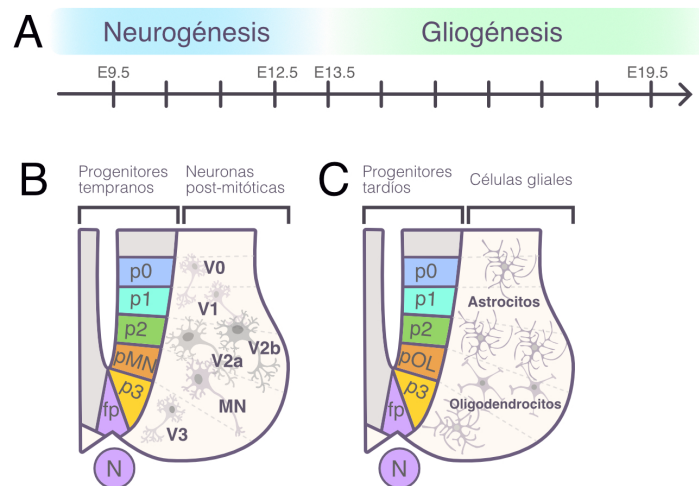


Figura 3. Temporalidad del desarrollo neural en la médula espinal de ratón

A. En el desarrollo del tubo neural de ratón, la fase neurogénica ocurre dentro de los estadios E9.5-E12.5. A partir de E12.5 hasta estadios perinatales tiene lugar la fase gliogénica. **B.** En la fase neurogénica los dominios de progenitores ventriculares ventrales originan interneuronas V0-V3 y motoneuronas (MN). **C.** Durante la fase gliogénica, los mismos dominios producen distintos tipos de células gliales. Los dominios p1, p2 y p3 generan distintos tipos de astrocitos ventrales, mientras que el dominio pOL produce oligodendrocitos. Figura adaptada de Rowitch et al (2010).

LAS NEURONAS EN CONTACTO CON EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Se ha considerado que en el desarrollo de la médula espinal la neurogénesis está restringida a estadios embrionarios tempranos. Pese a esto, trabajos previos demostraron la existencia de un único evento neurogénico espinal concurrente con la generación de oligodendrocitos, astrocitos y células endoteliales (Kutna et al., 2014; Petracca et al., 2016). Mediante experimentos de pulso y caza junto a marcadores específicos se demostró que las Neuronas en contacto con el Líquido Cefalorraquídeo (CSF-cN) son producidas tardíamente durante la etapa gliogénica. Estas neuronas se ubican rodeando el canal central en la interfaz entre el líquido cefalorraquídeo (CSF) y el tejido espinal, y están altamente conservadas en vertebrados.

Las CSF-cN en vertebrados

En estudios pionero hace más de un siglo, Kolmer y Agduhr encontraron un tipo de célula ciliada en contacto con el líquido cefalorraquídeo en la médula espinal de cien especies de vertebrados (Agduhr, 1922; Kolmer, 1921). Estas neuronas, hoy conocidas como CSF-cN, fueron encontradas en todas las especies de cordados estudiadas, lo que muestra un alto grado de conservación evolutiva. Esto incluye anfibios y lamprea (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998; Vigh-Teichmann et al., 1980), así como peces óseos y cartilagosos (anguila *Anguilla anguilla*, pez cebra *Danio rerio*, raya *Raja clavata*, (Vigh et al., 1977; Vigh et al., 1983) y múltiples especies de anfibios, reptiles, aves y mamíferos, incluyendo ratón y primates no humanos (*Mus musculus* (Vigh et al., 1983), *Rhesus macaco* (Djenoune et al., 2014), *Gallus gallus* (Petracca et al., 2016)). No hay aún evidencias concretas que demuestren la presencia de neuronas del canal central en humanos. Trabajos recientes de secuenciación de ARN de núcleo único y transcriptómica espacial de médula espinal humana solo registraron unas pocas células con niveles significativos de Pkd2l1, canal iónico que se ha encontrado en las CSF-cN de todos los vertebrados estudiados (Yadav et al., 2023; Zhang et al., 2024).

Las CSF-cN se ubican en la capa endotelial o subendotelial rodeando el canal central espinal, que forma parte del sistema ventricular y es por donde fluye el CSF en la región caudal del sistema nervioso central. Estas neuronas extienden su proceso apical

hacia dentro del canal central, donde presentan un ensanchamiento que será la porción de la célula en contacto directo con el CSF (Vigh et al., 1974; Vigh et al., 1983; Wyart et al., 2023) (Figura 4). Tanto en ratón como pez cebra, este tipo neuronal se ha subdividido en dos poblaciones según su ubicación relativa al canal central. Aproximadamente el 80% de la población corresponde a las células dorsolaterales, llamadas CSF-cN', y el remanente que se ubica ventral al canal central se conoce como CSF-cN'' (Wyart et al., 2023) (Figura 4 C).

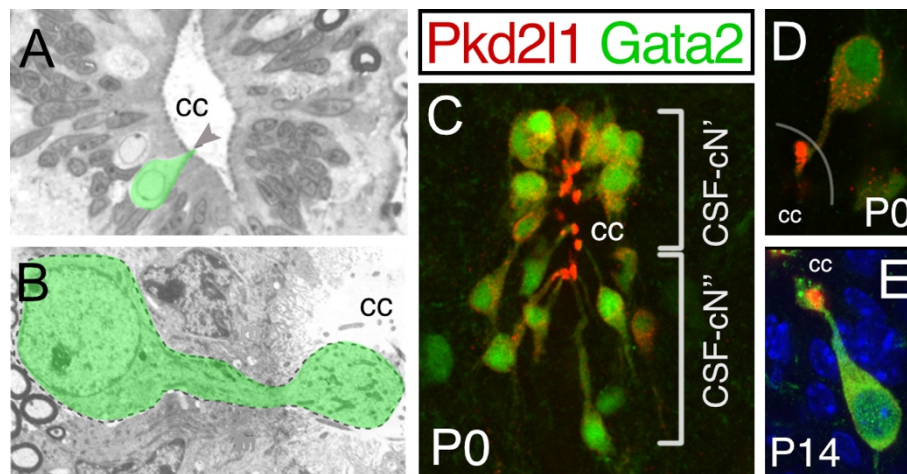


Figura 4. Las Neuronas en contacto con el líquido cefalorraquídeo (CSF-cN)

A-B. Las CSF-cN espinales están conservadas a lo largo de la evolución de los vertebrados. En las micrografías electrónicas se observa neuronas en contacto con el canal central (cc) coloreadas en verde de carpa (*Cyprinus carpio*) (A) y ratón (*Mus musculus*) (B). Adaptado de Vigh-Teichmann et al (1974; 1983).

C-E. Las CSF-cN de ratón expresan el canal catiónico Pkd2l1 y el factor de transcripción Gata2. Secciones transversales de médula espinal de ratón *Gata2^{GFP}* marcadas con anticuerpos contra Pkd2l1 y GFP en estadio perinatal (P0) o postnatal 14 (P14). Las CSF-cN se subdividen en dos grupos, uno dorsolateral que se ubican hacia los laterales del canal central (CSF-cN'), y otro que se posiciona ventralmente (CSF-cN''). Observar la ubicación de las CSF-cN en la capa endimaria y la extensión del proceso apical hacia el canal central, que presenta un ensanchamiento en contacto con el CSF. Adaptado de Petracca, et al (2016).

Funciones quimo y mecanosensorial de las CSF-cN

Como se mencionó anteriormente, las CSF-cN se ubican dentro de la capa endimaria que rodea el canal central espinal (Djenoune et al., 2014), y extienden su proyección apical hacia el ventrículo donde se baña en el líquido cefalorraquídeo (CSF) (Vigh et al., 2004). Las CSF-cN son GABAérgicas y proyectan su axón en sentido rostral a lo largo del funículo ventral de la médula espinal (Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023; Stoeckel et al., 2003; Wu et al., 2021). Este tipo neuronal se caracteriza por la expresión

selectiva del canal catiónico Pkd2l1 (Polycystic kidney disease 2-like 1 protein) (Huang et al., 2016) que las distingue del resto de las neuronas espinales. El canal Pkd2l1 es un miembro de la familia TRP y forma parte de los receptores gustativos de la lengua sensibles al pH (Huang et al., 2016; Orts-Del'immagine et al., 2012). Se ha reportado que las CSF-cN, tanto en preparaciones de ratón como de lamprea y pez cebra, responden a la variación de pH del CSF a través de canales Pkd2l1 y ASIC (Jalalvand et al., 2016; Orts Del'immagine et al., 2016; Orts-Del'immagine et al., 2012). Además, se ha reportado que las neuronas Pkd2l1⁺ también responden a cambios en la osmolaridad (Orts-Del'immagine et al.; Orts-Del'immagine et al.), a ATP (Johnson et al., 2023; Stoeckel et al., 2003) y a metabolitos bacterianos o virales (Prendergast et al., 2023). Este repertorio amplio de compuestos indica que poseen propiedades quimosensoras y que estarían involucradas en el mantenimiento de la homeostasis del CSF.

Por otro lado, se ha estudiado extensamente en la larva del pez cebra el rol de las CSF-cN como mecanosensores internos del sistema nervioso. Se observó que las CSF-cN responden a cambios en la curvatura espinal (Bohm et al., 2016). Las células dorsolaterales al canal central (CSF-cN') responden a compresiones ipsilaterales, mientras que las ventrales al canal central (CSF-cN'') son activadas por compresiones longitudinales (Hubbard et al., 2016). Las CSF-cN están funcionalmente acopladas a la Fibra de Reissner, un agregado proteico extracelular formado por la glicoproteína SCO-spondin, que se extiende desde el tercer ventrículo a lo largo del canal central (Sepulveda et al., 2021). Se ha propuesto que durante la torsión en el nado, la Fibra de Reissner se acerca a la extensión apical de las CSF-cN del lado comprimido (cóncavo) de la médula espinal, activando su disparo (Bohm et al., 2016; Orts-Del'immagine et al., 2020). La deformación mecánica de la extensión apical dentro del canal al entrar en contacto con la Fibra de Reissner incrementa la probabilidad de apertura de los canales Pkd2l1 (Sternberg et al., 2018). Dada la elevada conductancia de los canales Pkd2l1 y la alta resistencia de membrana que caracteriza las CSF-cN (Orts-Del'immagine et al., 2020; Sternberg et al., 2018), la apertura de un único canal Pkd2l1 es suficiente para generar un potencial de acción.

Estudios recientes han abordado la contribución de las CSF-cN a los circuitos espinales de control motor del ratón. Si bien la eliminación de las CSF-cN no afecta la locomoción

general, se vio una reducción en la motricidad fina a través de experimentos de escalera horizontal y viga de equilibrio, así como una reducción en la velocidad máxima en cinta de correr (Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023).

Estos experimentos muestran que la participación de las CSF-cN modulando ciertos aspectos del *output* locomotor en mamíferos es bastante sutil, pero estas funciones contrastan con los roles esenciales encontrados en la locomoción del pez cebra.

Origen embrionario

Tanto en ratones como rata, pollo y pez cebra las neuronas Pkd2l1 se subdividen en un grupo dorsolateral (CSF-cN') y uno ventral (CSF-cN'') (Kutna et al., 2014; Petracca et al., 2016; Yang et al., 2010), que se originan de diferentes dominios progenitores ventriculares. En el desarrollo embrionario de ratón, la especificación de las CSF-cN comienza al estadio E14 durante la fase gliogénica, posterior a la diferenciación de las interneuronas espinales (Petracca et al., 2016). El desarrollo tardío en amniotas las distingue de la génesis en pez cebra, anfibios y lamprea, donde las CSF-cN son las primeras neuronas en diferenciarse, junto con motoneuronas primarias (Djenoune et al., 2014; Yang et al., 2010). Las CSF-cN de ratón se originan en dos regiones progenitoras ventrales (Figura 5). Los dominios p2 y pOL (Nkx6.1⁺, Pax6⁺) generan las células CSF-cN' dorsolaterales, mientras que el segundo pool de progenitores en el dominio p3 en la frontera con la placa del piso (Nkx6.1⁺, Nkx2.2⁺, Foxa2⁺) da origen a las CSF-cN'' ventrales (Di Bella et al., 2019; Petracca et al., 2016) (Figura 5 B). En ambas regiones, los progenitores de las CSF-cN se caracterizan por la expresión de la proteína proneural *Ascl1* que es responsable de la diferenciación neuronal (Di Bella et al., 2019).

El origen dual de las CSF-cN sugiere que los mecanismos regulatorios responsables de su diferenciación terminal podrían estar condicionados según la fuente progenitora. Más aún, considerando la diferencia en el estadio del desarrollo en que surgen las CSF-cN entre peces y ratón, esta regulación sería distinta entre clados.

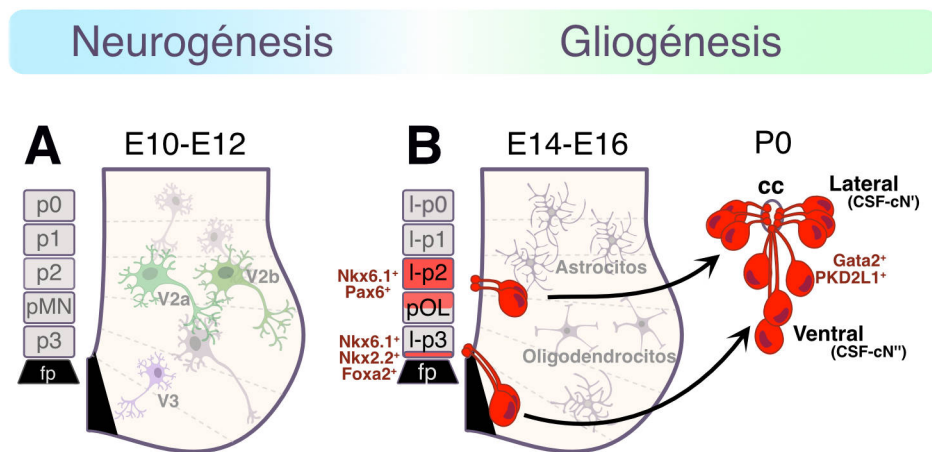


Figura 5. Desarrollo de las CSF-cN en la médula espinal

A. Esquema del tubo neural ventral de ratón E10-E12 donde se detalla los dominios de progenitores ventrales que producen interneuronas V0-V3 y motoneuronas. En verde se marca las interneuronas V2a y V2b, que derivan del dominio progenitor p2, y en violeta las interneuronas V3 que derivan de la región p3, durante la fase neurogénica.

B. Esquema de la región ventral de la médula espinal de ratón en E14-E16 donde se muestra la diferenciación tardía de las CSF-cN, contemporánea a la generación de astrocitos y oligodendrocitos. Las CSF-cN derivan de progenitores tardíos que expresan la proteína proneural *Ascl1* de los dominios p2/pOL y p3. La subpoblación CSF-cN' representa la mayoría de la población y se origina de los progenitores p2/pOL ($Nkx6.1^+$, $Pax6^+$) mientras que las CSF-cN'' derivan de progenitores del borde entre el dominio p3 y la placa de piso (fp) ($Nkx6.1^+$ $Nkx2.2^+$ $Foxa2^+$). Adaptado de Petracca *et al.* (2016).

LOS FACTORES DE TRASCIPCIÓN GATA2 Y GATA3

La familia de factores de transcripción *Gata* recibe su nombre de la secuencia consenso de unión al DNA (A/T)GATA(A/G) reconocida por estas proteínas. Los seis miembros de la familia (*Gata1-6*) presentan dos motivos de dedos de zinc, necesarios para el reconocimiento y unión a la secuencia blanco, y para la interacción con otras proteínas que estabilizan las interacciones al DNA (Ray *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2018; Yang and Evans, 1992). Estos factores de transcripción fueron inicialmente identificados en el desarrollo de linajes hematopoyéticos. La expresión de *Gata2* es necesaria para el mantenimiento y proliferación de progenitores hematopoyéticos (Tsai *et al.*, 1994), mientras que *Gata3* controla el desarrollo y diferenciación de linfocitos T y *Natural Killer* (Hosoya *et al.*, 2010). Sin embargo, su expresión no está restringida a células sanguíneas sino que se activan en otros tejidos, como placenta, endotelio, próstata, riñón, glándula mamaria y cerebro (Home *et al.*, 2017; Tremblay *et al.*, 2018).

Las proteínas Gata no sólo regulan la transcripción de genes mediante la unión a regiones regulatorias del DNA, sino que también pueden funcionar como factores de transcripción pioneros. Esto permite que reconozcan y se unan a secuencias dentro de la heterocromatina, y así promover la apertura y el reclutamiento de reguladores transcripcionales adicionales (Tremblay et al., 2018).

La actividad de los factores Gata como reguladores transcripcionales clásicos o pioneros se logra en gran medida a través de su interacción con co-reguladores para formar un complejo que reclute proteínas remodeladoras de la cromatina (Tremblay et al., 2018). Las proteínas Gata en general regulan la expresión génica junto con otros factores de transcripción tejido-específicos, como Fog1/2 o Tal1. En la médula espinal en desarrollo, la decisión entre los destinos neuronales GABAérgico V2b vs. glutamatérgico V2a está mediada por el complejo de Gata2, LMO4, Tal1 y NLI (Joshi et al., 2009; Peng et al., 2007).

La expresión de factores Gata puede ser influenciada por otras proteínas Gata y sus complejos regulatorios. Esto permite que funcionen de manera consecutiva durante las decisiones de destino celular. La activación secuencial de factores Gata sobre sus genes blanco se conoce como *Gata Switch*, y ocurre para múltiples genes blanco compartidos (Huang et al., 2016; Ray et al., 2009). En el trofoectodermo, por ejemplo, Gata3 reprime la expresión de Gata2 en células progenitoras, y es desplazado por Gata2 durante la diferenciación. En las células diferenciadas se mantiene la expresión de Gata3, pero ya no ocupa los elementos regulatorios del locus Gata2. Este *switch* Gata3/2 está asociado al desplazamiento de Fog1 y tiene un rol en la decisión de destino celular del trofoblasto (Ray et al., 2009).

Gata2 y Gata3 en el desarrollo del sistema nervioso central

Dentro de los seis miembros de la familia, sólo Gata2 y Gata3 se expresan en el sistema nervioso, donde cumplen múltiples funciones regulatorias del desarrollo neural (Nardelli et al., 1999; Tremblay et al., 2018). En el cerebro posterior, Gata2 y Gata3 se expresan en los progenitores de las neuronas serotoninérgicas. En estas neuronas Gata2 funciona como selector terminal de la identidad serotoninérgica mientras que Gata3 sólo es necesario para la activación de genes específicos. Por otro lado,

comparten su origen ontogénico con las neuronas glutamatérgicas del rafe dorsal, en cuya diferenciación Gata2 y Gata3 cumplen roles completamente redundantes (Haugas et al., 2016).

Gata2 y Gata3 también están involucrados en el desarrollo de neuronas GABAérgicas en los dominios m3-m5 en el cerebro medio, el prosómero 2 del diencéfalo y el dominio rV2 del rombómero 1 (Kala et al., 2009; Lahti et al., 2016; Virolainen et al., 2012). A excepción de las neuronas D-GABA del cerebro medio, donde Gata2 y Gata3 son redundantes (Lahti et al., 2016), estos factores cumplen funciones específicas.

La cooperación entre las proteínas Gata y sus complejos asociados lleva a una respuesta transcripcional asociada al contexto celular, generando una respuesta específica en cada tejido. Dentro del sistema nervioso en desarrollo, los patrones de expresión de Gata2 y Gata3 son sorprendentemente coincidentes. Estas proteínas suelen coexpresarse en precursores neuronales, donde Gata2 precede la activación de Gata3 y están involucrados en la adquisición de identidad neuronal GABAérgica. Uno de estos casos es la especificación de las interneuronas espinales V2b, las cuales se originan del dominio progenitor p2, al igual que las CSF-cN' (Peng et al., 2007; Petracca et al., 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis es comprender los mecanismos que controlan la diferenciación celular en la construcción del sistema nervioso.

En particular, nos focalizamos en la génesis de las neuronas en contacto con el líquido cefalorraquídeo, un tipo celular especializado del canal central de la médula espinal. Estas neuronas se producen durante las etapas avanzadas del embrión, lo que sugiere que su desarrollo está dirigido por programas dedicados a la especificación neuronal y que previenen la formación glial.

Usamos el ratón como modelo experimental, ya que provee herramientas genéticas que permiten la disección de la red regulatoria en mamíferos.

Nos planteamos como hipótesis de trabajo que distintos subtipos de neuronas Pkd2l1 se producen de diferentes progenitores neurales y que los factores de transcripción Gata3 y Gata2 participan en los mecanismos regulatorios de la especificación de subclase.

Objetivos específicos

- 1.** Evaluar la secuencia de expresión de los factores de transcripción Ascl1, Gata3 y Gata2, y definir las funciones que cumplen en la diferenciación de las CSF-cN.
- 2.** Caracterizar la diversidad de neuronas espinales Pkd2l1 en base a criterios anatómicos, morfológicos y moleculares, e identificar el origen de las distintas subpoblaciones.
- 3.** Determinar la jerarquía y dependencia de los factores de transcripción Gata2 y Gata3 en la especificación de cada subgrupo de neuronas Pkd2l1.

MATERIALES Y MÉTODOS

RATONES

Los ratones (*Mus musculus*) fueron criados en el bioterio del Instituto Leloir, donde el laboratorio cuenta con una estantería microventilada (Micro-Vent, Allentown Inc, USA) con membranas HEPA (High Efficiency Particle Arresting). Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida, y debido a las dimensiones de las cajas se mantuvo un máximo de cuatro animales adultos por caja. El ambiente del bioterio se mantiene a temperatura constante (22°C) con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas. Los experimentos respetaron las recomendaciones internacionales para la utilización de animales de experimentación (Council, 2011) y contaron con protocolos de trabajo aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Fundación Instituto Leloir (Protocolo 84-Lanuza).

El inicio de la preñez se determinó por la presencia de tapón vaginal, producido por el depósito de secreciones seminales durante la cópula. Se asignó como estadio embrionario 0.5 días (E0.5) a las 15 horas del día de detección del tapón vaginal. Sumado a esto, durante la disección del tejido se verificó el estadio embrionario en base a las características morfológicas específicas y comparación con el atlas de referencia (Kaufman, 1992). En el caso de los experimentos que requirieran generar animales que no sobrevivieran al parto ya sea por su genética (mutantes nulos de *Ascl1*, *Pax6* y *Gata3*, mutantes condicionales de *Gata3* y/o *Gata2*) o por la administración de Tamoxifeno a la hembra preñada que puede generar distocia en el parto, se preparó tejido en el estadio perinatal E18.5.

Los ratones exocriados Crl:CD1(ICR) (CD-1® IGS Mouse, Charles River, MA, USA) fueron usados para mantener las líneas modificadas genéticamente y en experimentos con animales *wildtype*. La colonia de animales CD-1 fue mantenida siguiendo una estrategia de exocría.

Aquí se detalla las líneas de ratones modificados genéticamente utilizados en este trabajo.

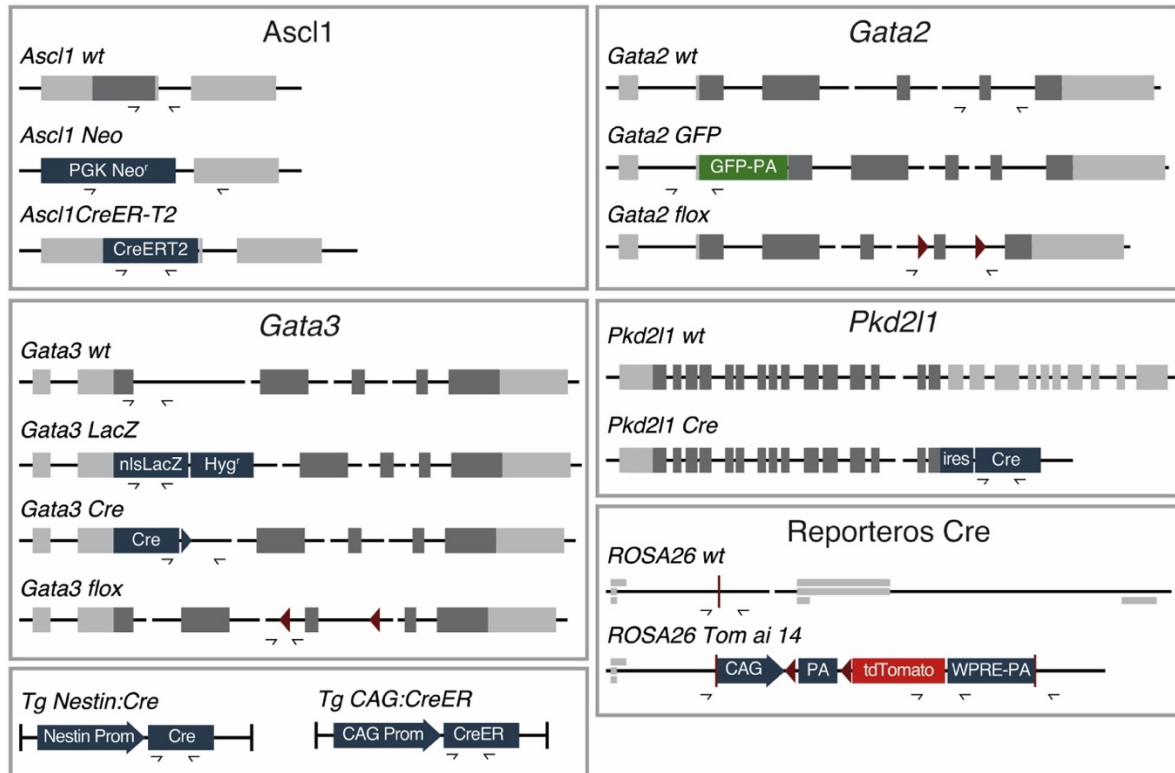


Figura 6. Líneas de ratones modificados genéticamente usadas.

Esquemas ilustrativos (fuera de escala) de las líneas de ratones modificados genéticamente utilizadas en este trabajo. Los recuadros en gris claro representan exones y en gris oscuro las regiones codificantes correspondientes. Los triángulos rojos corresponden a sitios loxp.

Ascl1^{Neo} (MGI ID: 1857470) (Guillemot et al., 1993). Línea en que la región codificante de *Ascl1* está reemplazada por un *cassette* de resistencia a neomicina. La mutación es letal en homocigosis, donde los animales mueren después del nacimiento. Esta cepa fue utilizada para generar embriones carentes de *Ascl1*.

Ascl1^{CreER} (MGI ID: 4452601) (Kim et al., 2011). Línea en la cual la región codificante de *Ascl1* fue reemplazada por la secuencia de la recombinasa Cre fusionada al dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (segunda generación-CreERT2). La enzima sólo transloca al núcleo tras la administración de Tamoxifeno, permitiendo la recombinación de sus blancos. Esta línea fue utilizada para marcar y seguir en el tiempo la progenie de células *Ascl1*⁺. El alelo *Ascl1^{CreER}* es nulo.

Gata3^{LacZ} (MGI ID: 2181200) (van Doorninck et al., 1999). Línea en que inmediatamente río abajo del ATG de *Gata3* se insertó un *cassette* nls-lacZ que expresa β -galactosidasa

con señal de localización nuclear. El alelo reportero resultante refleja la expresión de *Gata3*. Se utilizó para generar embriones nulos para *Gata3* o para producir mutantes condicionales con *Gata3^{flox}* en combinación con los alelos *Nes:Cre*, *CAG:CreER* y *Pkd2l1^{Cre}*, para ganar eficiencia en la producción de células mutantes ya que requiere la delección de un único alelo flox. La homocigosis del *Gata3^{LacZ}* impide la producción de noradrenalina, resultando en letalidad embrionaria causada por fallas cardíacas alrededor del estadio E10.5-E11.5 (Lim et al., 2000). Sin embargo, esta letalidad puede ser rescatada mediante tratamiento farmacológico (ver *Rescate farmacológico de los mutantes nulos Gata3*).

Gata3^{Cre} (MGI ID: 5619418) (Zhang et al., 2014). Línea en la que la secuencia codificante de la recombinasa Cre se encuentra río abajo del ATG de *Gata3*, lo que permite marcar la progenie de células *Gata3⁺*.

Gata3^{flox} (MGI ID: 3487291) (Zhu et al., 2004). El exón de *Gata3* que codifica el dominio de unión a ADN (exón 4) está flanquado por sitios loxp. Esto permite escindir este exón de manera controlada en el espacio y tiempo, y generar animales mutantes condicionales. La proteína carente de la región codificada en el exón 4 no es funcional.

Gata2^{GFP} (MGI ID: 2673268) (Suzuki et al., 2006). Línea donde se insertó la secuencia de GFP reemplazando el ATG de *Gata2*. La proteína GFP reporta la expresión de *Gata2*. Letal en homocigosis (los embriones mueren aproximadamente a E10). Se utilizó para generar embriones mutantes condicionales con *Gata2^{flox}* en combinación con el alelo *Nes:Cre*, para favorecer la delección en solo un alelo flox.

Gata2^{flox} (MGI ID: 3628640) (Charles et al., 2006). El exón de *Gata2* que codifica para el dominio de unión al ADN (exón 5) está flanqueado por elementos loxp. Esto permite escindirlo de manera controlada por recombinación mediada por Cre, y así generar animales mutantes condicionales. El alelo *Gata2^{flox}* no recombinado produce una proteína inalterada normal, mientras que luego de la eliminación del exón 5 no es funcional.

Pkd2l1^{Cre} (MGI ID: 6451758) (Ye et al., 2016). Línea que contiene inserta la construcción IRES-Cre inmediatamente después del codón STOP de la secuencia codificante de *Pkd2l1*. Permite eliminar genes de manera condicional y marcar células *Pkd2l1⁺*.

Pax6^{Sey} (Small eye, Sey) (MGI ID: 1856155) (Stoykova et al., 1996). Línea en que la proteína Pax6 no es funcional debido a una mutación espontánea en que una transversión de G por T en el nucleótido 622 introduce un codón STOP prematuro. La proteína resultante presenta el dominio *pair* (N-terminal), pero carece de dominio *homeobox* (C-terminal). Letal en homocigosis.

Ai14 td-Tomato / CAG:LSL-tdTomato (MGI ID: 3809524) (Madisen et al., 2010). Línea reportera condicional de la actividad de la recombinasa Cre. La construcción *td-Tomato Ai14* contiene el promotor pCAG, un *cassette* STOP flanquado por elementos loxp y la secuencia de la proteína fluorescente *td-Tomato*. Esta construcción está insertada en el *locus* ROSA26.

Tg Nes:Cre (MGI ID: 2176173) (Tronche et al., 1999). Línea transgénica en que la recombinasa Cre se expresa bajo el promotor de Nestin de rata y el enhancer específico de sistema nervioso presente en el segundo intrón del gen. Permite eliminar genes o marcar células de manera restringida al sistema nervioso central.

Tg CAG:CreER (MGI ID: 2182767) (Hayashi and McMahon, 2002). Línea transgénica donde la recombinasa Cre está asociada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno (primera generación). Su expresión está dirigida por el promotor CAG, de expresión fuerte y constitutiva. Esta línea permite eliminar genes de manera controlada en el tiempo.

Las líneas de ratones modificados genéticamente fueron mantenidas en heterocigosis, a excepción de la línea reportera condicional *Tomato Ai14* y de las líneas flox (*Gata3^{flox}*, *Gata2^{flox}*).

GENOTIPADO DE ANIMALES

Extracción de ADN genómico

Para determinar el genotipo de los animales se realizó una biopsia de cola de aproximadamente 2 mm, de la cual se extrajo ADN genómico. Se incubó el tejido en 100 µl de solución de lisis (100 mM Tris-HCL pH 8,5; SDS 0,2%, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM y Proteinasa K 20 µg/ml, Invitrogen 25530, Ambion AM2542) a 56°C en agitación hasta su degradación. Se agregó 100 µl de isopropanol y 400-800 µl de etanol 70% para precipitar el ADN y luego se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos. Finalmente, se resuspendió en 100-300 µl de agua bidestilada con agitación a 56°C.

Reacción de PCR

Se empleó la reacción de PCR para determinar el genotipo de los animales utilizando los oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Las reacciones fueron realizadas en 25 µl (Buffer Taq 1x; dNTPs 150 µM; MgCl₂ 1,5 mM; oligonucleótidos 0,4 µM; Taq 0,1%; ~100 ng ADN) con un protocolo de 30 ciclos (94°C 30 seg, 62°C 30 seg, 72°C 1 min) con una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos y una elongación final de 72°C por 5 minutos (Termociclador Veriti, Applied Biosystems). En todos los casos se incluyó controles positivos y negativos. El producto de reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Fenotipado

En el caso de animales o embriones que expresaran la proteína fluorescente GFP o Tomato, la identificación se realizó por observación de la fluorescencia. Se utilizó el sistema de gafas y linternas de fluorescencia Xite (Xite Fluorescence Flashlight System, NIGHTSEA), Royal Blue (Xite-RB) y Green (Xite-GR). Este sistema consiste en una linterna con un espectro de emisión restringido (Royal Blue 440-460 nm, Green 510-540 nm) y un par de gafas con un filtro (Royal Blue 500 nm longpass, Green 600 nm longpass). En todos los casos se verificó que el patrón de fluorescencia en el animal fuera el esperado. Para los animales postnatales esta detección fue realizada durante los primeros cinco días del nacimiento.

Para los embriones con alelos LacZ se realizó el ensayo de actividad enzimática de β -galactosidasa. El tejido fue aislado, lavado con PBS a temperatura ambiente y agregado a buffer de reacción (MgCl₂ 2 mM, Tritón X-100 0.2%, K₄Fe(CN)₆ 5mM y K₃Fe(CN)₆ 5mM) con X-Gal 1 mg/ml (Invitrogen B1690), e incubado a 37°C en oscuridad.

PCR	Nombre (Fwd/Rev)	Secuencia	Tamaño del Producto (pb)
Cre (<i>Ascl1</i> ^{CreER} , <i>CAG:CreER</i> , <i>Nestin:Cre</i> ; <i>Gata3</i> ^{Cre})	CreJacksFw Cre3	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC TAATCGCCATCTTCCAGCAG	790
	CreFw Cre3	CCGGAGATCATGCAAGCTGG TAATCGCCATCTTCCAGCAG	110
Tomato Ai14	GT_Fw GT_Rev	CCAAGCTGAAGGTGACCAAG TCTTCTTCTGCATTACGGGG	287
	tdTom-Fd3 tdTom-Rv4	CCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCT TTAAGATCTGTACAGCTCGTCCATGCC	307
<i>Locus Rosa</i> 26 WT	Rosa-10 Rosa-11	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT CGAGGCGGATCACAAGCAATA	330
Neomicina (<i>Ascl1</i> ^{Neo})	NEO F1 NEO R1	GCATACGCTTGATCCGGCTACC AAGGCGATGCGCTGCGAATC	399
<i>Ascl1</i> -WT	Mash wt 1 Mash wt 2	CTCCGGGAGCATGTCCCCAA CCAGGACTCAATACGCAGGG	569
Higromicina (<i>Gata3</i> ^{LacZ})	hyg1 hyg2	AATTCAGCGAGAGCCTGACC TCCAGAAGAAGATGTTGGCGA	460
LacZ	LacZ392 Fw LacZ393 Rev	TTGGCGTAAGTGAAGCGAC AGCGGCTGATGTTGAACTG	507
GFP	TG_FW TG_Rev	GGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCG GGTACGTCCAGGAGCGCACCTCTTCTCAAGG	411
	EGFP1 EGFP2	GACGTAAACGGCCACAAGTT GAACTCCAGCAGGACCATGT	650
Gata3Flox	Gata3-fl-P8 Gata3-fl-P11	CAGGGCACTAAGGGTTGTTAACTT GAATCCATCCATGAGACACACAA	150 (alelo Flox) 220 (alelo WT)
Gata2Flox	Gata2 flox B Gata2 flox A	TCCGTGGGACCTGTTTCCTTAC GCCTGCGTCCCAACACCTCTAA	671 (alelo WT)

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos utilizados en el genotipado de las correspondientes líneas de ratones.

Los ratones Sey/+ se caracterizan por ojos pequeños o cerrados, y los embriones homocigotas presentan malformaciones craneofaciales profundas y ausencia de desarrollo ocular. En ambos casos, los animales fueron identificados mediante la observación del fenotipo.

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Inducción de la actividad recombinasa

La enzima Cre tiene la capacidad de recombinar fragmentos de ADN definidos por las secuencias loxP. En la variante CreER, la recombinasa está fusionada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno. La recombinasa sólo puede traslocar al núcleo en presencia del ligando, lo que permite el control temporal de su actividad. De esta forma, al administrar el ligando estrogénico Tamoxifeno (Tam, Sigma Aldrich T5648, MPBIO 156738) la enzima trasloca al núcleo y recombina el ADN blanco. La probabilidad de recombinación aumenta con la dosis de Tamoxifeno utilizada. Se preparó el Tamoxifeno en aceite de girasol (Sigma Aldrich, S5007) en una concentración de 20 mg/ml, y se inyectó una única dosis de 30-150 mg/kg intraperitoneal por hembra preñada según el experimento.

Rescate farmacológico de los mutantes nulos Gata3

La eliminación completa de *Gata3* es letal en estadios embrionarios tempranos (E10.5-E11) (Pandolfi et al., 1995), pero se puede rescatar administrando agonistas adrenérgicos (Kaufman et al., 2003; Lim et al., 2000). Se agregó isoprotenerol (100 µg/ml, Sigma Aldrich I5627), fenilefrina (100 µg/ml, Sigma Aldrich P6126) y ácido ascórbico (2 mg/ml, Sigma Aldrich A0278) en el agua de bebida de las hembras *Gata3^{LacZ/+}* apareadas con machos *Gata3^{LacZ/+}* a partir del día 7.5 de preñez. También se utilizó esta suplementación en la generación de mutantes *Gata3* condicionales con *Gata3^{Cre}* y *CAG:CreER*.

PREPARACIÓN DE TEJIDO ESPINAL

Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical en el estadio de interés, luego se extrajo el útero y los embriones fueron aislados en buffer PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4). La disección y procesamiento de los embriones se realizó bajo lupa estereoscópica (Olympus SZ61 y Zeiss Stemi2000). Los embriones fueron decapitados, inmovilizados con alfileres de 100-200 µm (FST 26002-10 o FST 26002-20) en placas de Sylgard® (Dow Corning 4019862) con PBS y luego eviscerados con pinzas afiladas (Dumont #5, FST). Para los estadios embrionarios E16.5 o posteriores, o para animales neonatos, los cordones espinales fueron aislados abriendo la columna vertebral utilizando tijeras de disección (Spring Scissors, angled, FST 15008-08).

El tejido aislado fue fijado por una hora en paraformaldehído 4% en PBS (PFA, pH 7,4, Sigma Aldrich P6148, MP Biomedicals 150146) a 4°C y luego lavado tres veces con PBS por 20 minutos. Se criopreservó el tejido dejándolo durante la noche en una solución de sacarosa 20% en PBS (Anedra, AN00711809) a 4°C.

Se embebió el tejido en medio de montaje para criostato (Cryoplast, Biopack 120405) dentro de un molde de papel aluminio, y se congeló progresivamente utilizando etanol 96% enfriado con hielo seco. Cada bloque fue armado con tejido de animales de la misma camada para garantizar que las condiciones experimentales fueran idénticas entre los individuos a comparar. Los bloques congelados fueron almacenados a -80°C.

Se cortó el tejido en secciones transversales de 30 µm de espesor utilizando un criostato (modelo CM 1850, Leica Biosystems), y se lo colectó sobre portaobjetos de vidrio (Superfrost Plus, VWR 48311-703 o Fisher 12-550-15). Los vidrios conteniendo las secciones fueron secados por 15-30 minutos a 37°C y luego guardados a 4°C.

INMUNOFLUORESCENCIA

Para delimitar el área de trabajo de los portaobjetos, se utilizó un marcador hidrofóbico (SuperPap-Pen, EMS 71310) y se dejó secar. Se procedió con tres lavados de 10 minutos con PBS-Tween20 0.1% (PBS-Tw) a temperatura ambiente, y luego se incubó en solución de bloqueo (suero normal de cabra o burro inactivado 5%, Natocor; Tritón X-100 0.1% en PBS) durante al menos una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó con los anticuerpos primarios en su dilución correspondiente (Tabla 2) en solución de bloqueo, en cámara húmeda, a 4°C durante la noche. En el caso de utilizar un anticuerpo primario hecho en ratón se agregó fragmento monovalente de anticuerpo de burro anti-ratón (15 µg/ml, Jackson ImmunoResearch 715007003) a la solución de bloqueo para disminuir la señal basal.

Al día siguiente se lavó tres veces con PBS-Tw por 20 minutos a temperatura ambiente, y se incubó con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos (Tabla 3) en solución de bloqueo (dilución 1:250) por al menos dos horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Luego se tiñó con una solución del colorante nuclear bis-benzimida Hoescht 33342 (Invitrogen H1399, 1 µg/ml) en PBS-Tw por 5 minutos a temperatura ambiente y se continuó con tres lavados de 10 minutos con PBS-Tw a temperatura ambiente.

Para montar las secciones se deshidrató el tejido en una serie de soluciones de concentración creciente de etanol (25%, 50%, 75%, 96%, 100%, 4 minutos en cada una), y dos de xileno 100% (4 minutos cada uno). Finalmente se montó con DPX (Sigma Aldrich 06522) y cubreobjetos (Marienfeld 0101222), y se dejó secar en oscuridad durante la noche a temperatura ambiente.

Antígeno	Especie	Fuente	Factor de Dilución
Ascl1	Ratón	Pharmigen 556604	500
Foxa2	Cabra	R&D Systems AF2400	1600
Foxj1	Ratón	Invitrogen 14-9965-80	500
Gata2	Cobayo	Kamal Sharma, University Chicago, IL, USA (Peng et al., 2007).	2000
Gata3	Ratón	Santa Cruz sc-268	100
GFP	Pollo	Aves GFP-1020	500
GFP	Conejo	Invitrogen A11122	1000
NeuN	Ratón	Chemicon International, Inc.	500
Nkx 2.2	Ratón	DSHB 74.5A5	25
Nkx 6.1	Ratón	DSHB F55A10	15
Pax6	Ratón	DSHB	15
Pkd2l1	Conejo	Charles Zucker, UCSD, USA (Huang et al., 2006)	8000
Ds-Red	Conejo	Clontech 632496	300
RFP	Conejo	Rockland 600-401-379	300
RFP	Cabra	Rockland 200-101-379	500
Sox2	Cabra	Santa Cruz 17320	500
Sox9	Cabra	R&D Systems AF3075	750
β -Galactosidasa	Conejo	Cappel	1000
β -Galactosidasa	Rata	Martyn Goulding (Lanuza et al., 2004).	1000

Tabla 2. Anticuerpos primarios usados.

Anticuerpo Secundario	Fuente
Anti-Ratón acoplado a Cy2/Cy3/Cy5	Jackson ImmunoResearch (715225151, 715165151, 715175151)
Anti-conejo acoplado a Cy2 / Cy3 / Cy5	Jackson ImmunoResearch (711225152, 711165152, 711175152)
Anti-rata acoplado a Cy2 / Cy3 / Cy5	Jackson ImmunoResearch (712225153, 712165153, 712175153)
Anti-cobayo acoplado a Cy2	Jackson ImmunoResearch (706225148)
Anti-cabra acoplado a Cy3, Cy5	Jackson ImmunoResearch (705165147, 705175147)
Anti-pollo acoplado a Cy2/Cy3	Jackson ImmunoResearch (703225155, 703165155)

Tabla 3. Anticuerpos secundarios usados.

HIBRIDACIÓN IN SITU

Para la generación de transcritos anti-sentido de Pkd1l2 se utilizó como molde un fragmento conteniendo una porción del gen y el promotor de T7 obtenido por PCR (Petracca et al., 2016). La transcripción se llevó a cabo en 10 µl de una mezcla conteniendo: ADN molde (~0.2-1 µg), ribonucleótidos (1 mM cada uno) incluyendo dig-rUTP (350 µM, Roche 11209256910), inhibidor de ARNasas (RNase-out, Invitrogen 100000840), DTT (10 mM), buffer de transcripción (1X, Promega P118B) y T7, ARN polimerasa según corresponda (1 UE, Roche 10881775001, Promega P208C, P108B). Se incubó por 2hs a 37°C y luego se agregó 2 µl de DNAsal (RQ Promega M610A) por 10 minutos. Luego, se precipitó el ARN con 100 µl de agua DEPC (3,5 mM Sigma D5758), 2 µl de LiCl 5M y 300µl de etanol 100%, se centrifugó y se lavó con etanol 70%. Se resuspendió la sonda en 20µl de agua DEPC, se controló la síntesis en gel de agarosa 2% y se conservó a -80°C.

Las secciones montadas fueron secadas a 55°C por 15 min. Se lavó con buffer PBS-DEPC (0,05%) tres lavados de 3 min, se fijó el tejido con PFA 4% por 10min y se lavó nuevamente. Luego, se incubó el tejido con Proteinasa K (3µg/ml en buffer PBS-DEPC) por 3min, se trató con PFA 4% por 5min y se repitieron los lavados. Se realizó una

acetilación con trietanolamina-HCl 1.5%, pH=8 y anhídrido acético 0.25% por 10 min para disminuir la marca inespecífica. Se permeabilizó el tejido con Tritón X-100 1% en buffer PBS-DEPC durante 30 min y se repitieron los lavados.

Las secciones fueron incubadas por 2 horas con solución de hibridación (formamida desionizada 50%, SSC 5x, Denharts 5x (Ficoll-400 1%, polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%) y 0.25 mg/ml ARNt de levadura (Invitrogen 15401-029). Las sondas marcadas con digoxigenina fueron diluidas en la solución de hibridación a aproximadamente 1 µg/ml, calentadas a 80°C por 5 minutos, seguido de incubación en hielo por 5 minutos. Se agregó sobre cada portaobjeto 150 µl de la solución de hibridación conteniendo la sonda y se cubrió con un cubreobjetos para su posterior incubación en cámara húmeda (formamida 50%) en estufa a 70°C durante la noche.

Se retiró el cubreobjetos y se realizaron tres lavados de 45 minutos a 70°C con SSC 1x y formamida 50%. Posteriormente se lavó con B1-T (100mM Tris pH=7.5, NaCl 0.15M, Tween-20 0,1%) por 5 minutos y se incubó con solución de bloqueo (suero de cabra normal 10%, en solución B1-T) por 1 hora. Finalmente, se incubó con anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (1:2000, Roche, Cat #11093274910) en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con B1-T a temperatura ambiente y uno de 5 minutos con solución B3 (100 mM Tris pH=9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween-20 0.1%, tetramisol 50 ng/ml Sigma Aldrich, I9756). La actividad de la fosfatasa alcalina fue revelada con NBT 150 µg/ml (Roche, 11585002001), BCIP 166 µg/ml (Roche, 11087479001) en solución B3. Se detuvo la reacción de revelado lavando con agua y se montó con PBS: glicerol 1:1.

MICROSCOPIA

Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas usando los microscopios confocales Zeiss LSM 880, Zeiss LSM 710 NLO, Zeiss LSM 510 Meta y Zeiss LSM Pascal, los cuales cuentan con láseres de argón (454/488/514 nm), helio-neón GREEN (543 nm), helio-neón RED (633 nm) y diodo (405 nm). Estos equipos cuentan con el software Zen Black (LSM 880, LSM 710 NLO) o LSM 510 (LSM 510 Meta, LSM Pascal), que fueron utilizados para la captura de imágenes. Brevemente, este proceso consta de identificar

el campo de interés, seleccionar los canales correspondientes, el ajuste de intensidad de láseres a utilizar y la ganancia. Al tomar las imágenes se seleccionó la apertura de *pinhole* adecuada y se ajustó los planos en Z a capturar según cada caso. En imágenes con objetivos 20x el grosor total fue de aproximadamente 5 μm . Una vez obtenidas, las imágenes fueron procesadas utilizando el Software Zen Blue o LSM-Image Browser, donde se realizó una proyección ortogonal de máximo de intensidad y luego se exportó en formato TIFF. Para cuantificar imágenes sin proyectar se empleó el software FIJI.

Las imágenes de las hibridaciones *in situ* (microscopía óptica de transmisión) fueron tomadas utilizando un microscopio Zeiss Axioplan acoplado a cámaras CCD.

Para construir mapas de distribución celular, las posiciones fueron tomadas usando el software FIJI. Con el objetivo de combinar datos de distintos embriones, las medidas fueron relativizadas usando como referencias el canal central, la línea media y el surco ventral en cada sección.

Las figuras con imágenes fueron montadas utilizando los programas Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, Affinity Photo, Affinity Designer y Affinity Publisher.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los conteos de células se utilizó un mínimo de 10 secciones transversales de al menos dos individuos de la edad y genotipo correspondiente. En los ensayos con cepas mutantes se utilizó como control animales de la misma camada. Se muestra los resultados como media \pm desvío estándar (DE), excepto que se indique lo contrario. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism, y se examinó la significancia de los datos con las pruebas no-paramétricas Mann-Whitney U o ANOVA de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. Las variaciones que presentaran una significancia asintótica (bilateral) menor a 0.05 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$) fueron consideradas como significativas.

RESULTADOS

DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS DEL CANAL CENTRAL

Las CSF-cN derivan de dos regiones progenitoras ventrales tardías

Trabajos previos del laboratorio demostraron que las neuronas del canal central de la médula espinal de ratón son generadas durante estadios embrionarios asignados a la diferenciación glial. Las primeras neuronas, reconocidas por Pkd2l1, surgen durante el día 14 del desarrollo embrionario (E14), estadio posterior al *switch* neuro-glial. Se ha identificado que las CSF-cN tienen origen dual a partir de dos regiones ventrales del neuroepitelio del tubo neural (Figura 7 A) (Di Bella et al., 2019; Petracca et al., 2016).

Para definir estas regiones se analizó la expresión de distintas proteínas que tienen restricción dorso-ventral en la zona ventricular embrionaria E13.5. El factor de transcripción Pax6 cubre una extensión ventricular amplia, desde regiones dorsales hasta el dominio pOL, quedando excluido del dominio ventral p3 (Figura 7 D) (Jessell, 2000; Sagner and Briscoe, 2019). En contraste, Nkx6.1 está restringido a la región ventral del tubo neural y abarca los dominios p2, pOL y p3 (Figura 7 E). Por lo tanto, la intersección entre los territorios de expresión de Pax6 y Nkx6.1 delimita los dominios p2 y pOL, fuente de neuronas Pkd2l1⁺ (Figura 7 E, corchete). Por otro lado, la expresión del factor Nkx2.2 define el dominio neuroepitelial p3 (Figura 7 C), mientras que Foxa2 es marcador de las células de la placa del piso (fp según sus siglas en inglés) y de la subregión más ventral del dominio p3 (Jessell, 2000; Sagner and Briscoe, 2019). La combinatoria espacial de estas proteínas circunscribe el segundo origen de neuronas Pkd2l1⁺ en el borde ventral del dominio p3 (p3/fp, Nkx6.1⁺, Nkx2.2⁺, Foxa2⁺, Pax6⁻) (Figura 7, corchete).

Estudios previos establecieron que el factor de transcripción Ascl1 inicia la diferenciación de las CSF-cN (Di Bella et al., 2019). Al realizar tinciones contra Ascl1 en tejido espinal de ratón E13.5, se observó la presencia de la proteína proneural Ascl1 en algunos progenitores de los dominios p2-pOL y p3 de la zona ventricular tardía (Sox9⁺) (Figura 7 F). A diferencia de los genes de *patterning* que presentan una expresión

relativamente homogénea, los progenitores *Ascl1*⁺ se disponen entremezclados con células *Ascl1* negativas.

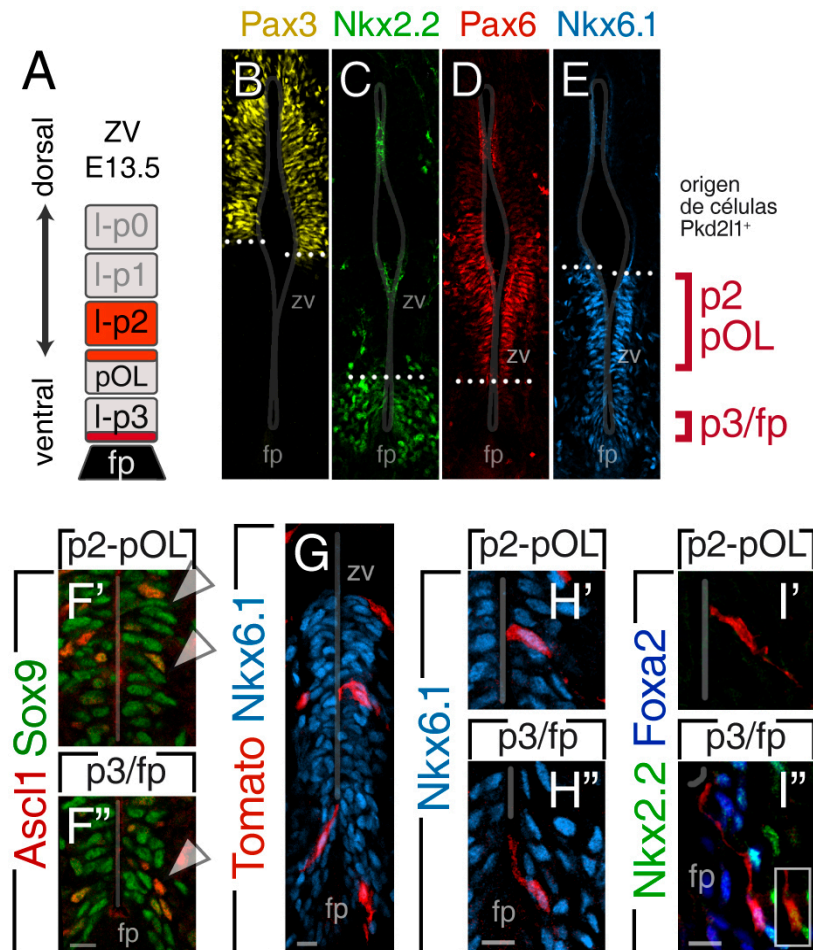


Figura 7. Las neuronas *Pkd2l1*⁺ se originan de dos dominios ventrales del tubo neural.

A. Esquema de la zona ventricular del tubo neural E13.5, donde se representa los patrones de expresión de factores de transcripción y los dominios p2-pOL y p3 que originan las neuronas del canal central.

B-E. Inmunohistoquímica en cortes transversales de médula espinal de ratón E13.5 usando anticuerpos contra los factores de transcripción *Nkx6.1*, *Pax6*, *Nkx2.2*, *Pax3*. Se muestra la zona ventricular. Las líneas punteadas marcan los límites de expresión de los factores de transcripción. Los corchetes a la derecha señalan las regiones progenitoras que dan origen a las neuronas *Pkd2l1*⁺: a) el dominio p2 y la mitad dorsal de dominio pOL, y b) el extremo ventral del dominio p3 en la frontera con la placa del piso (fp).

F. Inmunohistoquímica usando un anticuerpo contra *Ascl1* en secciones transversales de médula espinal E13.5. Se observa la presencia de *Ascl1* en progenitores neurales *Sox9*⁺ tardíos de las regiones p2-pOL y p3. Barra de escala 10 μ m.

G-I. Marcación permanente de progenitores *Ascl1*⁺ tardíos usando ratones *Ascl1*^{CreER}; *td-Tomato* (Tamoxifeno a E13.75). El seguimiento a E14.5 muestra células *Tomato*⁺ en los dominios ventriculares p2-pOL (*Nkx6.1*⁺) y el borde del p3 con la fp (*Nkx6.1*⁺ *Nkx2.2*⁺ *Foxa2*⁺). Barra de escala 10 μ m.

Marcación genética de progenitores *Ascl1*⁺ tardíos

Considerando que las CSF-cN derivan de células ventriculares *Ascl1*⁺ tardías, se rastreó el destino de estos progenitores utilizando ratones *Ascl1*^{CreER} junto con el reportero condicional *td-Tomato*. En este sistema de activación inducible, la recombinasa Cre fusionada al dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno (Cre-ERT2) se expresa bajo el promotor de *Ascl1*, pero es incapaz de translocar al núcleo. La actividad de Cre se controla temporalmente mediante la aplicación de Tamoxifeno. Este sistema fue puesto a punto previamente en el laboratorio, habiéndose determinado que el tratamiento con Tamoxifeno a E13.75 resulta en la marcación de los progenitores *Ascl1*⁺ que se diferencian en las neuronas del canal central, donde aproximadamente el 90% de las células *Tomato*⁺ a E18.5 son *Pkd2l1*⁺ (Di Bella et al., 2019). Por lo tanto, esta estrategia permite seguir el curso de la diferenciación neuronal durante fases previas a la expresión de *Pkd2l1*, el marcador “terminal”.

Para verificar la fidelidad de este método genético, se generó tejido espinal *Ascl1*^{CreER};*td-Tomato* E14.5. Las tinciones contra *Tomato* mostraron células rojas en posiciones dorso-ventrales de la zona ventricular coincidentes con la expresión de *Ascl1* a E13.5 (Figura 7 G-I), donde posteriormente surgen las neuronas *Pkd2l1*⁺ (Di Bella et al., 2019). Para confirmar su identidad molecular, se evaluó la expresión de *Nkx6.1*, *Nkx2.2* y *Foxa2*. Estos ensayos mostraron células *Tomato*⁺ *Nkx6.1*⁺ dentro de los dominios p2-pOL y células rojas *Nkx6.1*⁺, *Nkx2.2*⁺, *Foxa2*⁺ en el ápice ventral del dominio p3 (Figura 7 H,I).

Por lo tanto, estos experimentos validan la estrategia de identificación de cohortes de células *Ascl1* y su seguimiento durante la diferenciación celular.

Los reporteros *Gata2*^{GFP} y *Gata3*^{LacZ} reflejan la expresión *Gata3/2* endógena

Trabajos previos del laboratorio mostraron que las neuronas del canal central de ratón expresan *Gata2* y *Gata3* (Di Bella et al., 2019; Petracca et al., 2016), los cuales tienen un rol esencial en la correcta especificación de las CSF-cN del pez cebra (Andrzejczuk et al., 2018). La expresión de estos genes comienza en fases postmitóticas de la

diferenciación, ya que no encontramos células $Gata3/2^+$ que incorporen BrdU (resultado no mostrado). Para analizar la expresión de estos factores de transcripción se utilizó las líneas de ratones *knock-in Gata2^{GFP}* y *Gata3^{LacZ}*, que permiten rastrear la expresión de estos dos genes a través de las proteínas GFP o β -gal (Figura 8). En primer lugar se verificó la fidelidad de estos reporteros genéticos.

Cortes transversales de la médula espinal de embriones *Gata2^{GFP}* E14.5 fueron teñidos con anticuerpos contra GFP y Gata2. Se observó que casi la totalidad de las células $Gata2^+$ en la zona ventricular fueron positivas para GFP (Figura 8 A-C, E). Dado que Gata2 se mantiene en estadios perinatales, se confirmó la coexpresión a P0 (Figura 8 D,E). Más aún, las células β -gal⁺ ($Gata3^+$), que aún no expresaron Gata2 (ver detalles más adelante), no se marcaron con GFP, por lo que se concluye que GFP reporta con precisión la expresión y activación de Gata2.

En el caso de Gata3 se comparó la expresión de β -gal y Gata3 en la médula *Gata3^{LacZ}* E14.5. Se encontró que más del 80% de las células coexpresaron Gata3 y el reportero β -gal (Figura 8 F,G), lo cual sugiere que el alelo *Gata3^{LacZ}* reporta Gata3 endógeno. En la zona del manto ventrolateral, donde se encuentran las neuronas V2b, todas las células $Gata3^+$ fueron positivas para β -gal. Hay una porción minoritaria (~10%) que expresó únicamente el reportero, lo que probablemente se deba a la inactivación de Gata3 con la persistencia más prolongada de β -gal nuclear en algunas neuronas V2b. En contraste, al inspeccionar las células ventriculares, que corresponderían a CSF-cN en desarrollo, se observó que β -gal marca entre el 40 y 45% de las células $Gata3^+$ (Figura 8 F,G). Estas células se encuentran en las etapas más iniciales de su diferenciación postmitótica, donde la inducción de Gata3 ha sido muy reciente. Por lo tanto, la discrepancia observada en la zona ventricular se justifica como un retraso en la acumulación nuclear de β -gal que posibilite su detección. Si bien existe una demora en el reporte de la expresión de Gata3, el alelo *Gata3^{LacZ}* es una herramienta válida para el rastreo de la expresión de Gata3 en la médula espinal.

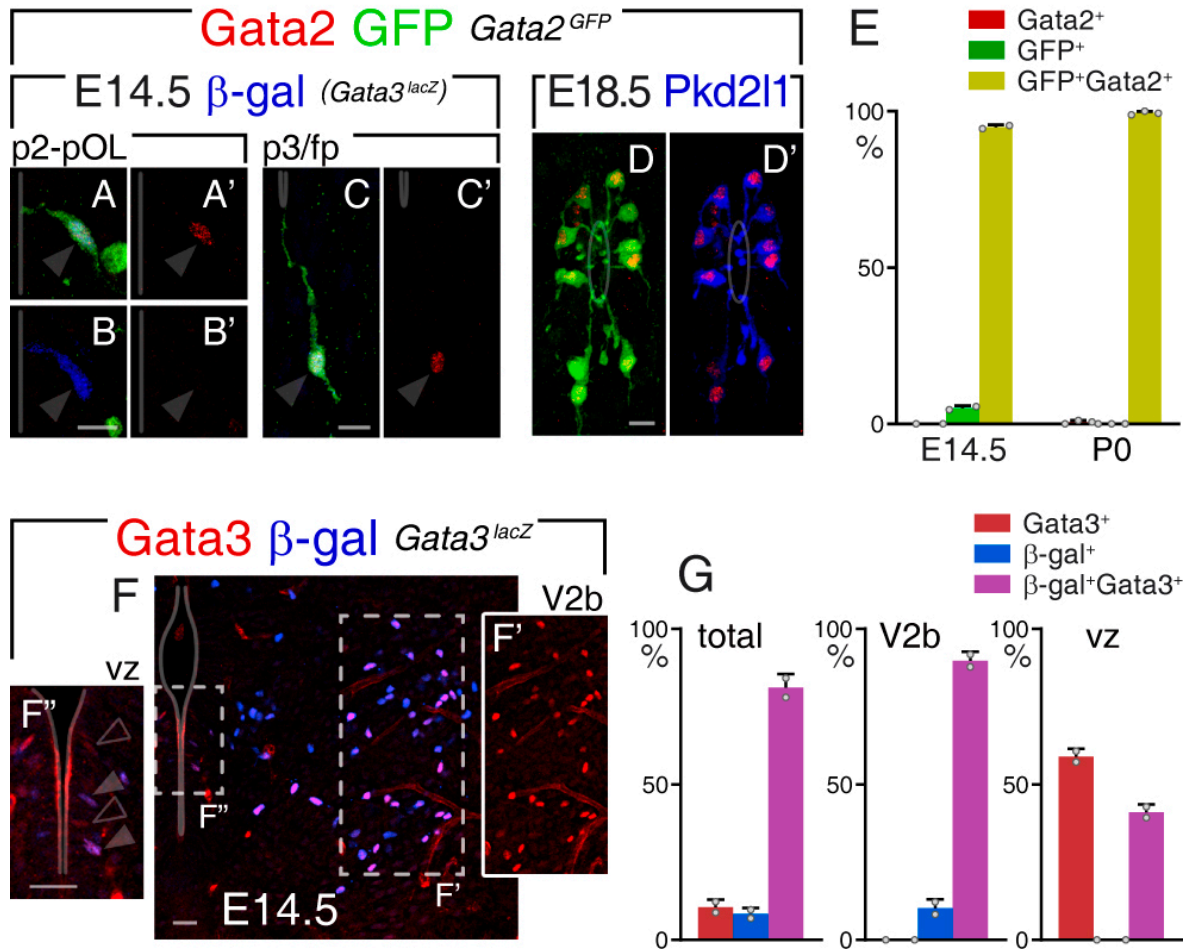


Figura 8. Los reporteros genéticos $Gata2^{GFP}$ y $Gata3^{LacZ}$ recapitulan la expresión endógena de los factores de transcripción $Gata2$ y $Gata3$.

A-D. Secciones transversales de médula espinal embrionaria de ratón $Gata2^{GFP} Gata3^{LacZ}$. Tinciones contra $Gata2$, GFP y β -gal en las regiones p2-pOL (A-B) y p3 (C) E14.5. Co-expresión de $Gata2$, GFP y $Pkd21l$ en neuronas del canal central a E18.5 (D). Barra de escala 10 μ m.

E. Cuantificación de la expresión $Gata2$ y el reportero GFP a E14.5 y E18.5. Las barras son media+DE y los círculos indican el promedio en cada embrión (E14.5 n=2, E18.5 n=3).

F. Tinción contra $Gata3$ y β -gal en el tubo neural E14.5 $Gata3^{LacZ}$ (F), donde se resalta la población de interneuronas V2b (F') y la zona ventricular (F'').

G. Porcentaje de células que expresan $Gata3$ y β -gal en la medula espinal E14.5. Se separan los resultados para la zona del manto y la zona ventricular (n=2). Barra de escala 20 μ m.

Ver Tablas 4 y 5 del Anexo I.

***Gata3* y *Gata2* se expresan en la diferenciación de las CSF-cN**

A continuación, se decidió diseccionar el curso temporal de la expresión de $Gata2$ y $Gata3$ durante la especificación de las neuronas del canal central. Con este objetivo, se empleó la estrategia de marcación $Ascl1^{CreER};td\text{-Tomato}$ en combinación con los alelos $Gata2^{GFP}$ o $Gata3^{LacZ}$. Se cuantificó la proporción de células Tomato^+ (derivadas de

progenitores *Ascl1*⁺) expresando cada gen reportero en secciones transversales de médula espinal embrionaria en los estadios E14.0, E14.5, E15.5 y E16.5. Dado que las neuronas *Pkd2l1* presentan un origen dual, se decidió analizar por separado aquellas provenientes del dominio p2-pOL y las producidas en el p3/fp (Figura 9 A).

En primer lugar, las células *Tomato*⁺ p2-pOL a E14.0, 18 horas post-inyección de Tamoxifeno, fueron negativas para GFP y solo un 12% expresó β -gal. En los embriones colectados a E14.5, la expresión de β -gal ascendió al 42%, mientras que el 19% de las células rojas fueron positivas para GFP (Figura 9 B,C,O). Un día después, a E15.5, se encontró un aumento en la proporción de células *Tomato* expresando los genes *Gata*, con un 54% β -gal⁺ y un 38% GFP⁺ (Figura 9 G-J, O). Esta tendencia continuó en la médula E16.5, en la cual se detectó marcación en 60-80% de las células *Tomato*⁺ (Figura 9 O).

En contraste, las células derivadas de progenitores *Ascl1* del dominio ventral p3 mostraron un curso temporal de inducción de *Gata3* y *Gata2* distinto al del p2-pOL. A E14.0 no se detectó presencia de los reporteros *Gata3/2*, mientras que medio día después sólo se observó un número incipiente de células rojas con una u otra proteína *Gata* (2% β -gal⁺, 5% GFP⁺) (Figura 9 D,P). La expresión de GFP aumentó significativamente en los estadios sucesivos, llegando a más del 30% a E15.5 y del 70% a E16.5 (Figura 9 M,N,P). Si bien el porcentaje de células con β -gal también aumentó progresivamente, sólo alcanzó el 10% a E15.5 y el 50% a E16.5 (Figura 9 K, L, P). Estos análisis indican que la proporción de las células p3 *Gata3*⁺ es menor que las que expresan *Gata2*, a diferencia de p2/pOL.

En contraste con la inducción de *Gata3/2* en el curso de la diferenciación, las células *Tomato*⁺ mantienen la presencia robusta de *Nkx6.1* a lo largo de la conversión de los progenitores en neuronas. En ambos casos, casi el total de las células expresa *Nkx6.1* a E14.5, lo cual se mantiene inalterado a E16.5 (Figura 9 E,F,Q,R).

La diferenciación de progenitores *Ascl1*⁺ tardíos en ambas regiones dorso-ventrales comparte la expresión de los factores de transcripción *Nkx6.1* y *Gata3/2*. Mientras que *Nkx6.1* se mantiene constante, *Gata3* y *Gata2* se activan conforme avanza su desarrollo. En las células producidas en los dominios p2-pOL *Gata3* antecede a *Gata2*. En cambio, en las células del linaje *Ascl1* de la región p3 la expresión de estos factores está más

retrasada. Sumado a esto, la expresión de Gata3 en células p3/fp se mantiene por debajo de Gata2. Estas diferencias indican que dependiendo de su origen ontogénico (p2-pOL vs. p3/fp) el programa de diferenciación tiene variaciones en la activación del módulo Gata3/2.

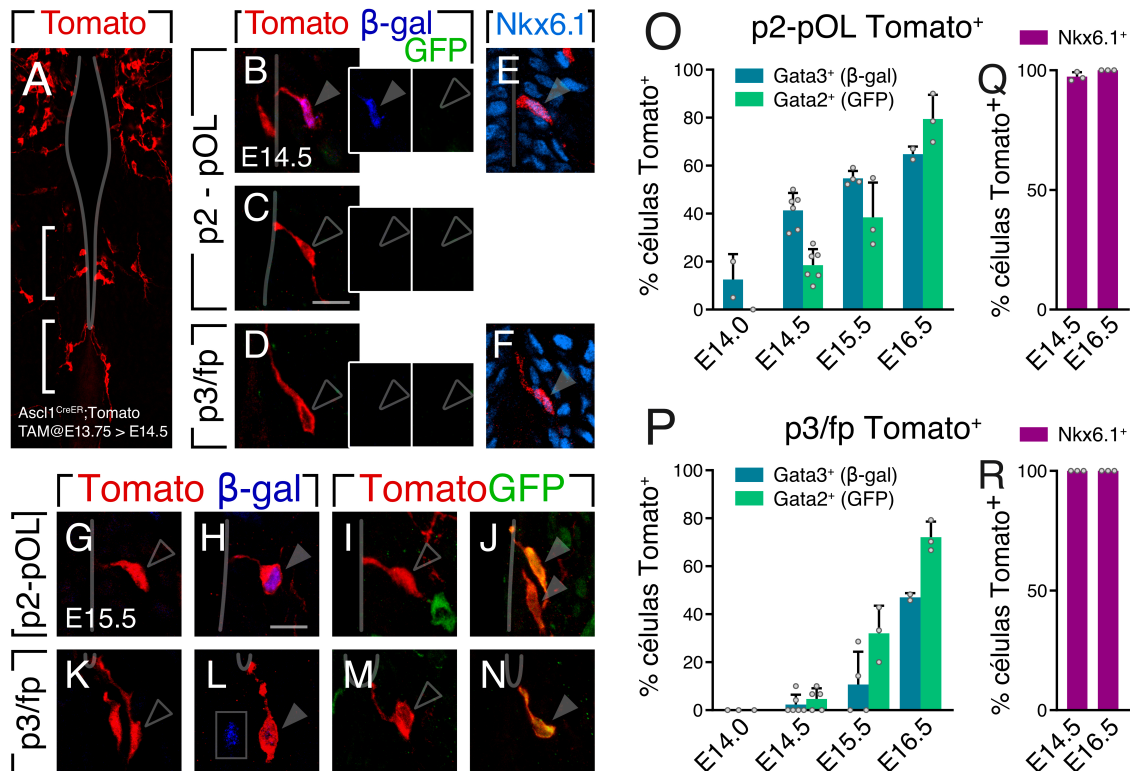


Figura 9. Gata3 y Gata2 se expresan en la diferenciación neuronal en ambos dominios progenitores

A. Sección transversal de médula espinal de ratón *Ascl1^{CreER};td-Tomato* E14.5 (Tamoxifeno a E13.75). La tinción contra Tomato revela células de los dominios progenitores p2-pOL y p3 (corchetes), además de su expresión en zonas dorsales. Barra de escala 10 μ m.

B-D. Expresión de Gata3/2 a través de sus reporteros β -gal (*Gata3^{LacZ}*) y GFP (*Gata2^{GFP}*) en células Tomato⁺ de origen p2-pOL (B,C) y p3 (D) en el estadio E14.5. Barra de escala 10 μ m. Las puntas de flecha llenas o vacías indican presencia o ausencia de GFP o β -gal, respectivamente.

E-F. Las células Tomato⁺ en las regiones p2-pOL y p3 expresan Nkx6.1.

G-N. Expresión de los reporteros en células Tomato⁺ de origen p2-pOL (G-J) y p3 (K-N) E15.5. Barra de escala 10 μ m. Las puntas de flecha llenas o vacías indican presencia o ausencia de GFP o β -gal, respectivamente.

O,P. Cuantificación de Gata3/2 a través de los reporteros genéticos β -gal (Gata3) y GFP (Gata2) en células Tomato⁺ p2-pOL (O) y p3 (P) en los estadios E14.0 (Gata3 n=2, Gata2 n=1), E14.5 (Gata3 n=6, Gata2 n=5), E15.5 (Gata3 n=4, Gata2 n=3) y E16.5 (Gata3 n=2, Gata2 n=3). Las barras son medias +DE. Los círculos son los % en distintos embriones.

Q,R. Porcentaje de la expresión de Nkx6.1 en células Tomato⁺ p2-pOL (Q) y p3/fp (R) a E14.5 (n=3) y E16.5(n=3).

Ver Tablas 6, 7 y 8 del Anexo I.

La secuencia *Gata3/2* distingue la diferenciación entre dominios

Debido a las bajas probabilidades de obtener embriones *Ascl1^{CreER};td-Tomato* con ambos reporteros genéticos *Gata2^{GFP}* y *Gata3^{LacZ}*, se analizó la coexpresión de estos factores de transcripción en animales doble reporteros en ausencia del trazador de linaje *Ascl1*.

A E14.5 y E15.5 se encontró marcación con β -gal y GFP en números consistentes con los resultados mostrados en la Figura 9, y se cuantificó la proporción de células expresando uno o ambos reporteros (Figura 10 A-D). En el dominio p2-pOL E14.5, la mayoría de las células fueron *Gata3*⁺ (~94% del total), de las cuales poco menos de la mitad reportó también *Gata2* (*GFP*⁺ 41%, Figura 10 G). Un día después, a E15.5, el porcentaje de células que sólo expresa *Gata3* se redujo al 33% mientras que el porcentaje *Gata2*⁺,*Gata3*⁺ aumentó al 60% (Figura 10 B,G).

En contraste, en la región p3/fp la expresión de *Gata3* siempre estuvo acompañada por *Gata2*, representando alrededor del 50% a E14.5 y el 60% a E15.5. El porcentaje restante de la población está compuesto únicamente por células expresando *Gata2* (Figura 10 C,D,H). Debe señalarse que se muestran los porcentajes de células expresando uno o ambos reporteros génicos, en vez del número absoluto de células.

Estos resultados confirman que los dominios p2-pOL y p3/fp presentan diferencias en la temporalidad de inducción y en el orden de activación de los genes *Gata*. En la diferenciación del *cluster* “dorsal” (p2-pOL), *Gata3* precede a *Gata2*, y luego se inicia la expresión de *Gata2*, que se mantiene hasta estadios postnatales (ver más adelante).

Para la diferenciación de las células del dominio p3 encontramos que la secuencia de activación es diferente. Tanto a E14.5 como a E15.5 hay aproximadamente un 50% que sólo expresa *Gata2*, mientras que el resto es β -gal⁺*GFP*⁺. Estos análisis sugieren que en la trayectoria de especificación de las neuronas del extremo ventral, la expresión de *Gata3* es posterior a la de *Gata2* (Figura 9-10), aunque resulta posible que la activación de *Gata3* sea simultánea con *Gata2* debido al retraso en la detección del reportero nuclear β -gal (Figura 8 F,G).

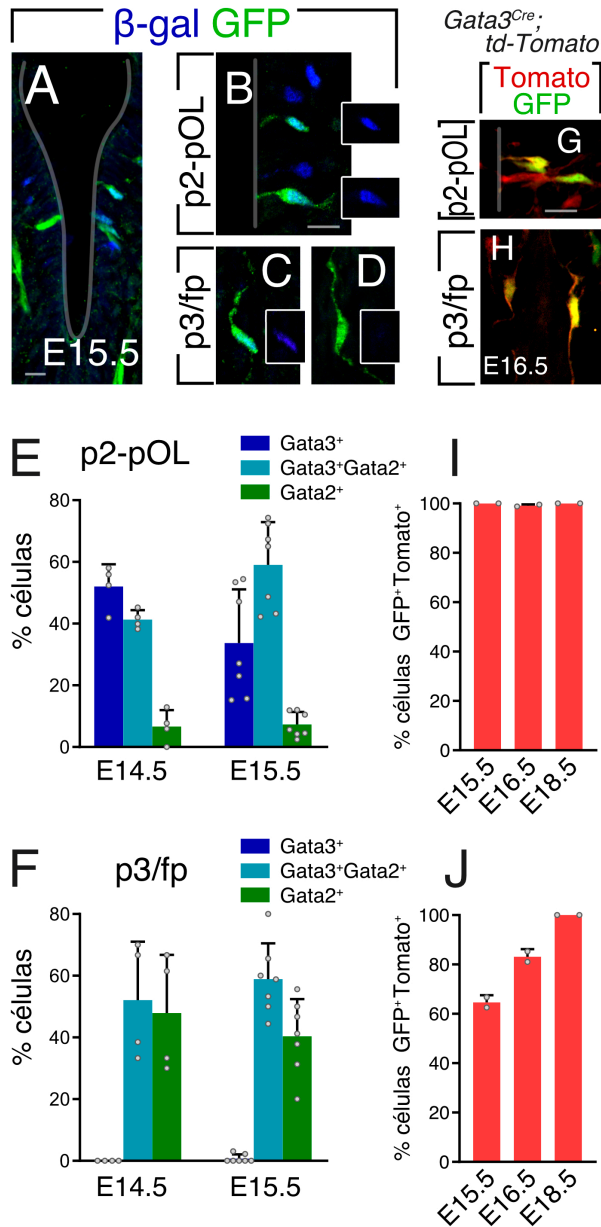


Figura 10. Los programas de especificación p2-pOL y p3/fp difieren en la temporalidad de activación de Gata3/2.

A-D. Expresión de GFP y β -gal en los dominios p2-pOL (B) y p3/fp (C,D) de la médula E15.5 $Gata2^{GFP};Gata3^{LacZ}$. Barra de Escala 10 μ m.

E,F. Porcentaje de células en p2-pOL (G) y p3 (H) según la expresión de GFP (Gata2) y β -gal (Gata3). Las barras son medias +DE. Los puntos son los % en cada embrión (E14.5 n=4; E15.5 n=7).

G,H. Expresión de $Gata2^{GFP}$ y Tomato en células p2-pOL (G) y p3 (H) en tejido espinal $Gata3^{Cre};td-Tomato;Gata2^{GFP}$ E15.5 Barra de escala 10 μ m.

I,J. Proporción de células GFP+ p2-pOL (I) y p3/fp (J) que expresan Tomato en animales $Gata3^{Cre};td-Tomato;Gata2^{GFP}$. Las barras son medias +DE. Los puntos son los % en cada embrión (n=2 en cada estadio).

Ver Tablas 9 y 10 del Anexo I.

Con el fin de verificar estos resultados y determinar si los programas de diferenciación de las neuronas del canal central incluyen siempre a Gata3, se utilizó la línea de ratones $Gata3^{Cre}$ en combinación con el reportero condicional $td-Tomato$ y el alelo $Gata2^{GFP}$. En este sistema, la actividad de Cre marca las células Gata3 de forma permanente, aún cuando su expresión sea transitoria. Se analizó la presencia de Tomato en las células GFP+ a E15.5, E16.5 y E18.5, y se determinó que la totalidad de las células GFP+ en la región p2-pOL son positivas para Tomato en los tres estadios (Figura 10 I). Para las células GFP+ en p3 se encontró que a E15.5 sólo un 65% de las mismas expresaba

Tomato, proporción que aumentó al 83% a E16.5, para alcanzar el 100% a E18.5 (Figura 10 J).

Estos resultados indican que ambos subgrupos expresan el factor de transcripción Gata3 en algún momento de su diferenciación. Este experimento corrobora la secuencia de activación de Gata3 y Gata2 deducida en los ensayos anteriores. La presencia de Tomato en todas las células GFP de la región p2-pOL es coherente con la progresión Gata3⁺ hacia Gata3⁺Gata2⁺ en el subgrupo dorsal (Figura 9 O, Figura 10 G). En el dominio tardío p3/fp se encontró que la proporción de células GFP⁺ que expresa Tomato aumenta progresivamente (Figura 9, Figura 10 H, J), lo cual sugiere que Gata3 se activa luego que Gata2. De forma similar a los experimentos con el reportero β -gal, la estrategia de marcación genética con *Gata3^{Cre}* presenta potencialmente un retraso, debido a la eliminación del cassette STOP por la recombinasa y la subsecuente acumulación de la proteína roja. Teniendo en cuenta estas limitaciones, existe la posibilidad de que la activación de Gata3 tenga lugar de forma más o menos simultánea a la de Gata2.

La expresión de Pkd2l1 define la fase final de la diferenciación

Los experimentos presentados más arriba demuestran que las neuronas del canal central de la médula espinal expresan los factores de transcripción Gata3 y Gata2 durante su diferenciación. Estas neuronas se caracterizan por la expresión del canal catiónico Pkd2l1 el cual, en la médula espinal, marca exclusivamente las CSF-cN (Djenoune et al., 2014; Huang et al., 2006; Orts-Del'Immagine et al., 2014; Petracca et al., 2016). Para determinar la temporalidad de Pkd2l1 respecto a los factores Gata3 y Gata2, se obtuvo tejido embrionario *Gata2^{GFP};Gata3^{LacZ}* y se evaluó la expresión de los tres marcadores (Figura 11).

En primer lugar, se comparó la expresión de Pkd2l1 y Gata2. Tanto para las células de origen p2-pOL como p3/fp, se observó que a E14.5 aproximadamente la mitad de las células GFP⁺ aún no expresan Pkd2l1 (66% p2-pOL, 52% p3/fp, Figura 11 I,J). Esta proporción disminuye un día después (15% p2-pOL, 30% p3/fp, Figura 11 I,J) cuando la mayoría de las células son positivas para GFP y para Pkd2l1 (84% p2-pOL, 70% p3/fp,

Figura 11 I,J). Esta observación implica que Gata2 antecede a Pkd2l1, el cual refleja la fase más avanzada de la diferenciación neuronal.

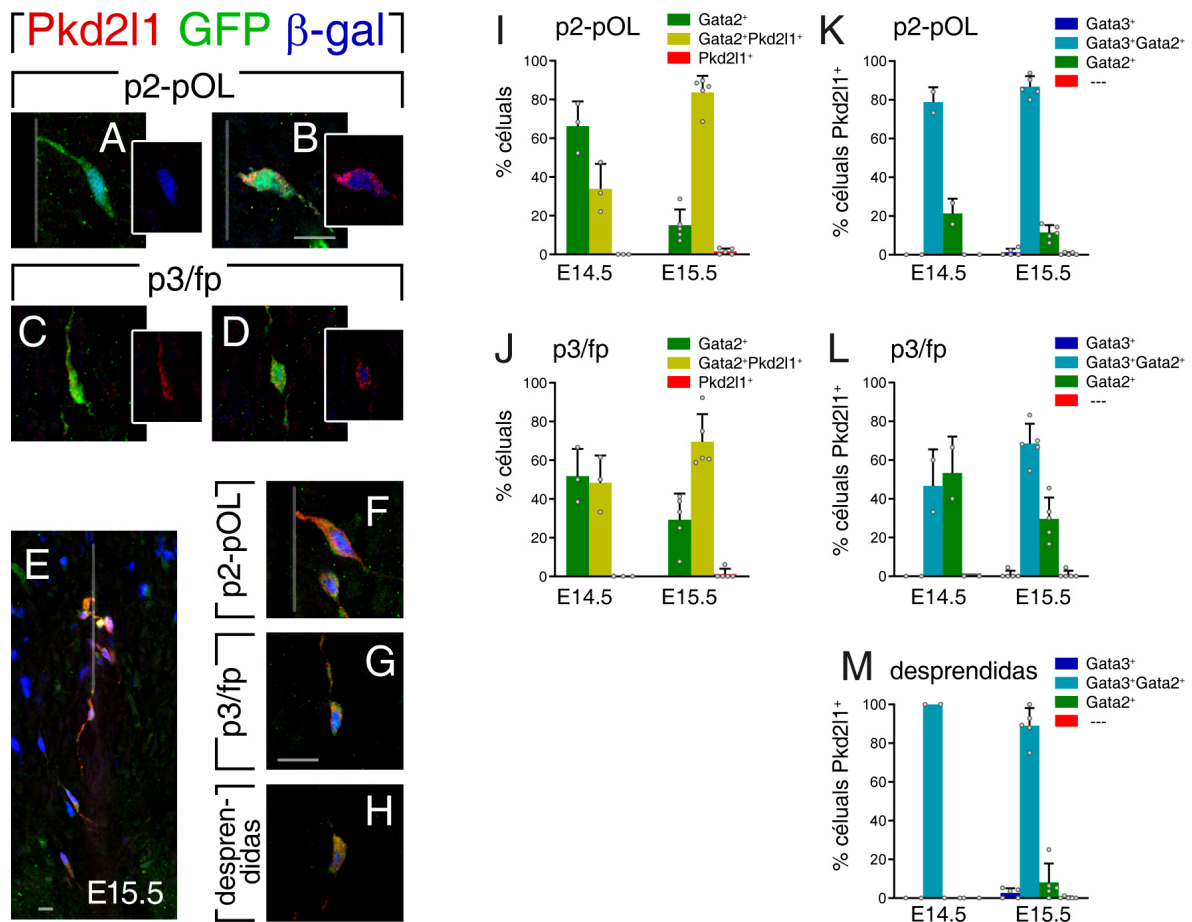


Figura 11. La activación de Pkd2l1 es posterior a la de Gata3 y Gata2 .

A-H. Tinciones contra Pkd2l1, GFP y β-gal en células de origen p2-pOL (A,B,F), p3 (C,D,G) y desprendidas (H) en médula espinal de ratones *Gata2*^{GFP}, *Gata3*^{LacZ} E14.5 (A-D) y E15.5 (E-H). Barra de escala 10 μm.

I-J. Porcentaje de las células p2-pOL (I) y p3 (J) que expresan Gata2-GFP y Pkd2l1. Las barras son medias +DE y los círculos son los % en cada embrión (E14.5 n=3 y E15.5 n=5).

K-M. Expresión de Gata2-GFP y Gata3-βgal en células Pkd2l1⁺ p2-pOL (K), p3 (L) y desprendidas (M) en la médula espinal embrionaria de ratón. Las barras son medias +DE y los círculos son los % en cada embrión (E14.5 n=3 y E15.5 n=5).

Ver Tablas 11 y 12 del Anexo I.

Para finalizar se analizó la expresión de β-gal y GFP en las células Pkd2l1⁺ (Figura 11 A-D, E-H). Se observó que la amplia mayoría de neuronas Pkd2l1⁺ de las paredes laterales del ventrículo presenta β-gal y GFP a E14.5 y E15.5 (78% E14.5, 87% E15.5) (Figura 11 K). La porción restante está compuesta principalmente por células Pkd2l1⁺GFP⁺ que no expresan β-gal (21% E14.5, 11% E15.5, Figura 11 K). Considerando que los resultados

previos muestran que la activación de Gata2 es posterior a la de Gata3, esto indica la inactivación de Gata3 en estas células.

De forma similar, para las neuronas Pkd2l1⁺ de origen p3 se vio que a E14.5 el 47% de las células Pkd2l1⁺ expresa tanto GFP como β -gal, mientras que el 53% restante es GFP⁺, β -gal⁻ (Figura 11 L). A E15.5 la proporción de células Pkd2l1⁺, GFP⁺, β -gal⁺ aumenta al 70% (Figura 11 L), lo cual está en acuerdo con la activación tardía de Gata3 descrita en los experimentos presentados más arriba para este grupo (Figura 9, 10).

Finalmente, al realizar estos ensayos encontramos algunas células Pkd2l1⁺ desprendidas de su característico anclaje apical, siendo casi la totalidad de las mismas β -gal⁺, GFP⁺ (Figura 11 H, M). Estos subgrupos serán analizados más adelante en la tesis. En los experimentos anteriores no fue posible reconocer estas células dado que, a diferencia de Pkd2l1, los factores Gata2 y Gata3 se expresan también en las interneuronas V2b de la zona del manto.

Los progenitores p2-pOL y p3 siguen distintos programas de diferenciación

A partir de los estudios del linaje de progenitores Ascl1⁺ se dedujo la secuencia de activación de los genes Gata3/2, lo cual se ha plasmado esquemáticamente en el modelo (Figura 12). Los resultados obtenidos indican que las células que derivan de progenitores Ascl1⁺ del dominio p2-pOL expresan primero Gata3 en las etapas postmitóticas tempranas, al cual luego se suma Gata2. En contraste, las células derivadas de progenitores p3/fp coactivan los factores Gata3 y Gata2, o bien Gata2 se activa antes que Gata3, en un estadio posterior. Pese a estas disparidades temporales, ambos programas de especificación culminan con la activación de Pkd2l1, proteína característica de este tipo neuronal. Finalmente, las diferencias observadas entre las células de origen p2-pOL y p3/fp indican variaciones en el programa de diferenciación celular de forma específica para cada dominio progenitor.

Considerando el esquema general de expresión de factores de transcripción durante la diferenciación de las neuronas Pkd2l1⁺ planteado en la Figura 12, se decidió estudiar algunos pasos de la secuencia de regulación génica mediante el análisis de mutantes.

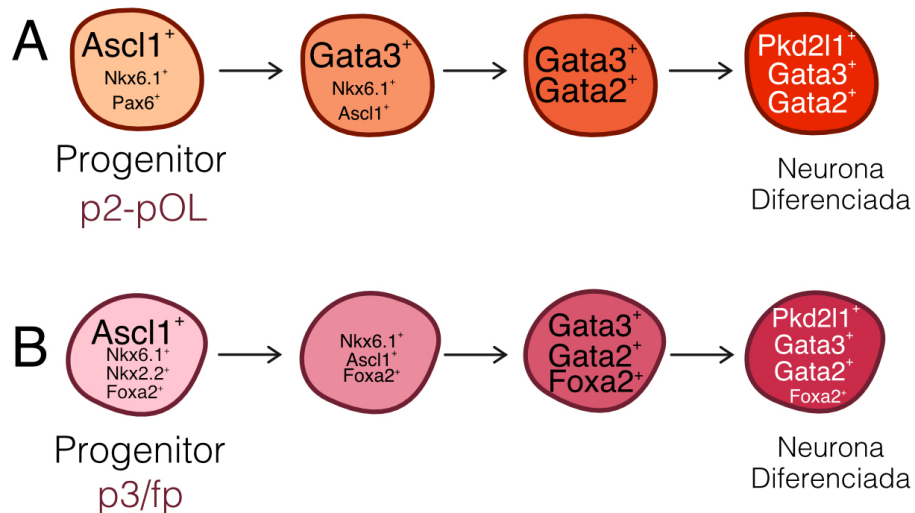


Figura 12. Esquema de la diferenciación de neuronas Pkd2l1⁺.

A. Los progenitores p2-pOL se caracterizan por las proteínas de patrón Nkx6.1 y Pax6, y la proteína proneural Ascl1. El primer paso de la diferenciación consiste en la activación de Gata3, a la que se suma Gata2 en un estadio posterior. Finalmente se expresa Pkd2l1 como marcador del estadio ‘terminal’ de la diferenciación.

B. Los progenitores p3/fp se caracterizan por las proteínas de *patterning* Nkx6.1, Nkx2.2 y Foxa2, y expresan también Ascl1. En este camino de diferenciación se coactiva Gata3 y Gata2 aproximadamente en la misma fase, y culmina con la expresión de Pkd2l1. Nótese que la coactivación de Gata3/2 (o Gata2 antecedendo a Gata3) en la diferenciación p3/fp ocurre en un estadio temporal posterior a la activación de Gata 3 en las p2-pOL.

En primer lugar, la diferenciación p2-pOL como p3/fp parte de progenitores con el factor proneural Ascl1. Los experimentos de rastreo de linaje en ratones *Ascl1^{CreER};td-Tomato* muestran que los factores Gata3/2 y Pkd2l1 son activados en células Tomato⁺, lo que implica que Ascl1 se encuentra río arriba de estas proteínas. Para verificar la dependencia genética, se analizó la expresión de Gata3 (a través del reportero *Gata3^{LacZ}*) y de Pkd2l1 en embriones *Ascl1^{-/-}*. Se analizó la cantidad de células β-gal⁺ en la región ventricular p2-pOL en el estadio E14.5, observándose una reducción significativa (Figura 13 A-C). Sumado a esto se encontró una disminución significativa en el número de neuronas Pkd2l1⁺ a E15.5 (Figura 13 D-F). Estos resultados indican que la actividad de Ascl1 es necesaria para la activación tanto de Gata3 como de Pkd2l1, lo cual está de acuerdo con la función crítica de Ascl1 en la neurogénesis tardía de las CSF-cN (Di Bella et al., 2019). A su vez, esto aporta relevancia funcional al modelo de la Figura 12, siendo que Ascl1 controla la activación de Gata3, y luego de Pkd2l1, determinando la diferenciación de las neuronas del canal central.

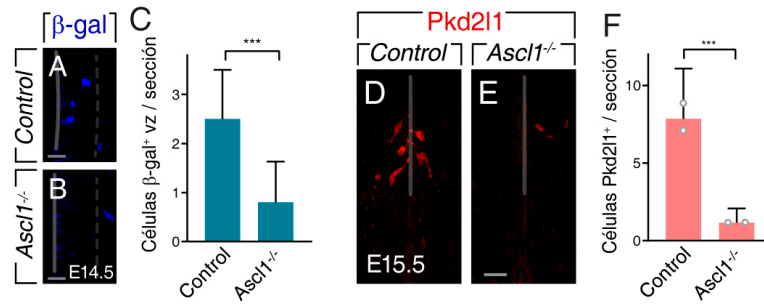


Figura 13. Ascl1 se expresa río arriba de Gata3 y Pkd2l1 en la diferenciación de las neuronas Pkd2l1.

A-B. Imágenes de la zona ventricular p2-pOL de secciones transversales de médula espinal de animales *control* y *Ascl1*^{-/-} E14.5 conteniendo el alelo *Gata3*^{LacZ} teñidas contra β-gal. Barra de escala 10 μm.

C. Número de células β-gal⁺ en la zona ventricular control y *Ascl1*^{-/-} E14.5; *** p<0.001 (Prueba de Mann-Whitney). Las barras son media+DE (20 secciones).

D-E. Secciones transversales de médula espinal E15.5 control y *Ascl1* mutante teñidas contra Pkd2l1. Barra de escala 20 μm.

F. Número total de células Pkd2l1⁺ por sección en ratones E15.5 control y *Ascl1* mutante; *** p<0.001 (Prueba de Mann-Whitney). Las barras son media+DE (60 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=2).

En la secuencia de activación propuesta arriba, *Gata3* se activa río abajo de *Ascl1* en un estadio temprano de la diferenciación postmitótica. Con el fin de confirmar que *Gata3* no tiene efecto sobre el establecimiento de las identidades progenitoras así como sobre la expresión de *Ascl1*, se analizó la presencia de estas proteínas en mutantes de *Gata3* condicionales al sistema nervioso. Se generó tejido *Nes:Cre;Gata3*^{LacZ/flox} (*Gata3-cKO*) E13.5, donde el deletor *Nes:Cre* restringe la eliminación de *Gata3* al tejido neural.

Los ratones *Gata3-cKO* no presentaron diferencias en la expresión de *Ascl1* en la zona ventricular ventral respecto al control (Figura 14 A-C), en línea con la ubicación de *Gata3* genéticamente río abajo de *Ascl1*. Tampoco se encontraron alteraciones en los territorios *Nkx6.1*, *Pax6* y *Foxa2* donde se originan las neuronas Pkd2l1⁺ (Figura 14 D-H).

Los experimentos de linaje en ratones *Ascl1*^{CreER};*td-Tomato* evidenciaron diferencias en la temporalidad relativa de activación de los factores *Gata3/2* entre ambas fuentes progenitoras. Para estudiar diferencias de jerarquía entre *Gata3* y *Gata2*, se analizó la expresión de *Gata2* a través de su reportero *Gata2*^{GFP} en mutantes *Gata3-cKO* E15. Se observó que la región p2-pOL carece de células GFP⁺, mientras que las células p3 no se ven afectadas (Figura 15 A-C). Por lo tanto, en las células p2-pOL *Gata3* precede e induce a *Gata2*, consistente con las observaciones anteriores y el modelo propuesto. En

cambio, en el dominio p3, donde ambos factores se coactivan o Gata2 antecede a Gata3, la expresión de Gata2 es independiente de Gata3 lo cual apunta a mecanismos independientes de regulación génica.

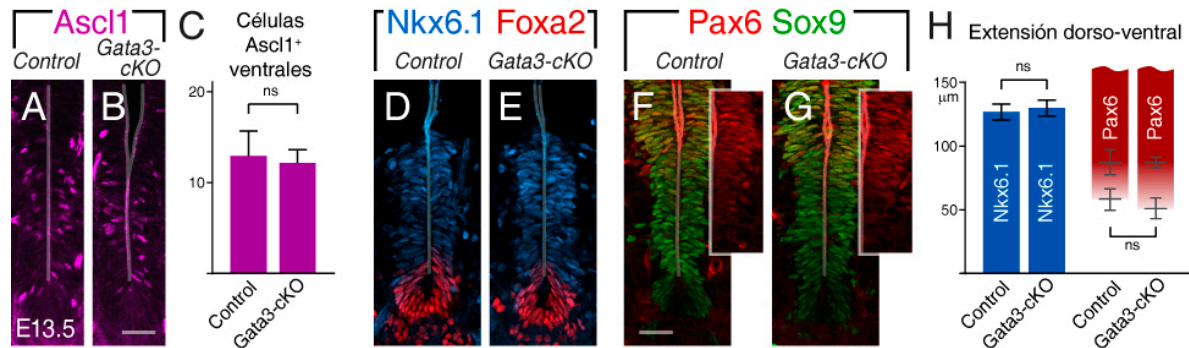


Figura 14 La eliminación de Gata3 no afecta el patterning dorso-ventral ni la expresión de Ascl1

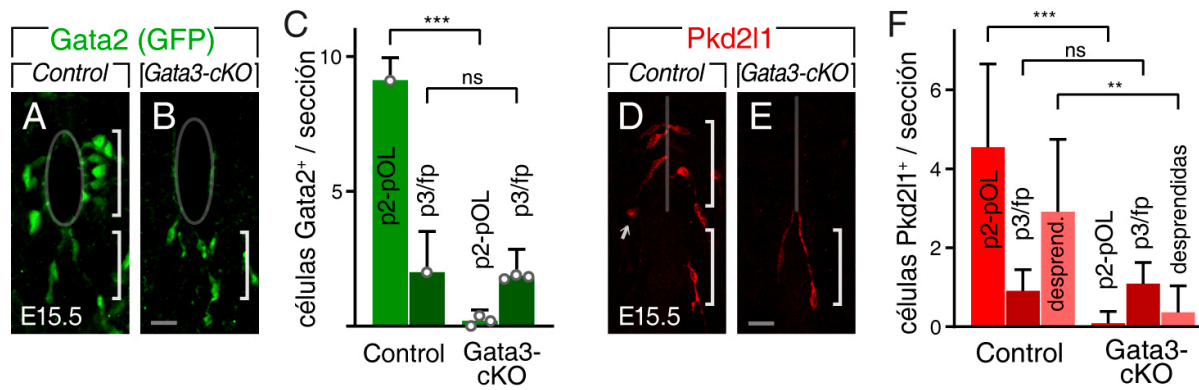
A,B. Tinciones contra Ascl1 en la zona ventricular ventral E13.5 en secciones transversales de tejido de médula espinal Control y *Gata3-cKO* (*Nestin^{Cre};Gata3^{LacZ/Flox}*). Barra de escala 30µm.

C. Número de progenitores Ascl1⁺ por sección transversal de médula espinal de embriones Control y *Gata3-cKO* E13.5. ns= no significativo (Mann-Whitney Test, n=10 secciones)

D-G. Secciones transversales de médula espinal E13.5 teñidas contra las proteínas de Nkx6.1 y Foxa2 (D-E) y Pax6 y Sox9 (F-G) de embriones Control y *Gata3-cKO*. Barra de escala 30 µm.

H. Extensión del territorio Nkx6.1⁺ y Pax6⁺ en tejido Control y *Gata3-cKO*. ns= no significativo (Mann-Whitney Test, n=7 secciones).

Al evaluar la expresión de Pkd2l1 en el tejido *Gata3-cKO* E15.5, se vio también una reducción significativa en el número de neuronas Pkd2l1⁺ en la región p2-pOL pero no en el dominio p3/fp (Figura 15 D-F). En este caso se pudo evaluar también el efecto sobre las células desprendidas del canal central, las cuales se vieron reducidas en ausencia de Gata3 (Figura 15 F, ver más adelante). Esto demuestra que Gata3 cumple un rol esencial en la diferenciación de las neuronas dorsolaterales al canal central, el cual será analizado en profundidad en secciones posteriores de la tesis; pero no en las de origen p3. Esta diferencia en la dependencia de Gata3 refleja variaciones en los programas de diferenciación.



De manera análoga a los análisis de *Gata3*, se estudió el impacto de la ausencia de *Gata2* sobre la especificación de las CSF-cN mediante ratones *Gata2-cKO* (*Nes:Cre;Gata2^{GFP/flox}*). Los resultados anteriores ubican el encendido de *Gata2* dentro de las etapas finales de la diferenciación neuronal, por lo que se evaluó la expresión de *Gata3* (vía *Gata3^{LacZ}*), que se encontraría río arriba de *Gata2*. De acuerdo con esto, la eliminación de *Gata2* no causó alteraciones en la expresión de *Gata3* en la zona ventricular p2-pOL a E15.5 (Figura 16 A-C), lo que sustenta que *Gata2* se encuentra río abajo de *Gata3* en la diferenciación de las neuronas en p2-pOL. Los roles que el tandem *Gata3/2* juega en la especificación global de las neuronas *Pkd211⁺* serán analizados en mayor profundidad en secciones posteriores.

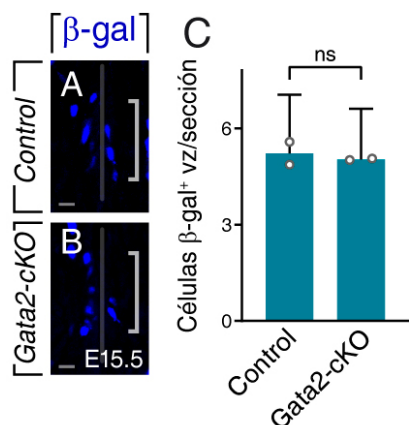


Figura 16. La eliminación de Gata2 no afecta la expresión de Gata3 en la región p2-pOL

A-B. Imágenes de la zona ventricular p2-pOL de secciones transversales de médula espinal de animales Control y *Gata2-cKO* E15.5 conteniendo el alelo *Gata3^{LacZ}* teñidas contra β -gal. Barra de escala 10 μ m.

C. Número de células β -gal⁺ en la zona ventricular p2-pOL Control y *Gata2-cKO* E15.5; ns=no significativo (Prueba de Mann-Whitney). Las barras son media+DE (30 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=2).

CLUSTERS DE NEURONAS DEL CANAL CENTRAL

Las neuronas Pkd2l1⁺ se dividen en cuatro subgrupos

En la médula espinal del ratón, el canal iónico Pkd2l1 se expresa exclusivamente en las neuronas en contacto con el líquido cefalorraquídeo, lo cual permite la identificación de este tipo celular desde su nacimiento y a lo largo de la vida del animal (Djenoune et al., 2014; Huang et al., 2006; Petracca et al., 2016). Como se reportó en la sección anterior, las neuronas Pkd2l1⁺ se originan de dos conjuntos de progenitores ventriculares ventrales: los dominios p2-pOL y la región p3 en la frontera con la placa del piso (p3/fp). En el ratón, así como en el pez cebra, las neuronas del canal central con distinto origen tienen características diferentes en su morfología, ubicación anatómica y propiedades fisiológicas (Djenoune et al., 2017 ; Petracca et al., 2016). Las neuronas producidas en la región p2-pOL y asentadas en la zona endimaria lateral han sido denominadas CSF-cN', mientras que las derivadas de progenitores del extremo p3 y ubicación postnatal ventral al canal central han sido llamadas CSF-cN''.

La amplia mayoría de los trabajos previos estuvieron enfocados exclusivamente en el estudio de las células Pkd2l1⁺ que rodean el canal central. Sin embargo, las tinciones contra Pkd2l1 en secciones transversales de médula espinal en estadios perinatales (E18.5 o P0) reconocen también células Pkd2l1⁺ claramente separadas de la apertura ventricular (Figura 17A). A diferencia de las dos poblaciones del canal central, estas

células carecen del contacto apical característico y se encuentran distales al canal central.

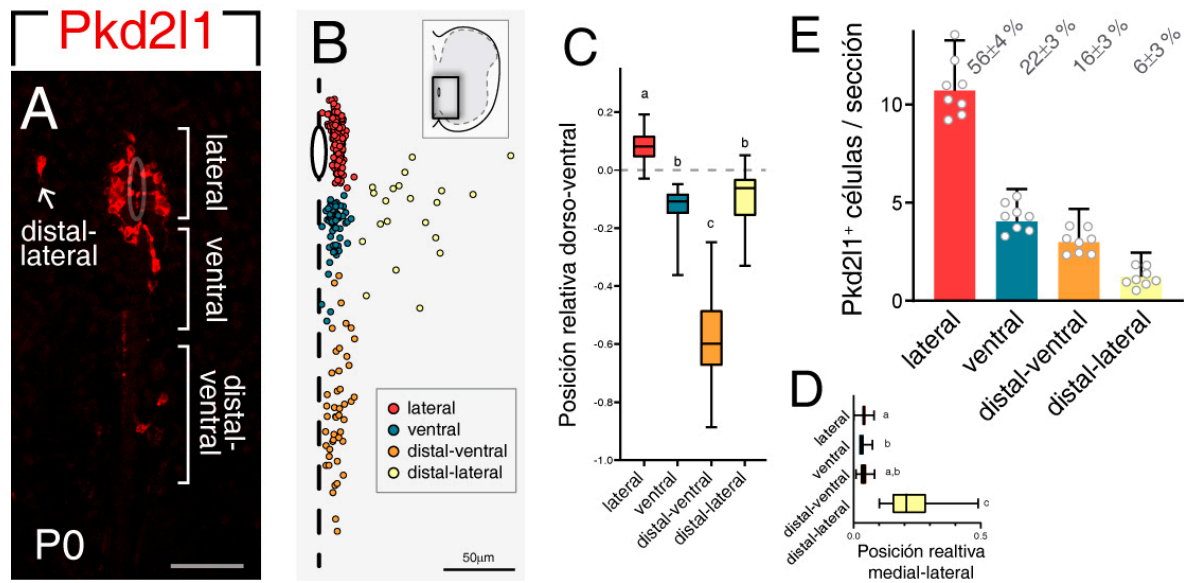


Figura 17. Las neuronas Pkd2l1⁺ de la médula espinal perinatal de ratón se clasifican en cuatro grupos.

A. Corte transversal de médula espinal de ratón P0 teñido contra Pkd2l1. Se indican las poblaciones Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal Lateral. Barra de escala 50 μ m.

B. Mapa de la localización de las neuronas Pkd2l1⁺ en la médula de ratones neonatos. En el esquema se representa la posición de 310 células clasificadas en las poblaciones Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral. Las células Pkd2l1⁺ Lateral (rojo) se ubican bordeando el canal central, las de la población Ventral (azul) próxima al extremo ventral del canal, las Distal-Ventral (naranja) en la región más ventral cerca del surco, y las Distal-Lateral (amarillo) dispersas en el parénquima espinal.

C. Posición relativa en el eje dorso-ventral de los cuatro grupos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn). La posición está relativizada al extremo ventral del canal central ($y=0$) y al surco ventral espinal ($y=-1$). Las líneas punteadas indican la ubicación del canal central (cc). El diagrama de caja muestra la mediana y los cuartiles de los datos y los bigotes indican los máximos y mínimos.

D. Ubicación relativa de las células Pkd2l1⁺ en el eje medial-lateral. Letras indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.01$, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn).

E. Cantidad de neuronas Pkd2l1⁺ por sección. Las barras son media+DE (166 secciones). Cada círculo indica el promedio de un individuo ($n=8$).

Para caracterizarlas en mayor detalle, se determinó la posición de cada célula Pkd2l1⁺, y se mapeó su ubicación utilizando como referencias el extremo ventral del canal central, el surco ventral y la línea media (Figura 17 A,B). El mapa obtenido ilustra la presencia de cuatro subgrupos de células Pkd2l1⁺, dos de las cuales son las CSF-cN' y CSF-cN". En base a su localización anatómica en la médula espinal perinatal, decidimos denominar los subgrupos como Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral.

En primer lugar, la mayoría de las neuronas Pkd2l1⁺ (56±4 %) tienen las características clásicas de las CSF-cN' (Figura 17 A,B,E, rojo). Estas células denominadas en adelante como subgrupo 'Lateral' se encuentran dentro de la capa endimaria de las paredes laterales del canal central (Figura 17 A,B, Figura 18 A,B), hacia donde extienden su prominente proceso apical en contacto con el líquido cefalorraquídeo (Figura 18 A,B). El asentamiento de los somas bordeando el canal central (Figura 17 B, círculos rojos) se ve reflejado en su posición dorso-ventral y medio-lateral (Figura 17 C,D). Estas neuronas en la zona endimaria orientan sus cuerpos celulares casi perpendicularmente respecto al eje dorso-ventral (Figura 18 A,B).

En segundo lugar, las neuronas del subgrupo 'Ventral' se corresponden con las células previamente referidas como CSF-cN" y constituyen el 22±3 % del total de las células Pkd2l1⁺ (Figura 17 E, azul). Estas neuronas también mantienen el contacto apical con el canal central pero, a diferencia del subgrupo Lateral, disponen sus somas más alejados (35±19 µm) (Figura 17 A,B,C, azul), alineados con la línea media ventral (9±4 µm) (Figura 17 B,D), y presentando una polaridad en el eje dorso-ventral (Figura 18 C,D). Estas neuronas pueden encontrarse agrupadas, en algunas ocasiones en ramilletes, y proyectan su extensión axonal basal hacia el borde ventral de la médula (Figura 18 C,D).

Las células Pkd2l1⁺ desprendidas del canal central pueblan dos regiones diferentes de la médula neonatal. Por un lado, las neuronas de la población 'Distal-Lateral' se ubican hacia los laterales del parénquima espinal (27-65 µm, Figura 17 B,D) a la altura del canal central y son la población menos numerosa (6±3 %, Figura 17 E, amarillo).

Finalmente, el subgrupo identificado como 'Distal-Ventral' se caracteriza por su asentamiento en la porción más ventral de la médula espinal (170±42 µm, Figura 17 A,B naranja) cerca de la línea media (11±6 µm, Figura 17 C) y representa el 16±3 % del total (Figura 17 E, naranja). Si bien su ubicación se solapa parcialmente con el *cluster* Ventral, se distinguen por la ausencia de una extensión apical de anclaje al canal, así como por la orientación de sus somas, siendo estas características utilizadas como criterio de clasificación. Generalmente estas células se encuentran en pequeños grupos de células, con sus somas en diagonal o casi perpendiculares a la línea media. Además, se

observó que las células Distal-Ventral presentan en general menor inmunorreactividad contra Pkd2l1⁺ (Figura 17 A).

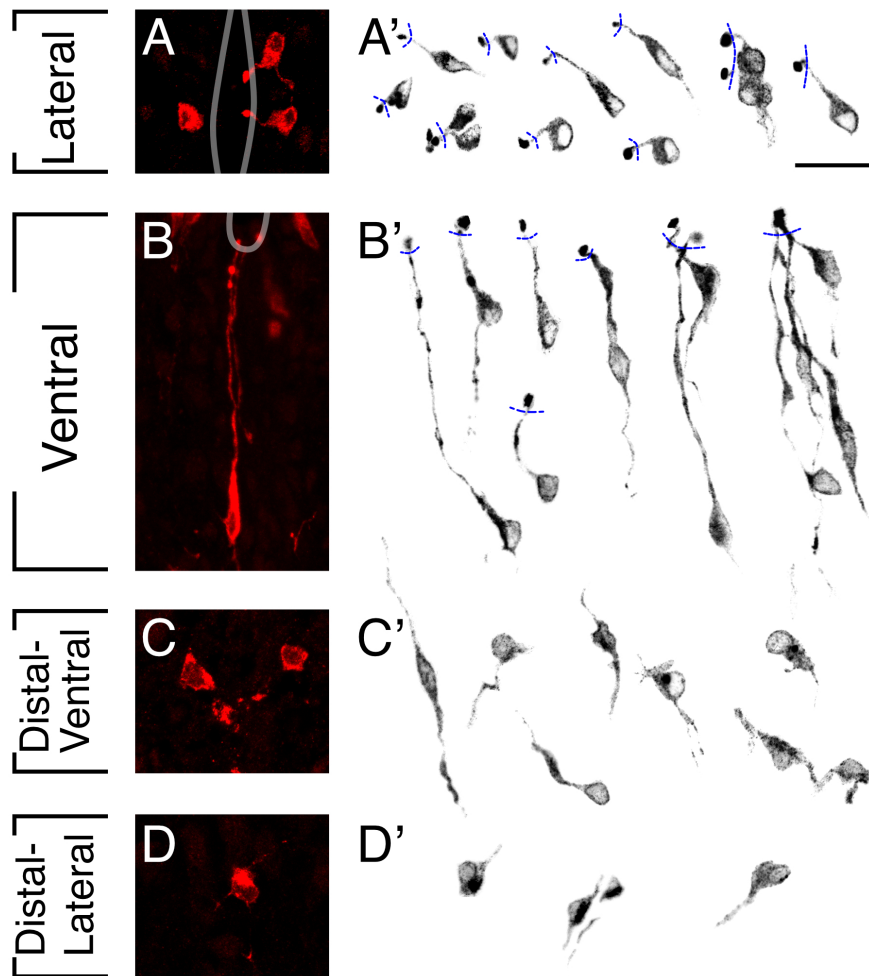


Figura 18. Cada grupo de neuronas Pkd2l1⁺ presenta una morfología característica

A-H. Ejemplos de morfologías celulares de neuronas Pkd2l1⁺ Lateral (A,B), Ventral (C,D), Distal-Ventral (E,F) y Distal-Lateral (G,H) obtenidas de secciones transversales de tejido espinal perinatal E18.5 y P0 teñidas contra Pkd2l1. Las imágenes en E-H fueron invertidas para facilitar la observación de la morfología. Se marca el canal central espinal en blanco (A,C) y con una línea punteada azul (B-H). Escala 20 μ m.

Los cuatro subgrupos comparten un perfil molecular

Trabajos previos habían indicado que los *clusters* Lateral y Ventral tienen en común una serie de factores de transcripción asociados a su origen ventral e identidad neural (Djenoune et al., 2014; Park et al., 2004; Petracca et al., 2016; Schafer et al., 2007; Yang et al., 2010). Con el fin de verificar si la expresión de estos marcadores es compartida

con los subgrupos distales, se tiñó tejido espinal contra Pkd2l1 y diferentes proteínas en los estadios E18.5 o P0.

El determinante ventral Nkx6.1 se expresa en la totalidad de las células de los cuatro grupos (99-100%; Figura 19 A, I, P-S). También se encontró la presencia de los factores de transcripción Sox2 y Gata2 (observado a través del alelo *Gata2^{GFP}*) en todas las células Pkd2l1⁺ (99.3% para Sox2, 99.9% para Gata2-GFP; Figura 19 B,C) sin diferencias entre grupos (Figura 19 J,K,P-S).

Al estudiar la expresión de Gata3, a través del transgen reportero *Gata3^{LacZ}*, se observó que aproximadamente el 80% de las células Pkd2l1⁺ es positivo para β-gal (Figura 19 D,H), proporción que está en línea con los experimentos en el embrión (Figura 11 K-M). Se encontró asimismo que todas las subpoblaciones presentan proporciones similares de Gata3 (Figura 19 L,P-S). Se analizó también la expresión de proteínas que habían sido consideradas ausentes o presentes en bajos niveles en las CSF-cN (Di Bella et al., 2019). Se inspeccionaron los factores de transcripción Foxj1, característico de las células endimarias ciliadas, y Sox9, distintivo de endimocitos y células astrocíticas, ambos clásicamente asociados a una identidad no-neuronal. El 81% de las células Pkd2l1⁺ fue negativo para Sox9, mientras que las restantes presentaron bajos niveles (Sox9^{bajo}) en comparación con las células endimarias circundantes, siendo esta proporción comparable entre los grupos (Figura 19 N,P-S). De forma similar, se encontró cierta inmunoreactividad contra Foxj1 en el 66% de las células Pkd2l1⁺, donde la mayoría fue a niveles bajos. Todos los subgrupos manifestaron esta característica, aunque algunas del subgrupo lateral mostraron niveles similares a los de células endimarias ciliadas (Figura 19 M,P-S).

Finalmente, las CSF-cN presentan una serie de características de neuronas inmaduras (Di Bella et al., 2019; Hubbard et al., 2016; Kutna et al., 2014; Prendergast et al., 2023), entre las cuales se encuentra la expresión baja o nula del marcador neuronal clásico NeuN. Se observó presencia de NeuN solo a bajos niveles y en menos del 50% (Figura 10 G,H). Estas neuronas NeuN^{bajo} se encuentran distribuidas entre los cuatro grupos (Figura 10 O-S). Las células NeuN^{alto} solo fueron encontradas en los dos *clusters* distales (8-9%), lo que podría indicar una maduración neuronal mayor o más acelerada.

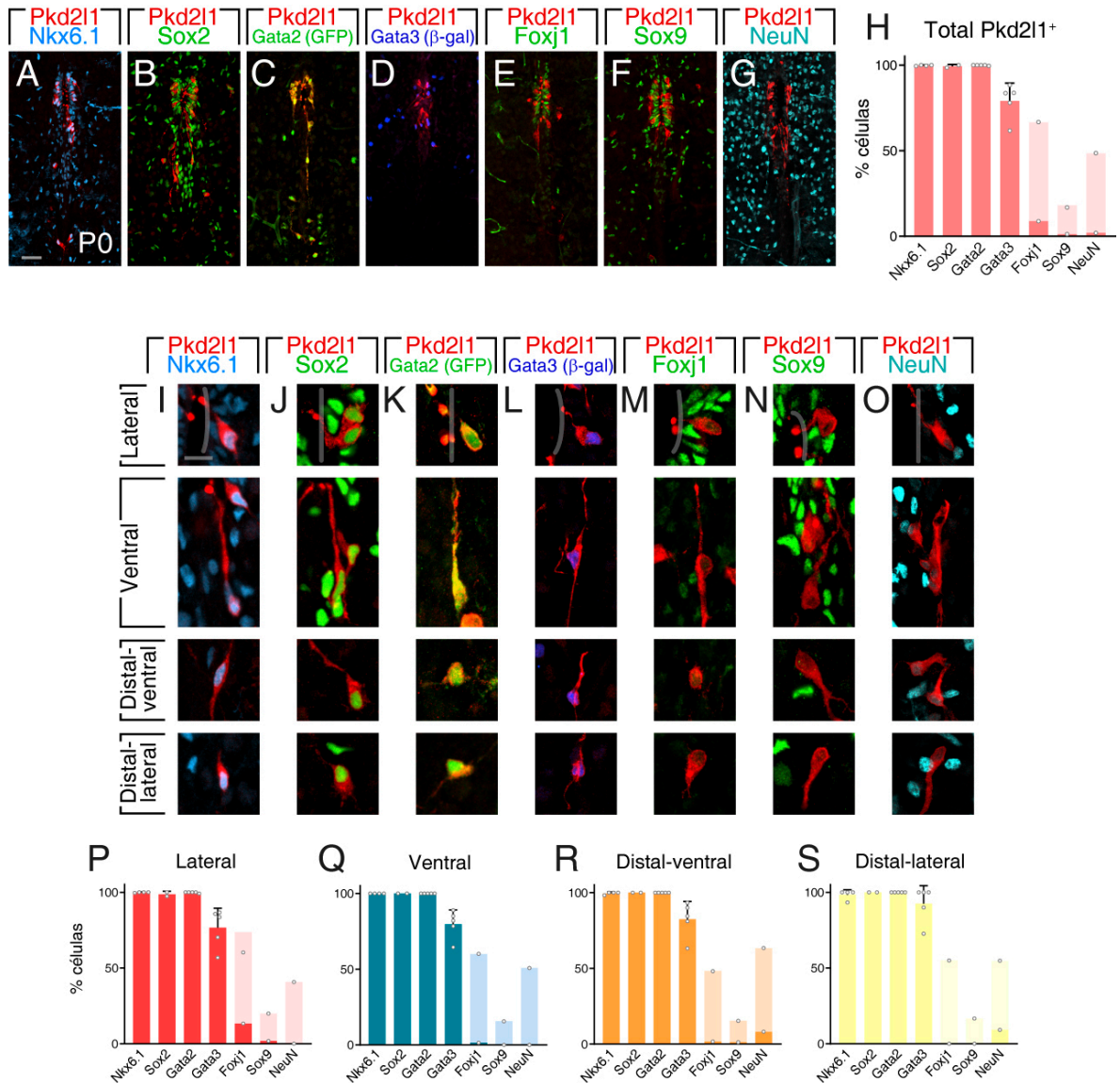


Figura 19. Las neuronas Pkd2l1⁺ tienen un perfil molecular común.

A-G. Secciones transversales de médula espinal de ratón al estadio P0 teñidas contra Pkd2l1 y Nkx6.1 (A), Sox2 (B), GFP (*Gata2*^{GFP}, C), β -gal (*Gata3*^{LacZ}, D), Foxj1 (E), Sox9 (F) o NeuN (G). Barra de escala 30 μ m.

H. Porcentaje de células Pkd2l1⁺ que expresa cada proteína. Se representa en color más claro los bajos niveles de expresión. Las barras son promedio+DE y cada círculo indica la proporción en distintos animales (Nkx6.1 n=4, Sox2 n=2, Gata2-GFP n=4, Gata3- β gal n=5, Foxj1 n=1, Sox9 n=1, NeuN n=1).

I-J. Imágenes representativas de neuronas de los grupos Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral a P0 teñidas contra Pkd2l1 y Nkx6.1 (I), Sox2 (J), GFP (*Gata2*, K), β -gal (*Gata3*, L), Foxj1 (M), Sox9 (N) o NeuN (O). Barra de escala 10 μ m.

P-S. Proporción de células Pkd2l1⁺ que expresa cada marcador según pertenencia a los *cluster* Lateral (P), Ventral (Q), Distal-Ventral (R), Distal-Lateral (S). El color intenso representa expresión elevada y el color claro representa baja intensidad. Las barras son media+DE y los círculos indican individuos.

Ver Tabla 13 del Anexo I.

En conjunto, estos resultados indican que los cuatro grupos de células Pkd2l1⁺ comparten un perfil de expresión molecular. Por lo tanto, las neuronas que se ubican en

diferentes regiones de la médula espinal representan cuatro subtipos de la misma clase neuronal.

Las poblaciones *Pkd2l1* distales derivan de progenitores neurales *Ascl1*⁺

Como se mencionó anteriormente, estudios previos identificaron que las CSF-cN de los grupos Lateral y Ventral se originan de progenitores de la zona ventricular p2-pOL y p3/fp que expresan la proteína proneural *Ascl1* (Di Bella et al., 2019). Por lo tanto se decidió realizar experimentos de mapeo de destino para esclarecer si los subgrupos distales también se derivan de estos progenitores *Ascl1*⁺ tardíos.

Siguiendo la estrategia utilizada para el análisis en el embrión, se aisló tejido *Ascl1*^{CreER}; *td-Tomato* luego de la aplicación de una dosis elevada de Tamoxifeno a las hembras preñadas para lograr una tasa elevada de recombinación. Con la dosis usada, se encontró que aproximadamente el 60% de las neuronas *Pkd2l1*⁺ de los cuatro grupos expresaban Tomato a E18.5 (Figura 20 A,D,E,H-K). Esto demuestra que las células *Pkd2l1*⁺ de las subpoblaciones Distal-Ventral y Distal-Lateral derivan de progenitores *Ascl1*⁺ tardíos, al igual que los grupos Lateral y Ventral.

Nestin es una proteína de filamento intermedio que se expresa en los progenitores neurales de la zona ventricular antes de su diferenciación (Gilyarov, 2008). Para confirmar que todas las neuronas *Pkd2l1*⁺ descienden de células Nestin⁺, se usaron ratones *Nes:Cre*; *td-Tomato* P0. Se vio que la totalidad de las células *Pkd2l1*⁺ fue Tomato⁺ (>98%), lo que demuestra que las neuronas pertenecientes a los cuatro subgrupos derivan de progenitores neurales ventriculares (Figura 20 B,D,F,H-K).

Finalmente, si bien el reportero *Gata3*^{LacZ} mostró expresión de *Gata3* en las cuatro subpoblaciones (Figura 19 D,L,P-S), se complementó este ensayo usando la línea *Gata3*^{Cre}, como se realizó en estadios embrionarios (Figura 10 G-J). Estos experimentos mostraron que las neuronas *Pkd2l1* de todos los subgrupos expresan *Gata3* durante su especificación (98-100%) (Figura 20 C,D,G,H-K).

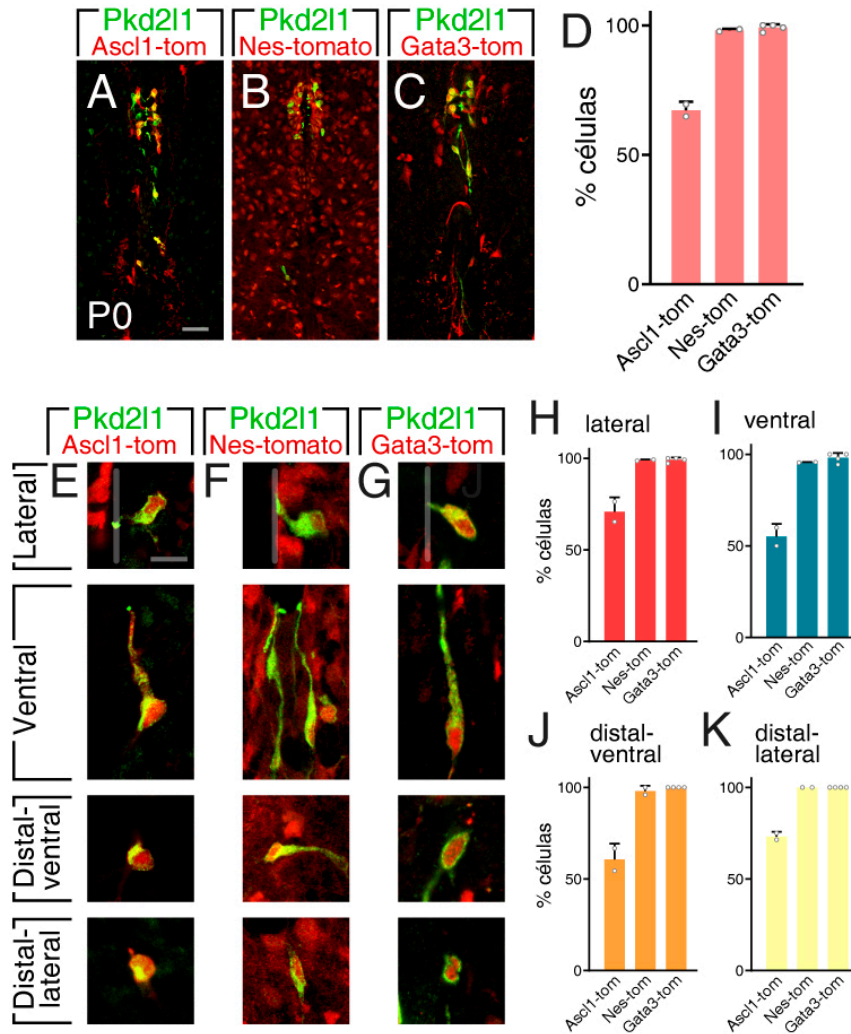


Figura 20. Las células Distal-Ventral y Distal-Lateral pertenecen a los linajes Ascl1, Nestin y Gata3.

A,E. Seguimiento de destino en ratones *Ascl1^{CreER};td-Tomato* E18.5 (Tamoxifeno 120 mg/kg a E13.75). Cortes transversales de médula espinal teñidas con anticuerpos contra Tomato y Pkd2l1. Se observa que las células Pkd2l1⁺ expresan Tomato, indistintamente al subgrupo de pertenencia.

B,F. Tinciones de secciones de médula espinal *Nes:Cre;td-Tomato* P0, contra Tomato y Pkd2l1, donde se observa que las células Pkd2l1⁺ Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral derivan de progenitores Nestin⁺.

C,G. Médula espinal de ratones *Gata3^{Cre};td-Tomato* E18.5. La tinción contra Tomato y Pkd2l1 muestra que las células Pkd2l1⁺ Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral expresan Gata3 durante su desarrollo. Barra de escala 30 μ m en A-C y 10 μ m en E-G.

D,H-K. Proporción de células Pkd2l1⁺ que expresan tomato y discriminadas según el *cluster* de pertenencia. Las barras son media+DE y los círculos indican individuos (n=2 *Ascl1^{CreER}*, n=2 *Nes:Cre*, n=4 *Gata3^{Cre}*).

Ver Tabla 14 del Anexo I.

Foxa2 es un marcador específico del subgrupo Ventral

Como se mostró más arriba, las neuronas Pkd2l1⁺ de los cuatro grupos mantienen la expresión de Nkx6.1, que refleja su ancestría ventral (Figura 19 A, H, I). En el embrión, el factor de transcripción Foxa2 es característico de la placa de piso y del extremo más ventral del dominio neuroepitelial p3 (Figura 7 I") (Delas et al., 2023; Dessaud et al., 2007; Kicheva and Briscoe, 2023). Considerando que parte de las neuronas del canal central se diferencian de progenitores p3/fp, se evaluó la expresión de Foxa2 en células Pkd2l1⁺ de la médula perinatal. Se observó que Foxa2 está ausente en todas las neuronas Pkd2l1⁺ que forman parte de los *clusters* Lateral y Distal-Lateral. Sin embargo, se encontró que Foxa2 se expresa en casi la totalidad de las células del subgrupo Ventral (Figura 21 A-D), así como en una porción minoritaria de las Distal-Ventral (Figura 21 A-D, ver más adelante).

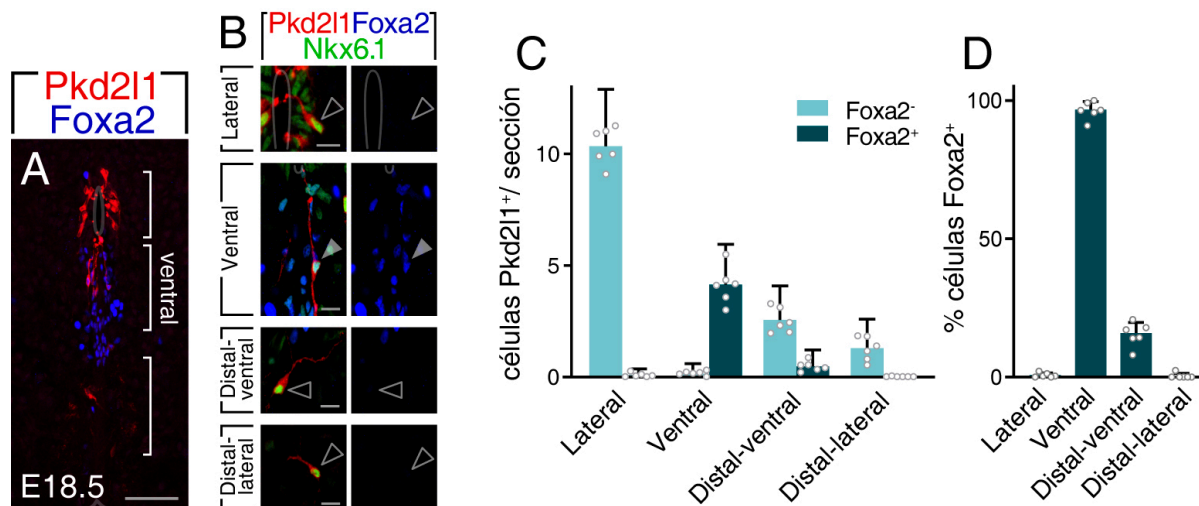


Figura 21. Foxa2 es un marcador diferencial de las neuronas del grupo Ventral.

A. Sección de la médula espinal teñida con anticuerpos contra Pkd2l1 y Foxa2. Barra de escala 50 μ m
B. Imágenes representativas de neuronas Pkd2l1⁺ de los grupos Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral teñido contra Pkd2l1, Foxa2 y Nkx6.1 Barra de escala 10 μ m. Las puntas de flecha llenas señalan neuronas Foxa2 positiva, mientras que las delineadas indican células negativas.
C-D. Cuantificación del número de células Pkd2l1⁺ de cada grupo según la expresión de Foxa2 (C) y porcentaje de neuronas Foxa2 positivas en cada grupo. Foxa2 está restringido al grupo Ventral (~100%) y una porción minoritaria del Distal-Ventral (~16%). Las barras son media+DE (127 secciones) y cada círculo representa un individuo (n=6).

Por lo tanto, estos experimentos demuestran que Foxa2 es un marcador molecular distintivo de las neuronas Pkd2l1⁺ del grupo Ventral, y su expresión está asociada a la ontogenia de esta subpoblación. Asimismo, consideramos que este hallazgo valida la

clasificación de los subgrupos introducida más arriba (Figuras 17 y 18) que se había basado exclusivamente en criterios anatómicos y morfológicos.

El grupo Distal-Ventral es heterogéneo en la expresión de Foxa2

Las neuronas del *cluster* Distal-Ventral representan aproximadamente el 16% (Figura 17) del total de células Pkd2l1⁺ en estadios perinatales. Jurcic *et al.* (2021) describieron una población de neuronas espinales Pkd2l1⁺ cuya ubicación se solapa con las células Distal-Ventral. Observaron un bajo número de células Distal-Ventral (allí llamadas *distal Pkd2l1 cells*) a lo largo de la médula espinal y el bulbo raquídeo de ratones adultos. Sin embargo, se desconoce cómo se originan estas neuronas.

Para comenzar a desentrañar el desarrollo de las neuronas Distal-Ventral se analizó la expresión de Foxa2, que distingue a las células del extremo ventral del neuroepitelio. Si bien la mayoría de este grupo no expresa Foxa2, al igual que los grupos Lateral y Distal-Lateral, hay un 15±5 % que es positivo para Foxa2 (Figura 22 A,C,D). Esto sugiere que al menos parte del grupo Distal-Ventral descende de los progenitores p3/fp, al igual que las células Ventral. Por lo tanto, la población Distal-Ventral estaría compuesta por células provenientes de ambas fuentes de progenitores, a diferencia de los otros grupos.

Si bien estas células están consistentemente presentes en todos los individuos analizados, se observó que la cantidad de células Distal-Ventral varía marcadamente entre secciones. Como ejemplo, entre los cortes analizados (mostrados en Figura 22 A,B) hay secciones con 8 células Pkd2l1⁺, mientras que los cortes subsiguientes carecen de células Distal-Ventral (Figura 22 A,B). Este agrupamiento indica que hay ciertos puntos en el eje rostro-caudal con mayor densidad de células Distal-Ventral, a diferencia con otros subgrupos que no parecen presentar esta distribución (datos no mostrados).

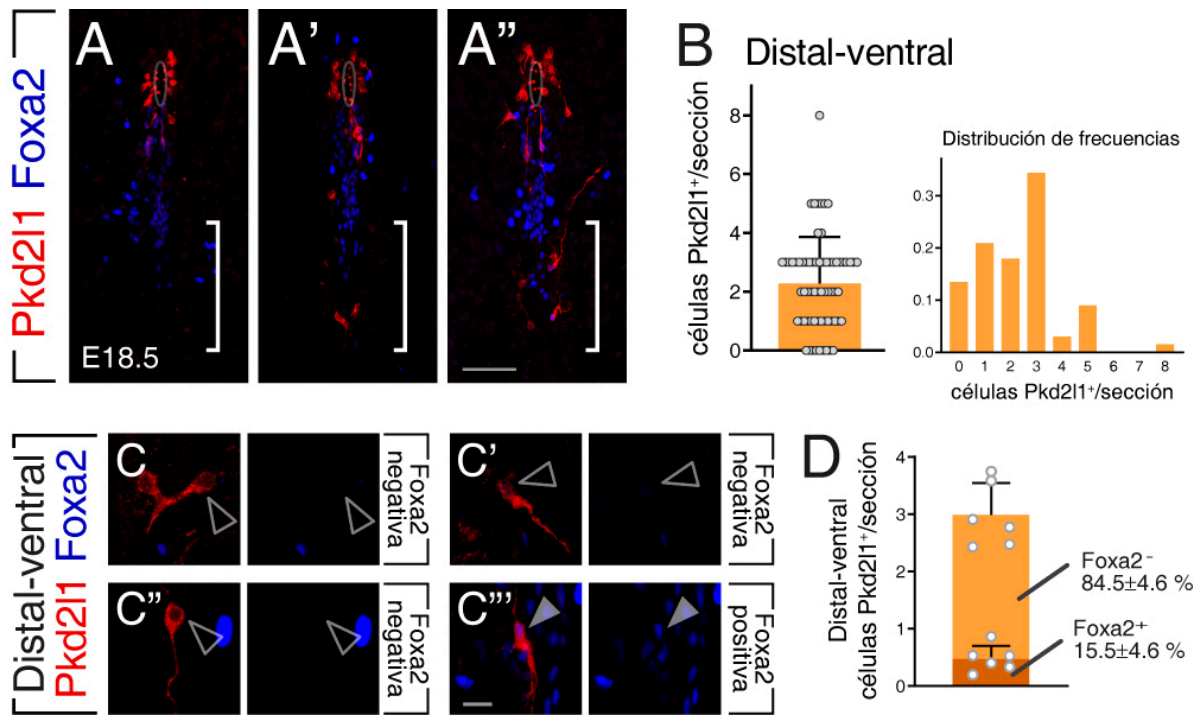


Figura 22. Las neuronas del grupo Distal-Ventral se agrupan en el eje antero-posterior.

A-A''. Médula espinal E18.5 teñida contra Pkd2l1 y Foxa2 mostrando distinto números de células Distal-Ventral por sección. Los corchetes marcan la región que ocupan las población Distal-Ventral. Barra de escala 50 μ m.

B. Cantidad de células Pkd2l1⁺ por sección, donde cada punto representa una sección espinal. Se muestra la distribución de frecuencias del número de células Distal-Ventral por sección.

C. Imágenes de células del grupo Distal-Ventral con ausencia o presencia de Foxa2. La punta de flecha llena señala una neurona Foxa2⁺, mientras que las vacías señalan ausencia de Foxa2. Barra de escala 10 μ m.

D. Células por sección y porcentaje de neuronas Pkd2l1⁺ de la población Distal-Ventral según la expresión de Foxa2. Las barras son media+DE y los círculos indican las mediciones en distintos animales (n=6).

La dependencia de Pax6 revela el origen dual de las células Distal-Ventral

La proteína Pax6 está involucrada en el establecimiento del patrón dorso-ventral del tubo neural, así como en la inducción de las diversas identidades neuronales (Burrill et al., 1997; Ericson et al., 1997; Exelby et al., 2021; Gosgnach et al., 2006). En el neuroepitelio tardío Pax6 mantiene su expresión en los dominios dorsales a la región p3 (Nkx6.1⁺ Nkx2.2⁺ Pax6⁻), incluyendo la región p2-OL (Figura 7 D) donde se produce una parte importante de las neuronas Pkd2l1⁺. Experimentos previos del laboratorio demostraron que la ausencia de Pax6 impide la diferenciación de las CSF-cN laterales al canal central, mientras que se preserva la producción de las ventrales (previamente denominadas CSF-cN⁺) (Petracca et al., 2016). Se decidió analizar entonces si Pax6 es

también un determinante de la producción de los subgrupos Pkd2l1⁺ distales, lo cual podría dar indicios sobre sus orígenes.

Con este objetivo generamos embriones *knockout* para Pax6 en el estadio E18.5, que fueron analizados por inmunohistoquímica contra Pkd2l1. De acuerdo con lo descripto, se observó que en los Pax6^{-/-} la cantidad total de células Pkd2l1⁺ fue un 71-73 % menor que en los respectivos ratones Control (Figura 23 A,B,F). Las neuronas Pkd2l1⁺ fueron clasificadas según su ubicación y morfología en las cuatro subclases, y se cuantificó el número de cada una. Estos análisis muestran que las células Pkd2l1⁺ Lateral están casi ausentes en los mutantes (Figura 23 A,B,G) (Petracca et al., 2016) y que lo mismo ocurre para los subgrupos Distal-Lateral (Figura 23 A,B,I) y Distal-Ventral (Figura 23 A,B,J). En contraste, las neuronas Pkd2l1⁺ Ventral en los Pax6-KO no presentaron alteraciones en comparación con los animales Control (Figura 23 A,B,H).

El registro de las posiciones de las neuronas Pkd2l1⁺ en las coordenadas dorso-ventral y medio-lateral, permitió armar mapas de distribución celular (Figura 23 C,D). Estas representaciones muestran que las neuronas Pkd2l1⁺ en los mutantes se ubican en posiciones similares al *cluster* Ventral del Control, sin mostrar diferencias significativas en la ubicación dorso-ventral (Figura 23 C,D,E).

Por lo tanto, mientras que el grupo Ventral, que deriva de progenitores p3/fp, se especifica normalmente en los ratones *knockout* Pax6, la producción de los otros subtipos se encuentra severamente comprometida. Estos resultados sugieren que los subgrupos Lateral, Distal-Lateral y Distal-Ventral comparten su origen en los dominios p2-pOL, cuyos progenitores expresan Pax6.

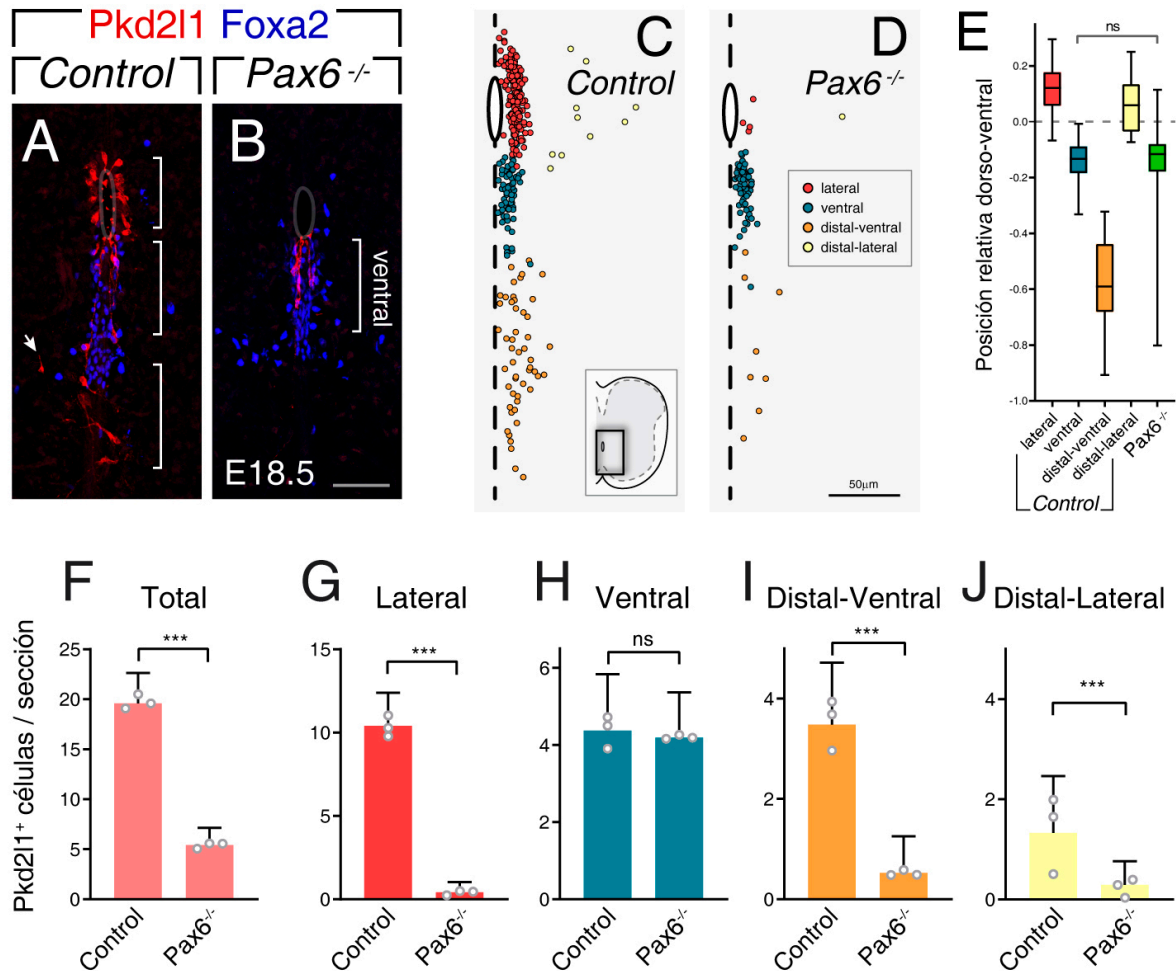


Figura 23. Origen ontogénico de los cuatro grupos de neuronas del canal central.

A-B. Secciones transversales de médula espinal de ratones E18.5 *Control* (A) y *Pax6*^{-/-} (B) teñidas contra *Pkd211* y *Foxa2*. Barra de escala 50 μ m.

C,D. Mapas de posición de cada célula *Pkd211*⁺ de los cuatro grupos de un embrión control y *Pax6*^{-/-}. Se muestran células de 16 secciones (312 células en *Control* y 84 en *Pax6*^{-/-}).

E. Comparación de la ubicación en el eje dorso-ventral de las células del control divididas en los cuatro grupos versus las células del tejido *Pax6*^{-/-} (verde). Las células presentes en el tejido *Pax6*^{-/-} no muestran diferencias significativas respecto a las neuronas Ventral del *Control* (ns, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn). La posición está relativizada al extremo ventral del canal central (y=0) y al surco ventral espinal (y=-1).

F-J. Cuantificación del número de células *Pkd211*⁺ en el tejido *Control* y *Pax6*^{-/-}, total (D), Lateral (E), Ventral (F), Distal Ventral (G) y Distal-Lateral (H). Las barras son media+DE (53 secciones) y cada círculo representa un individuo (n=3). Los asteriscos indican diferencias *** p<0.001, ns=no significativo (Prueba de Mann-Whitney).

Los experimentos en los *Pax6*^{-/-} indican que las células Distal-Ventral derivan, al menos en su mayoría, de progenitores p2-pOL. Sin embargo, este grupo contiene células positivas y negativas para *Foxa2* (Figura 22 C,D), que identifica las neuronas *Pkd211*⁺ derivadas de la región p3/fp. Si bien la cantidad total de células Distal-Ventral sufre una reducción significativa en los mutantes de *Pax6* (Figura 23 G, Figura 24 F), esta

disminución solo afecta la población mayoritaria que no expresa *Foxa2*, mientras que la componente minoritaria *Foxa2*⁺ (18%) no presenta cambios significativos (Figura 24 D-F). La presencia de células Distal-Ventral exclusivamente *Foxa2*⁺ en los mutantes *Pax6* refuerza el origen dual de la subpoblación del surco ventral.

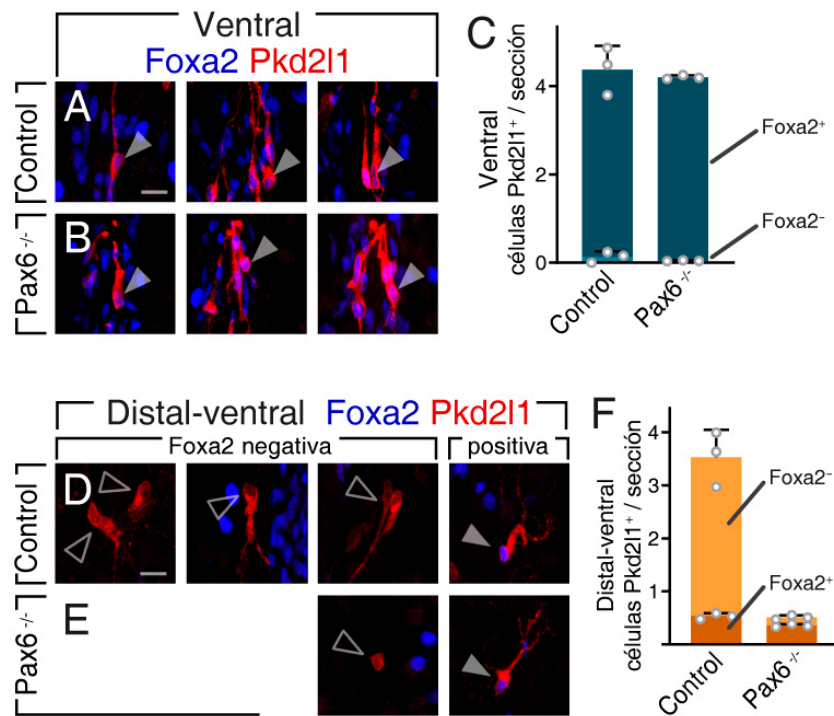


Figura 24. Las células Distal-Ventral tienen origen mixto

A,B,D,E. Imágenes representativas de células *Pkd2l1*⁺ de los *clusters* Ventral y Distal-Ventral de ratones E18.5 Control y *Pax6*^{-/-} teñidas contra *Pkd2l1* y *Foxa2*. Se observa que en los mutantes las células Distal-Ventral presentes son *Foxa2*⁺. La punta de flecha llena señala una neurona *Foxa2*⁺, mientras que las vacías señalan ausencia de *Foxa2*.

C,F. Cantidad por sección de neuronas *Pkd2l1*⁺ de la población Ventral y Distal-ventral según la expresión de *Foxa2*. Las barras son media+DE y los círculos indican las mediciones en distintos animales (n=3). Distal-ventral *Foxa2*⁻ Control vs. *Pax6*^{-/-}: p<0.001; *Foxa2*⁺ Control vs. *Pax6*^{-/-}: ns (prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn).

Estos experimentos muestran que *Pax6* cumple un rol esencial en la diferenciación de los progenitores p2-pOL. Se evaluó si el fenotipo encontrado podría justificarse por una función crítica de *Pax6* en la definición de territorios dorso-ventrales o bien en la inducción de *Ascl1*. Se analizó la expresión de *Nkx6.1* en la zona ventricular E13.5 *Pax6*^{-/-}, donde se vio que la extensión del territorio *Nkx6.1* es comparable a la del control (Figura 25 A-C). Por otra parte, la producción deficiente de neuronas *Pkd2l1*⁺ en los *knockout* no está asociada a una menor expresión de *Ascl1*, dado que no se encontró diferencias en

el número de células $Ascl1^+$ en la zona ventricular $Pax6^{-/-}$ E13.5 (Figura 25 A,B,E). Por lo tanto, deducimos que $Pax6$ tiene un rol tardío directo en la diferenciación de las neuronas $Pkd2l1^+$, cuya elucidación requerirá una investigación adicional.

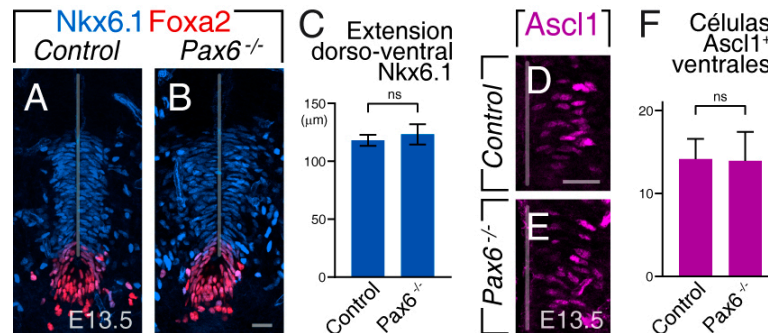


Figura 25. La eliminación de $Pax6$ no afecta el establecimiento de los territorios ventriculares ventrales

A-B. Secciones transversales de médula espinal E13.5 teñidas contra las proteínas de *patterning* $Nkx6.1$ y $Foxa2$ en embriones *Control* y $Pax6^{-/-}$. Barra de escala 20 μm .

C. Extensión del territorio $Nkx6.1^+$ en embriones *Control* y $Pax6^{-/-}$. ns= no significativo (Mann-Whitney Test, n=11 secciones).

D-E. Tinciones contra $Ascl1$ en la zona ventricular ventral E13.5. Barra de escala 20 μm .

F. Número de progenitores $Ascl1^+$ por sección en embriones *Control* y $Pax6^{-/-}$. ns= no significativo (Mann-Whitney Test, n=25 secciones)

En conjunto, estos ensayos muestran que hay dos fuentes de neuronas $Pkd2l1^+$ en la zona ventricular espinal del ratón. Las células Lateral y Distal-Lateral tienen su origen en el dominio progenitor p2-pOL, evidenciado por su ausencia en mutantes $Pax6$. En contraste, las células Ventral no muestran alteraciones en estos mutantes, lo cual confirma su producción a partir de los progenitores $Ascl1^+$ del dominio p3/fp. Finalmente, el *cluster* $Pkd2l1^+$ Distal-Ventral contiene mayoritariamente células provenientes del dominio p2-pOL junto con una contribución menor del p3/fp, a diferencia de los otros tres grupos que tienen su origen en un único dominio progenitor.

La diferenciación de las neuronas Distal-Ventral es independiente de $Ascl1$

Previamente se demostró que $Ascl1$ es crucial para la especificación de los *clusters* Lateral y Ventral del canal central (Di Bella et al., 2019). Además, se mostró más arriba que todas las neuronas $Pkd2l1^+$ derivan de progenitores $Ascl1^+$ (Figura 20). Con el fin de determinar si $Ascl1$ controla la génesis de los grupos distales, produjimos embriones

E18.5 *knockout* *Ascl1*. En línea con el estudio previo, los mutantes de *Ascl1* presentaron una reducción significativa en el número total de células *Pkd2l1*⁺ (Figura 26 A,B,F; ~88% de disminución).

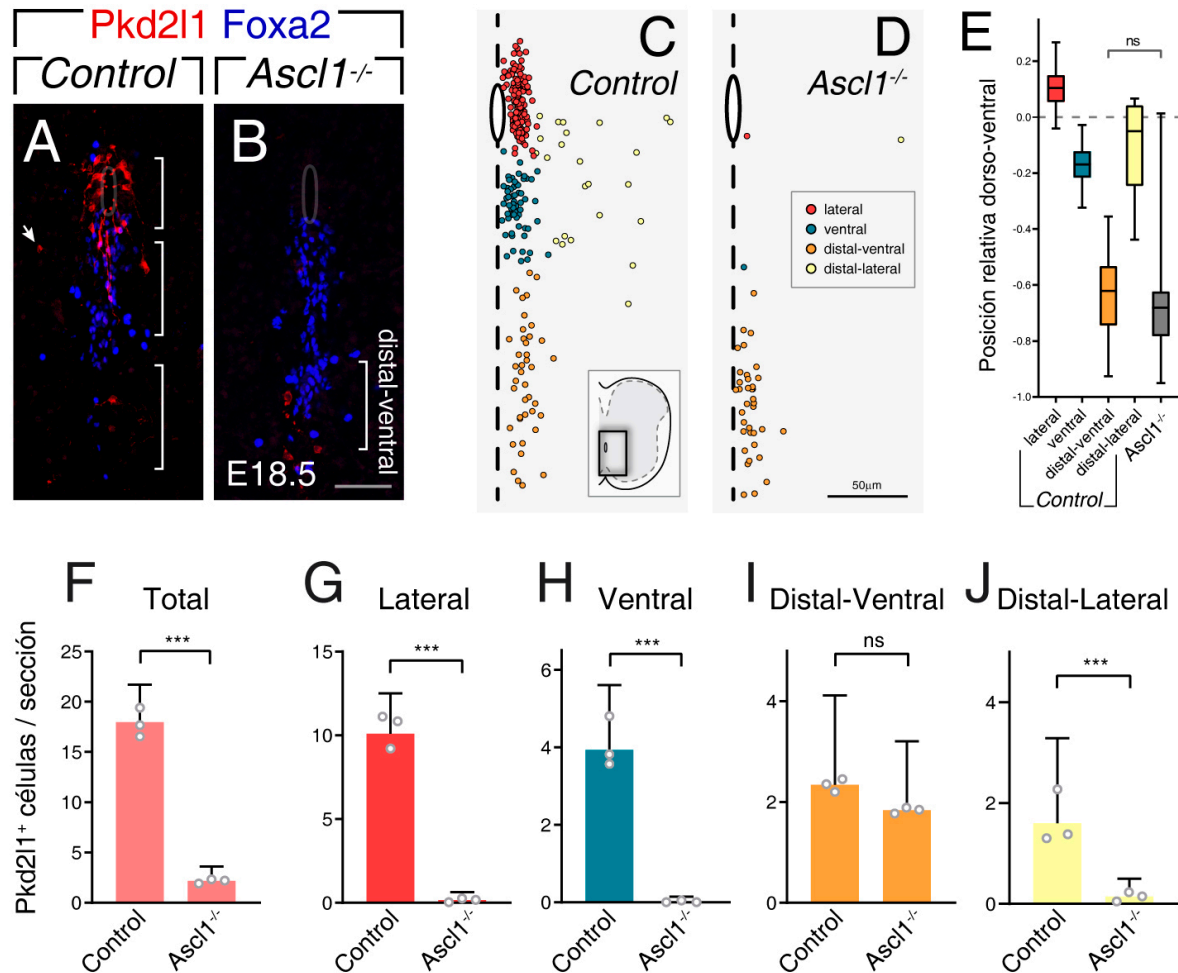


Figura 26. Las neuronas Distal-Ventral se diferencian en ausencia de *Ascl1*.

A-B. Secciones transversales de médula espinal E18.5 *Control* (A) y *Ascl1*^{-/-} (B) teñidas contra *Pkd2l1* y *Foxa2*. Los corchetes señalan la región de asentamiento de las distintas subpoblaciones. Barra de escala 50 μ m.

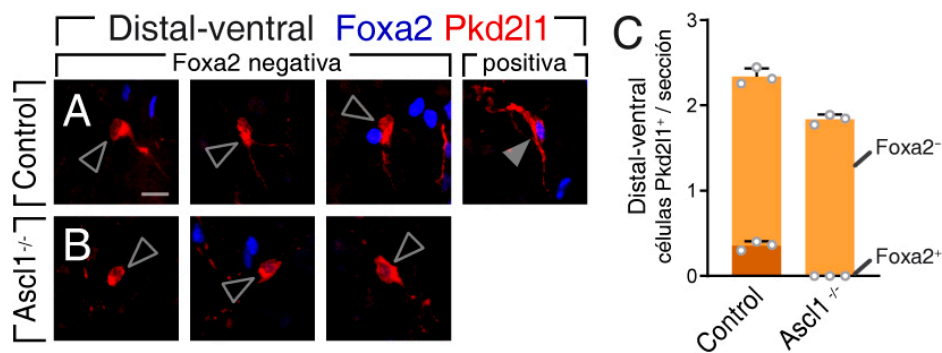
C-D. Mapas de la ubicación de células *Pkd2l1*⁺ pertenecientes a los cuatro grupos para el embrión *Control* (A) y *Ascl1*^{-/-} (B). Se muestran células de 17 secciones (300 células en *Control* y 40 en *Ascl1*^{-/-}).

E. Posición relativa en el eje dorso-ventral de las células control separadas en los cuatro grupos y el conjunto de las células de mutantes *Ascl1* (gris). La ubicación de las células *Pkd2l1*⁺ *Ascl1*^{knockout} no presenta diferencias significativas respecto al *cluster* Distal-Ventral control (ns, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn). La posición está relativizada al extremo ventral del canal central ($y=0$) y al surco ventral espinal ($y=-1$).

F-J. Cuantificación de la cantidad de células *Pkd2l1*⁺ totales (F) y de los grupos Lateral (G), Ventral (H), Distal-Ventral (I) y Distal-Lateral (J) en ratones *Control* y *Ascl1*^{-/-}. Se observa una reducción global en el número de neuronas *Pkd2l1*⁺, a excepción de las células Distal-Ventral, que no presentan diferencias significativas respecto al control; *** $p < 0.001$, ns=no significativo (Prueba de Mann-Whitney). Las barras son media+DE (65 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones ($n=3$).

La eliminación de *Ascl1* impide la producción de las poblaciones *Pkd2l1*⁺ Lateral, Ventral y Distal-Lateral (Figura 26 A, B,G,H,J). Sorprendentemente, los embriones *Ascl1*^{-/-} presentaron células *Pkd2l1*⁺ cuya distribución anatómica es consistente con la identidad Distal-Ventral. El análisis posicional de las células del mutante no mostró diferencias al compararlas con el grupo Distal-Ventral control (Figura 26 F).

Por lo tanto, si bien todas las neuronas *Pkd2l1* derivan de progenitores *Ascl1*⁺, incluyendo las ubicadas en la proximidad del surco ventral (Figura 20 A,D), la actividad proneural de *Ascl1* es dispensable para la diferenciación de las neuronas *Pkd2l1*⁺ que formarán el subgrupo Distal-Ventral.



Aunque la cantidad de células Distal-Ventral no sufre una reducción significativa en los *knockout* de *Ascl1*, se observa una leve disminución. Como se describió en los análisis de animales *wildtype* (Figura 21) y *knockout* *Pax6* (Figura 23), el *cluster* Distal-Ventral incluye células positivas y negativas para *Foxa2*. Al analizar cómo la eliminación de *Ascl1* afecta ambos componentes de este grupo, se vio una reducción en las células *Foxa2*⁺, presuntamente de origen p3, mientras que el número de neuronas *Foxa2*⁻ no se encontró alterado (Figura 27). Esto sugiere que dentro del *cluster* Distal-Ventral, sólo las células *Foxa2*⁺ dependen de *Ascl1*, al igual que las células Ventrals, con las que compartirían su ontogenia. En cambio, la especificación de las células que no expresan

Foxa2, que se originarían del dominio p2-pOL, es independiente de Ascl1 lo cual es llamativo y las diferencia de las otras poblaciones con las que comparte su origen progenitor.

Por lo tanto, la diferenciación de las neuronas Distal-Ventral derivadas de progenitores p2-pOL no depende de la acción de Ascl1 a pesar de que sus progenitores expresan este gen proneural.

Las células Distal-Ventral delaminan y migran hacia el surco ventral

Los experimentos previos indican que los progenitores neurales Ascl1⁺ de la región p2-pOL generan las células Pkd2l1⁺ de los grupos Lateral, Distal-Lateral y la mayoría del Distal-Ventral. Sin embargo, resulta difícil distinguir las células distales en las etapas iniciales de su diferenciación ya que se producen junto con las del canal central.

Dado que en los *knockout* de Ascl1 se especifican únicamente las células Foxa2⁻ que se posicionarán en la región Distal-Ventral, estos animales son una herramienta útil para estudiar su delaminación de la zona ventricular y su trayectoria migratoria sin que interfieran los otros grupos. Con este objetivo, produjimos embriones *Ascl1*^{-/-} en distintos estadios de desarrollo.

En primer término, se verificó que en los mutantes *Ascl1* E15.5 y E16.5 ya se observa el fenotipo encontrado a E18.5. Se encontró una reducción significativa del número de células Pkd2l1⁺ en los embriones *Ascl1*^{-/-} E15.5 y E16.5 en comparación con sus respectivos controles (~85% de disminución, Figura 13, Figura 28). La ausencia de células Lateral y Ventral fue completa (98-100%), mientras que la cantidad de células Pkd2l1⁺ desprendidas en los mutantes fue solo levemente menor (~40% de reducción; Figura 28 A-C, D-F). Nótese que en estos estadios el rótulo ‘desprendidas’ incluye los prospectivos grupos Distal-Ventral y Distal-Lateral, dado que aún no se puede determinar su asentamiento final. Por lo tanto, estos experimentos confirman que la ausencia de Ascl1 suprime la neurogénesis de las células de los grupos Lateral, Ventral y Distal-lateral y por lo tanto sus mutantes sirven para el análisis aislado de la población Distal-Ventral.

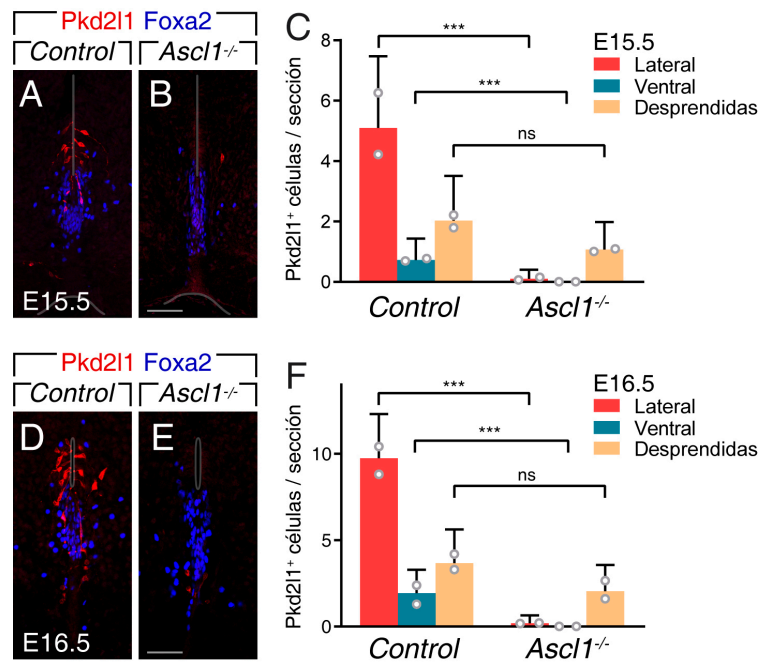


Figura 28. Las neuronas Distal-Ventral se diferencian aisladas en el tejido *Ascl1*^{-/-}.

A-B, D-E. Secciones de médula espinal de embriones *Control* (A,E) y *Ascl1*^{-/-} (B,F) E15.5 y E16.5, teñidas contra Pkd2l1 y Foxa2. Barra de escala 50 μ m.

C, F. Cuantificación del número de células Lateral, Ventral y desprendidas para los ratones *Control* y *Ascl1*^{-/-} E15.5 (C,D) y E16.5 (G,H). En ambos casos se observa una reducción en la cantidad de células Lateral y Ventral, pero las desprendidas no presentan diferencias significativas (***) $p < 0.001$, ns=no significativo; prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn). Barras son promedio+DE (60 secciones E15.5, 52 secciones E16.5, y los círculos son medias de individuos (n=2)).

Se analizó entonces el posicionamiento de las células Pkd2l1⁺ en la médula de *Ascl1*^{-/-} E15.5, E16.5 y E18.5 con el objetivo de reconstruir la migración de las neuronas del *cluster* Distal-Ventral (Figura 29). A partir de las imágenes se midió la ubicación de cada célula y se confeccionaron mapas posicionales para cada estadio (Figura 29 D-G). Los resultados muestran que en los estadios más tempranos las células se localizan en las regiones más dorsales, cercanas al ventrículo (Figura 29 A,B,D,E) y luego se movilizan progresivamente hacia áreas más ventrales (Figura 29 B,C,E-G). Esto sugiere que la mayoría de las neuronas Distal-Ventral se originan en el dominio progenitor p2-pOL, delaminan, y comienzan su migración ventral para asentarse cerca del surco ventral (Figura 29 D-G).

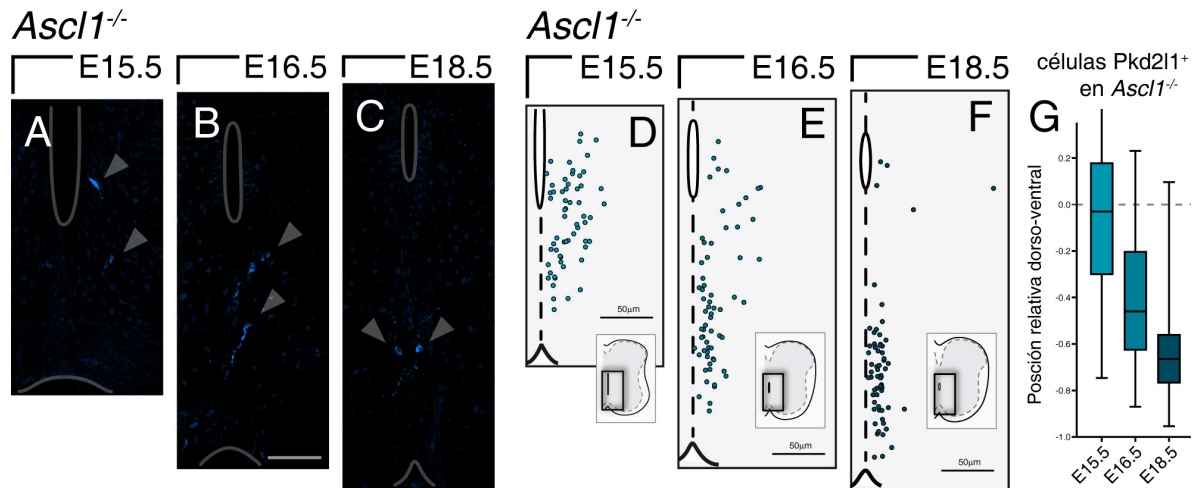


Figura 29. Las células Distal-Ventral delaminan del ventrículo y migran ventralmente.

A-C. Imágenes de secciones transversales de médula espinal de ratón *Ascl1*^{-/-} teñidas contra Pkd211 E15.5 (A), E16.5 (B) y E18.5 (C). Barra de escala 50 μm. Las puntas de flecha señalan células (desprendidas).

D-F. Mapas de la posición de cada célula Pkd211⁺ en el tejido *Ascl1* mutante E15.5 (D), E16.5 (E) y E18.5 (F). Se muestran 64 células en cada estadio.

G. Ubicación de las células Pkd211⁺ en el eje dorso-ventral de mutantes *Ascl1*. La posición está relativizada al extremo ventral del canal central (y=0) y al surco ventral espinal (y=-1). El diagrama de caja muestra la mediana y los cuartiles de los datos y los bigotes indican los máximos y mínimos.

Las imágenes muestran neuronas en distintas posiciones de su trayectoria migratoria, lo cual permite evaluar la morfología de células individuales en distintas fases desde la delaminación de la zona ventricular hasta su asentamiento terminal (Figura 30 A-E). En varios casos se observó que las células Pkd211⁺ en los mutantes extienden su proceso basal en sentido ventral, el cual parece guiar la migración (Figura 30 B-D, flechas).

Para distinguir las extensiones celulares con más claridad, se utilizó el reportero citoplasmático *td-Tomato* bajo el control del deletor *Ascl1*^{CreER} (Figura 30 F-I). A diferencia de los paneles A-E de la Figura 30, este experimento se realizó en un fondo Control (*Ascl1* heterocigota). Se obtuvo una nueva colección de imágenes que muestran un proceso axonal Tomato⁺ en crecimiento hacia las regiones ventrales de la médula espinal (Figura 30 G-I, flechas). Esta característica es común tanto para las prospectivas neuronas ancladas al canal central (Figura 30 B, punta de flecha; Figura R2) como para aquellas que se liberan del conector apical (prospectivas del *cluster* Distal-Ventral, Figura 30 H-I, punta de flecha). El crecimiento axonal debe estar siendo dirigido por moléculas de atracción en centros ventrales, cuya identidad es desconocida.

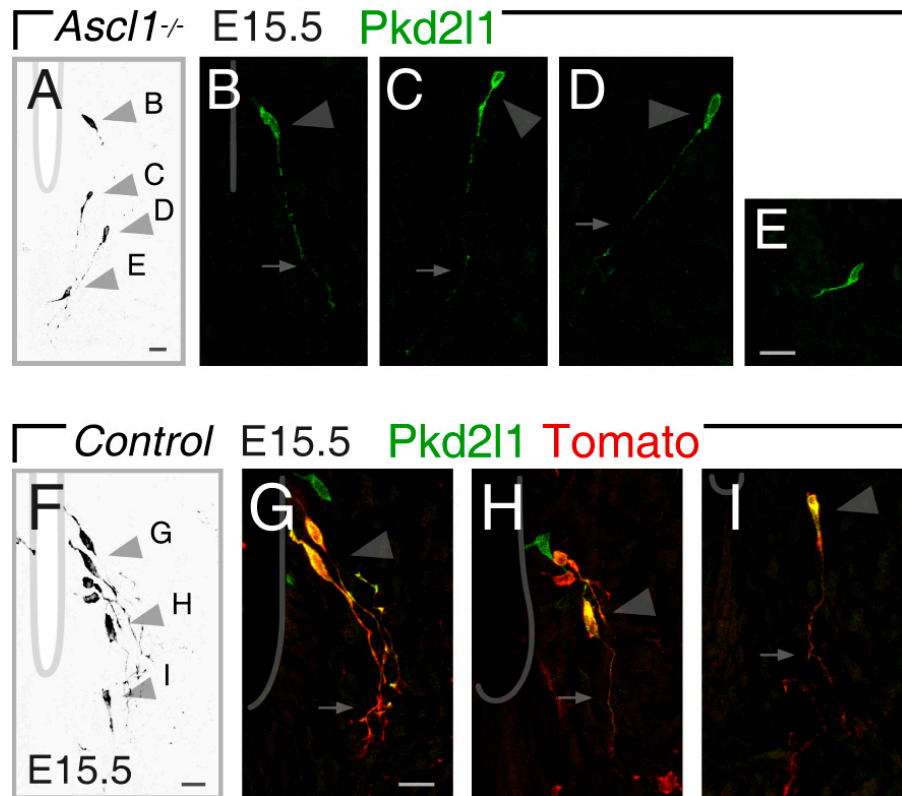


Figura 30. Migración de las células Distal-Ventral

A-E. Imágenes de células $Pkd2l1^+$ en la médula $Ascl1^{-/-}$ E15.5 que representan distintas fases de la migración celular. En A se muestra la posición de las células B-E. Las cabezas de flecha indican soma en el curso de la migración y las flechas señalan el proceso axonal. Barra de escala 10 μ m.

F-I. Tinciones de $Ascl1^{CreER};td\text{-Tomato}$ E15.5 contra $Pkd2l1$ y Tomato en que se observa células *Control*. En F se muestra la superposición de las imágenes G-H. Las cabezas de flecha indican soma y las flechas señalan el proceso axonal. Barra de escala 10 μ m. Los procesos axonales se extienden hacia el funículo ventral tanto para las células ancladas al ventrículo como para las putativas Distal-Ventral en migración. Dosis de Tamoxifeno 40 mg/kg.

En resumen, estos resultados indican que las neuronas Distal-Ventral en diferenciación extienden y desarrollan el proceso axonal, probablemente atraído por señales ventrales de guía axonal. Las neuronas parecen iniciar su especificación de manera similar a las Lateral, pero luego se desprenden y migran hacia la región ventral de la médula espinal siguiendo la atracción de su axón. Es llamativo que las células Distal-Ventral compartan su origen con las neuronas Lateral en los progenitores $Ascl1^+$ de la región p2-pOL, pero que la acción de esta proteína proneural sea dispensable para su diferenciación. Es posible que en estas neuronas actúe otro factor proneural o que la pérdida de determinantes apicales desinhiba su diferenciación neuronal.

GATA3/2 REGULAN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS PKD2L1⁺

La especificación de células Lateral y Distal-Lateral depende de Gata3

La expresión de Gata3/2 es común a los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1⁺ del canal central (Figura 19). Los experimentos realizados en estadios embrionarios mostraron que Gata3/2 forman parte de los programas de diferenciación de estas neuronas (Figuras 9-12). Como se mencionó anteriormente, en la especificación en los dominios tardíos p2-pOL la activación de Gata3 antecede a Gata2, mientras que en los p3/fp se activan en simultáneo. Esta diferencia podría significar que Gata3 y Gata2 cumplan roles distintos en la diferenciación p2-pOL y p3/fp. Esta posibilidad está avalada por lo encontrado en los embriones E15.5 mutantes de Gata3 (Figuras 14) y Gata2 (Figura 15), donde la especificación neuronal en la región p2-pOL se ve afectada en ausencia de Gata3, pero no en mutantes de Gata2. En esta sección profundizamos el análisis funcional de genes Gata en la producción de neuronas Pkd2l1⁺.

Se utilizó nuevamente la estrategia condicional para obtener mutantes condicionales al sistema nervioso *Nes:Cre;Gata3^{LacZ/flox}* (*Gata3-cKO*). Se recurrió a este abordaje dado que los mutantes nulos mueren en estadios embrionarios tempranos (E10.5-E11.5). En animales perinatales E18.5 se analizaron las células Pkd2l1⁺ pertenecientes a cada uno de los cuatro *clusters*. En los *Gata3-cKO* se encontró una disminución significativa en el número total de neuronas Pkd2l1⁺, en comparación con los individuos *Control* (Figura 31), y se observó que la ausencia de Gata3 impacta diferencialmente en algunos subgrupos. En consistencia con resultados a E15.5 (Figura 14), los animales *Gata3-cKO* perinatales carecen por completo de las células Lateral (Figura 31). Las neuronas del *cluster* Distal-Lateral y Distal-Ventral, que comparten su origen en el dominio p2-pOL, también se vieron afectadas por la eliminación de Gata3 (Figura 31). En contraste, el grupo Ventral no registró diferencias significativas respecto al control (Figura 31).

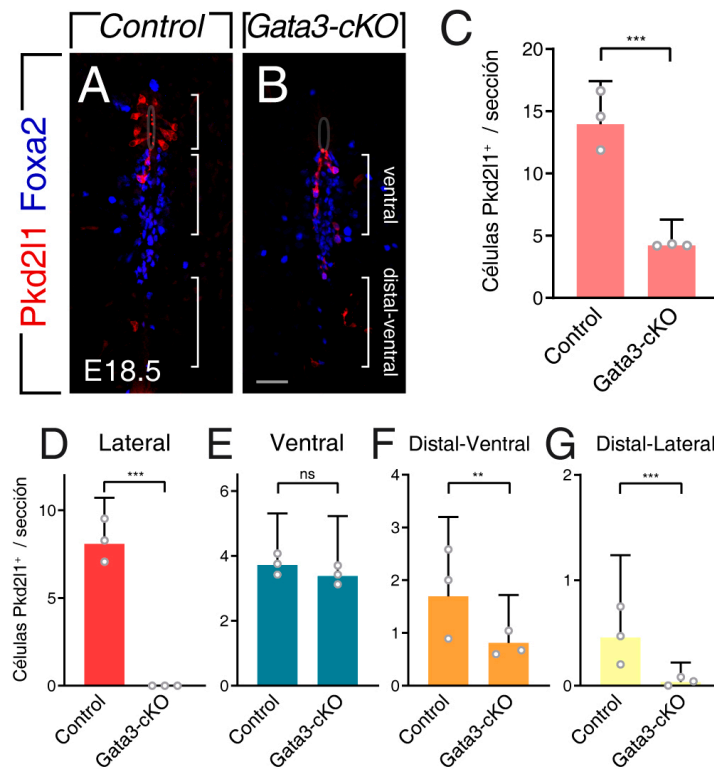


Figura 31. Gata3 es necesario para la producción de los clusters Lateral y Distal-Lateral

A-B. Secciones transversales de tejido de médula espinal de ratones E18.5 *Control* (A) y *Gata3-cKO* (*Nes:Cre;Gata3^{LacZ/flox}*) teñidas con anticuerpos contra Pkd2l1 y Foxa2. Los corchetes identifican las ubicaciones de las subpoblaciones Lateral, Ventral y Distal-Ventral. Barra de escala 30 μ m.

C-G. Cuantificación del número total de células Pkd2l1⁺ en la médula *Control* y *Gata3-cKO* (C), pertenecientes a los grupos Lateral (D), Ventral (E), Distal-Ventral (F) y Distal-Lateral (G). Las barras son media+DE (52 secciones) y cada círculo representa un individuo (n=3). Los asteriscos indican diferencias *** $p < 0.001$, ** $p \leq 0.01$, ns=no significativo (Prueba de Mann-Whitney).

Estos resultados indican que Gata3 es necesario para la génesis de las neuronas Pkd2l1⁺ con origen en la región p2-pOL. Sin embargo, la ausencia de Gata3 impacta de forma dispar en el desarrollo de las neuronas producidas en esta región, ya que mientras que la generación de las neuronas Lateral y Distal-Lateral está completamente suprimida, el grupo Distal-Ventral sigue produciéndose, aunque reducido en aproximadamente el 50%.

Para descartar completamente que el mantenimiento de las neuronas Ventral en los *Gata3-cKO* se debiera a alguna ineficiencia del deletor *Nes:Cre* en progenitores del extremo ventral de la zona ventricular, se generaron mutantes nulos Gata3 (con el alelo *Gata3^{LacZ}* en homocigosis). Si bien la eliminación completa de Gata3 conduce a la letalidad embrionaria temprana, es posible lograr su rescate agregando isoprotenerol y fenilefrina a la bebida de la hembra preñada (Lim et al., 2000). Las secciones de médula

espinal obtenidas a E18.5 fueron teñidas con anticuerpos contra Pkd2l1 y se cuantificó el número de células Pkd2l1⁺ de cada grupo en los animales *knockout* (*Gata3*^{-/-}) así como en los controles *wildtype* (*Gata3*^{+/+}) y *heterocigotas* (*Gata3*^{+/-}) (Figura 32).

Los ratones *Gata3*^{-/-} presentaron el mismo fenotipo que el encontrado en los mutantes condicionales, con una ausencia completa de Pkd2l1 en los laterales del canal central y sin diferencias en el número Ventral (Figura 32 B,C,F,G). Este resultado valida el uso del transgen *Nes:Cre* (Figura 31), descartando deficiencias técnicas en el abordaje condicional.

Es interesante que el análisis cuantitativo reveló además un efecto de la heterocigosis de *Gata3* en la producción de neuronas Pkd2l1⁺. Se encontró que en animales *Gata3*^{LacZ/+}, que cuentan con una sola copia funcional del gen, el número de células del grupo Lateral cae en aproximadamente un 30% en comparación con los *wildtype* (Figura 32 B,E). Dado que la heterocigosis resulta en algunos casos en niveles reducidos de la proteína, este resultado sugiere que la progresión en el programa de diferenciación necesita que la expresión de *Gata3* supere un umbral. Esto sería de particular relevancia para la génesis de las neuronas en la región p2-pOL.

Dado que la falta de expresión de Pkd2l1 en los mutantes *Gata3* podría reflejar una regulación negativa directa de este canal iónico y no necesariamente implicar la ausencia de neuronas, se evaluaron otros marcadores de este tipo neuronal. Se analizó la expresión de *Gata2*, tanto a nivel de la proteína como con el reportero GFP (Figura 33 A-D). En ambas determinaciones los animales *Gata3-cKO* tuvieron un número menor de células *Gata2*⁺, con ausencia de células positivas en los laterales del canal central y con persistencia de las del tipo Ventral.

Las células Pkd2l1⁺ también expresan la policistitina Pkd1l2 (Petracca et al., 2016), propuesta como cofactor para la funcionalidad de Pkd2l1 en la membrana. Mediante hibridación *in situ*, se encontró un patrón de expresión similar a *Gata2* y Pkd2l1 ya que los *Gata3-cKO* no expresan Pkd1l2 en el epéndima lateral, aunque sí en la línea media ventral (Figura 33 E,F).

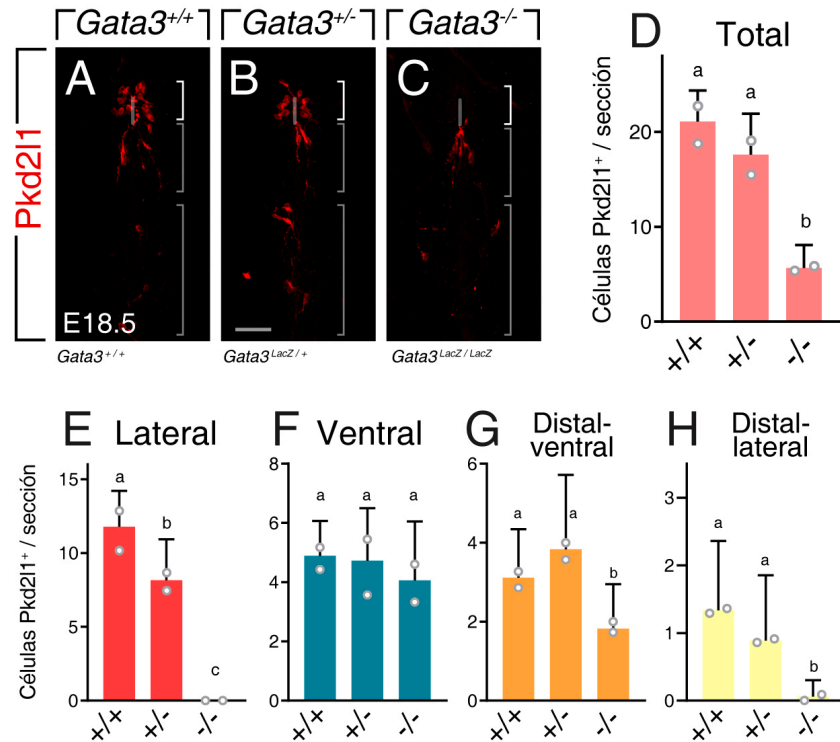


Figura 32. La especificación de las neuronas Pkd211 depende de Gata3

A,B,C. Cortes de médula espinal de embriones E18.5 *wildtype* (+/+), *heterocigotas* (+/-) y *knockout* (-/-) teñidos contra Pkd211. La producción de embriones se realizó usando la línea *Gata^{LacZ}* con rescate farmacológico de la letalidad embrionaria.

D-H. Cuantificación de las células Pkd211⁺ por sección, células totales (D) y en cada uno de los subgrupos (E-H). En los mutantes se observa fenotipo idéntico al abordaje condicional (usando ratones *Nes:Cre;Gata3^{fllox}*) con ausencia completa de neuronas laterales, preservándose la especificación Ventral. Nótese la reducción de células laterales en heterocigotas (30% de disminución). Las barras son media+DE (18 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=2). Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn).

Adicionalmente, no se observaron diferencias cualitativas importantes en la expresión endimaria de Nkx6.1, lo cual sugiere que la arquitectura del canal central no tiene alteraciones severas en los mutantes (Figuras 33 G,H). Sin embargo, el análisis más detallado muestra que en los animales control, Nkx6.1 se expresa en las neuronas del canal central con niveles más intensos que en los endimocitos (Figura 33 G,H, flechas). En los mutantes no se observaron células con niveles elevados de Nkx6.1, lo que también confirma que la médula *Gata3* mutante efectivamente carece de neuronas Lateral.

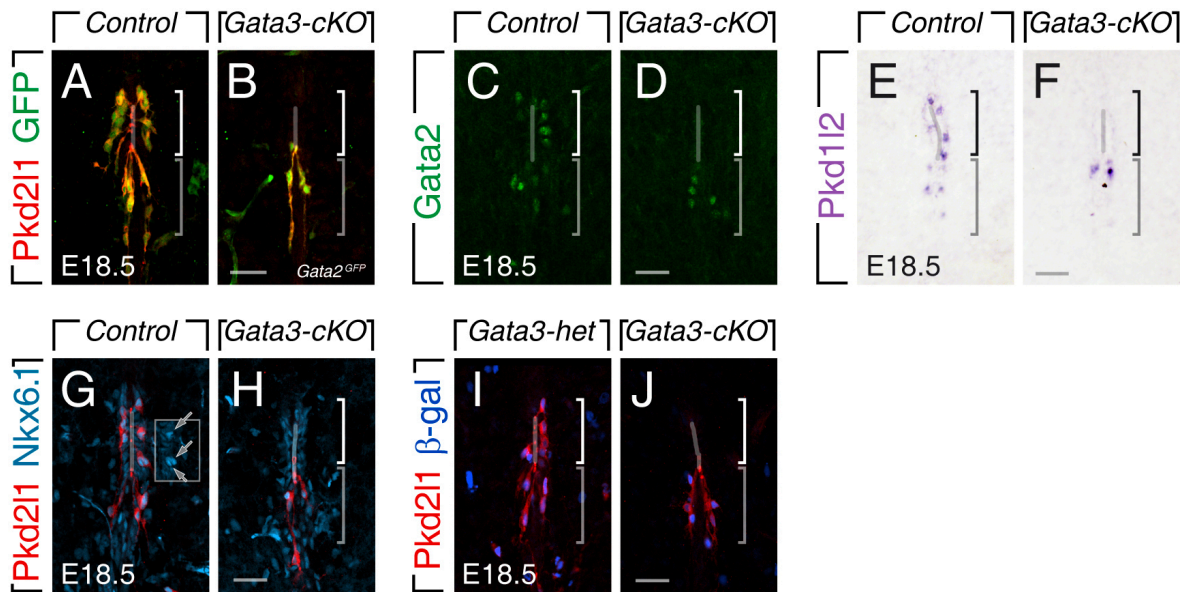


Figura 33. Las neuronas laterales al canal central están ausentes en los mutantes *Gata3*.

A-F. Cortes transversales de la médula espinal E18.5 sometidos a inmunohistoquímica con anticuerpos contra Pkd2l1, GFP (A,B) y Gata2 (C,D), e hibridados con una sonda contra Pkd1l2 (E,F). No se encontró expresión de GFP, ni de Gata2 en el epéndima lateral del tejido *Gata3-cKO*, mientras que la expresión en neuronas Ventral no presentó cambio en comparación con el *Control*. De forma similar, no se detectó señal en las hibridaciones *in situ* contra Pkd1l2. Barra de escala 30 μm (A-D) y 50 μm (E,F). **G,H.** Tinción con anticuerpos contra Pkd2l1 y Nkx6.1. Se observa que la estructura endimaria en los mutantes es relativamente normal. Sin embargo, en los *Gata3-cKO* la expresión es homogénea, mientras que en el *Control* se distingue niveles más elevados de Nkx6.1 en las neuronas Pkd2l1⁺ (flechas). Barra de escala 30 μm.

I,J. Secciones de médula espinal E18.5 de heterocigotas *Gata3^{LacZ/+}* y *Gata3-cKO (Nes:Cre;Gata3^{LacZ/flox})* teñidas contra Pkd2l1 y β-Gal. En los animales heterocigotas β-Gal se coexpresa con Pkd2l1 en los grupos Lateral y Ventral. No se detecta expresión β-Gal en los bordes del canal central *Gata3-cKO*, mientras que β-gal se preserva en las células Pkd2l1⁺ ventrales.

Por último, se examinó la expresión de β-gal del reportero *Gata3^{LacZ}*. Como se mostró anteriormente, β-gal se mantiene en todas las neuronas Pkd2l1⁺ de controles (Figura 19), mientras que en los *Gata3-cKO* se detecta sólo en células ventrales al canal central (Figura 33 I,J). Esta observación es interesante ya que la transcripción del reportero en las células laterales debería haberse iniciado normalmente, y marcar las células que abortaron su diferenciación neuronal. En experimentos preliminares (no mostrados) no se detectó Caspasa3-activada que pudiera justificar apoptosis en los *Gata3-cKO*. Es posible, por lo tanto, que la ausencia de β-Gal refleje mecanismos autoregulatorios de *Gata3*, donde *Gata3* controle positivamente su transcripción de forma directa o indirecta para mantener su expresión. Ese tipo regulatorio es un motivo común de genes selectores terminales que controlan aspectos del desarrollo postmitótico y del

mantenimiento adulto de identidades neuronales final y adulta (Deneris and Hobert, 2014).

Estos resultados indican que Gata3 cumple funciones esenciales en el desarrollo de las neuronas Pkd2l1 de la médula del ratón. Llama la atención que, a pesar de que Gata3 se expresa en el linaje de todos los grupos de células Pkd2l1⁺ (Figura 9-12), sea necesario para la especificación de los subgrupos Lateral, Distal-Lateral, en menor medida para el Distal-Ventral, pero dispensable para el subgrupo Ventral del canal central.

Estas observaciones son coherentes con la secuencia de activación génica descrita más arriba en esta tesis, donde en el dominio p2-pOL se activa primero Gata3, el cual es seguido por Gata2. Por lo tanto, la expresión de Gata3 es un paso crítico en la producción de los grupos Lateral y Distal-Lateral. Por otro lado, si bien se observó una reducción en el número de células Distal-Ventral, una parte de la población se diferencia en ausencia de Gata3. Esto podría ser consecuencia de su origen doble o bien representar una divergencia del programa de especificación p2-pOL.

Gata3 actúa dentro de una ventana temporal crítica

Las células Lateral y Distal-Lateral comparten su origen en los progenitores de los dominios p2-pOL, en cuya diferenciación Gata3 se activa tempranamente (Figura 9). Con el objetivo de determinar en qué fase de la trayectoria de diferenciación Gata3 cumple un rol crítico, se diseñó una serie de abordajes genéticos para eliminar Gata3 de forma controlada.

En primer lugar, se empleó el transgen *CAG:CreER* en combinación con el alelo *Gata3^{flox}*, que permite generar mutantes completos de acuerdo con el momento de la aplicación de Tamoxifeno. Estos experimentos se focalizaron en el efecto de Gata3 sobre las neuronas unidas al canal central. Con el fin de verificar el funcionamiento de la estrategia inducible, se aplicó Tamoxifeno a E12.5, antes del comienzo de la diferenciación. En la médula E18.5 *Gata3^{ΔE13}* (*CAG:CreER;Gata3^{LacZ/flox}*) se observó ausencia de Pkd2l1 en la región lateral al canal mientras que las células Ventral no

estuvieron afectadas (Figura 34 A-C), recapitulando el fenotipo de los *Gata3-nulos* y *Nes:Cre,Gata3-cKO*.

Para eliminar *Gata3* en una fase de la diferenciación más avanzada, posterior al inicio de su expresión (Figura 9, 10, 11), se trató con Tamoxifeno a E15.5 (Figura 34). Al analizar el número de células *Pkd2l1*⁺ en los ratones *Gata3*^{ΔE16} obtenidos, no se encontró un cambio significativo en ninguno de los *clusters* (Figura 34 D-F). Por lo tanto, la eliminación de *Gata3* en estadios tardíos no afecta la diferenciación de las neuronas del canal central, lo que sugiere que superó la etapa crítica en la cual *Gata3* establece la identidad neuronal.

A continuación, se generaron mutantes por autodelección de *Gata3* combinando el alelo *Gata3*^{Cre} con el alelo *flox*. Predecimos que en estos embriones hay una ventana temporal acotada de acción de *Gata3* antes de eliminarse. En este caso, se observó también una reducción significativa en el número de neuronas Lateral (Figura 34 G-I). Esto sugiere que la especificación de neuronas Lateral requiere una acción un poco más extendida de *Gata3*, aunque debe notarse en los *Gata3*^{Cre/flox} cuentan con aproximadamente 2 células *Pkd2l1*⁺ por sección, lo que contrasta con la ausencia completa en mutantes *Gata3-cKO*.

Considerando que *Pkd2l1* refleja las etapas finales de la especificación (Figura 11), se eliminó *Gata3* en esta fase usando la línea *Pkd2l1*^{Cre}, la cual tiene una eficacia de acción del 80-85% (Figura 34 J,K, reportero *td-Tomato*). En los *Pkd2l1*^{Cre};*Gata3-cKO* no se observó a P0 ninguna alteración en el número de células *Pkd2l1*⁺ (Figura 34 J-L). Por lo tanto, a pesar de que *Gata3* conserva su expresión en casi todas las células *Pkd2l1*⁺ en estadios perinatales (Figura 19), aparenta ser dispensable para mantener la identidad neuronal una vez establecida. No obstante, es posible que *Gata3* participe nuevamente controlando otros aspectos de su especialización terminal como la proyección axonal, la conectividad, o la expresión de canales y receptores.

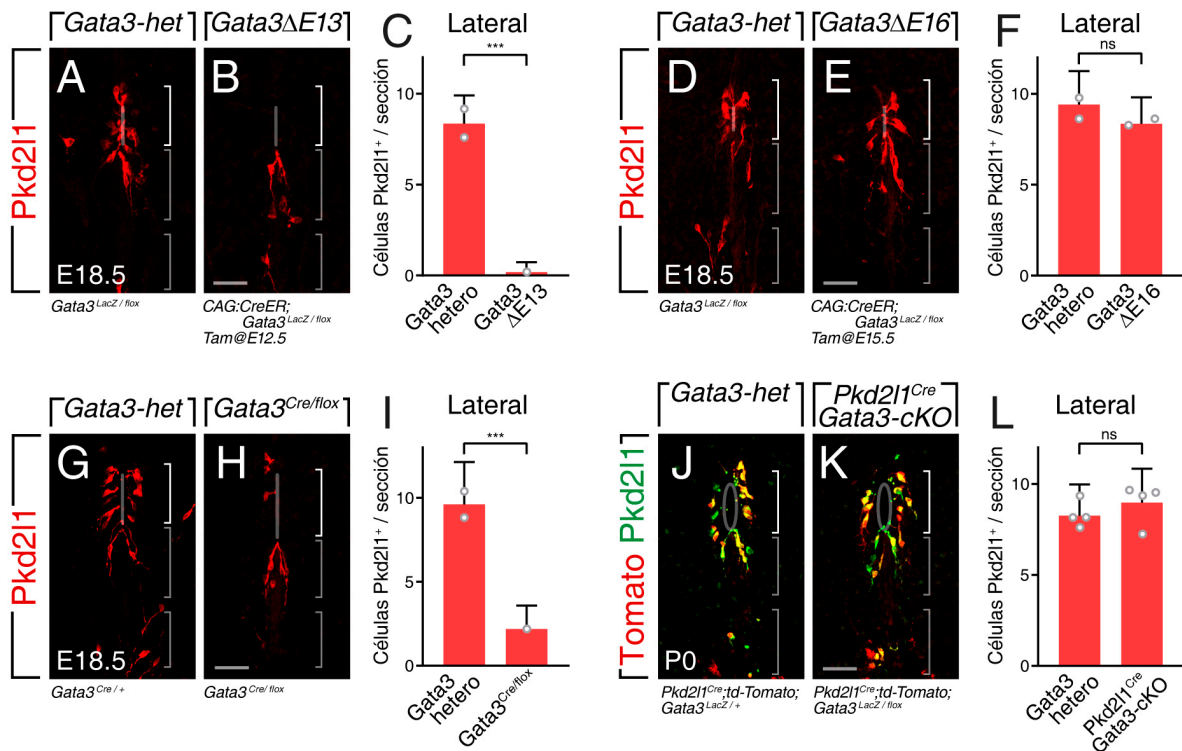


Figura 34. Gata3 actúa en la fase intermedia de la diferenciación de neuronas Lateral

A,B. Inmunohistoquímica contra Pkd2l1 en embriones E18.8 *Gata3*-heterocigotas y *Gata3*^{ΔE13}. La delección en *CAG:CreER;Gata3*^{LacZ/flox} por aplicación de Tamoxifeno (120 mg/kg) a E12.5 fenocopia los *Gata3*-cKO (*Nes:Cre*) y *Gata3*-nulos.

C. Cuantificación de las células Pkd2l1⁺ por sección. Se encontró ausencia de neuronas Pkd2l1⁺ de los grupos Lateral, Distal-Lateral (no mostrado), sin cambios en el número de células Ventral y Distal-Ventral (no mostrado). Las barras son media+DE (15 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=2-1); *** p<0.001 (Prueba de Mann-Whitney).

D,E. Tinción contra Pkd2l1 en la médula E18.5 *Gata3*-heterocigotas y *Gata3*^{ΔE16}, luego de inyección de Tamoxifeno (120 mg/kg) a E15.5.

F. Cantidad de las células Pkd2l1⁺ por sección. No se encontraron alteraciones en el número de células laterales en los mutantes, ns=no significativo (Prueba de Mann-Whitney), ni en los otros grupos (no mostrado). Las barras son media+DE (17 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=2).

G,H. Secciones E18.5 de animales *Control* y *Gata3*^{Cre/flox} teñidas contra Pkd2l1. Se observó una significativa disminución de neuronas del cluster Lateral (Prueba de Mann-Whitney) y Distal-Ventral (no mostrado).

I. Número de células Pkd2l1⁺ Lateral por sección. Nótese que el fenotipo no fue tan severo como el de *Gata3*-cKO (*Nes:Cre*), *nulos* o *ΔE13*, ni en los otros grupos (no mostrado). Las barras son media+DE (15 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=2-1); *** p<0.001, (Prueba de Mann-Whitney).

J,K. Inmunohistoquímica contra Pkd2l1 y Tomato en médula P0 *Control* y *Gata3*-cKO dependiente de *Pkd2l1*^{Cre}. Ensayos no-mostrados indican que el deletor *Pkd2l1*^{Cre} es selectivo para células Pkd2l1 y tiene una eficacia de acción del 80-85% (evaluado a P0 a través del reportero Tomato).

L. Cantidad de células Pkd2l1⁺ Lateral por sección. La delección de *Gata3* en fases finales de la diferenciación no produjo cambios en el número, ns=no-significativo (Prueba de Mann-Whitney). Las barras son media+DE (42 secciones), los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=4).

En conjunto, estos resultados muestran que Gata3 juega un rol crítico en la especificación postmitótica de las células Pkd2l1⁺ de la médula espinal. En particular tiene preponderancia en la producción neuronal en los dominios p2-pOL, con ausencia completa de los subgrupos Lateral y Distal-Lateral, y en menor medida para el *cluster* Distal-Ventral. Los análisis embrionarios muestran que, en el dominio p2-pOL, Gata3 se expresa río abajo de Ascl1 a E14.5-E15.5, y que precede y controla la inducción de Gata2 y Pkd2l1 (Figura 9-12, Figura 15). En concordancia con esos experimentos, la disección genética en distintas fases de la especificación demuestra que Gata3 ejerce su efecto crucial en las etapas intermedias antes del establecimiento de la identidad terminal. Experimentos adicionales serán necesarios para determinar el destino de los precursores que no logran continuar con el programa de especificación.

En contraste, las células Ventral que derivan de progenitores p3/fp, inducen ambos factores Gata de forma aproximadamente coincidente y se producen sin alteraciones en animales mutantes para Gata3. Esto plantea las hipótesis de que el desarrollo de las células Ventral sea exclusivamente dependiente de la acción de Gata2, o bien que la ausencia de Gata3 en los mutantes es compensada por Gata2.

La diferenciación de los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1 depende de Gata3/2

Con el fin de evaluar si Gata2 participa en la especificación de las neuronas del canal central, generamos animales mutantes condicionales al sistema nervioso *Gata2-cKO* (*Nes:Cre;Gata2^{GFP/flox}*). El análisis de la médula espinal E18.5 mostró que el número de células Pkd2l1⁺ es similar al encontrado en los individuos control (Figura 35 A-C). En particular no se encontraron diferencias en el tamaño de la población Ventral (Figura 35 F), la cual también se desarrollaba sin alteraciones en ausencia de Gata3. Por lo tanto, Gata2 es dispensable para la diferenciación y expresión de Pkd2l1, aunque no descartamos que Gata2 pueda estar implicado en regulaciones más específicas del fenotipo terminal.

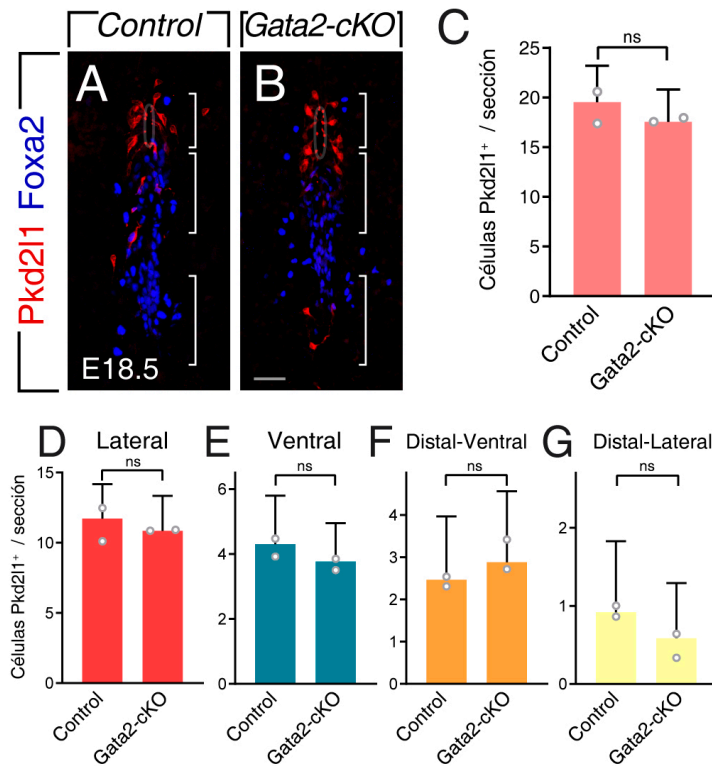


Figura 35. Gata2 es prescindible para la producción de las neuronas Pkd2l1

A-B. Secciones transversales de médula espinal E18.5 *Control* (A) y *Gata2-cKO* (*Nes:Cre;Gata2^{GFP/flox}*) teñidas contra Pkd2l1 y Foxa2. Los corchetes identifican las regiones de asentamiento de las subpoblaciones Lateral, Ventral y Distal-Ventral. Barra de escala 30 μ m.

C-G. Número total de células Pkd2l1⁺ en animales *Control* y *Gata2-cKO* (C), en los grupos Lateral (D), Ventral (E), Distal-Ventral (F) y Distal-Lateral (G). Las barras son media+DE (40 secciones) y cada círculo representa un individuo (n=2). ns=no significativo (Prueba de Mann-Whitney).

Los factores de transcripción Gata2 y Gata3 son los miembros de la familia Gata con más alta homología (Lowry and Atchley, 2000) y en algunos sistemas biológicos se ha demostrado que estos parálogos cumplen funciones redundantes (Home et al., 2017; Lahti et al., 2016).

Decidimos profundizar el análisis de Gata2/3 en la especificación de las neuronas Pkd2l1⁺ bajo la hipótesis de que Gata2 y Gata3 presentan algún solapamiento funcional. Esta posibilidad es particularmente relevante para el desarrollo de las neuronas del *cluster* Ventral, las cuales no requieren de la actividad de ninguna de las dos proteínas Gata por separado.

Con el objetivo de estudiar el grado de dependencia de los factores Gata3/2, se generó una colección de mutantes de Gata3/2 a E18.5 de forma tal de obtener las nueve combinaciones alélicas. En otras palabras, se obtuvieron ratones *wildtype*, *heterocigotas* para uno o ambos factores, mutantes simples, mutantes con el otro gen en heterocigosis y mutantes dobles (Figura 36). En cada caso se analizó el número de células Pkd2l1 de cada grupo, y se comparó la cantidad de células según la carga alélica de Gata2 y Gata3. Estos experimentos mostraron que cada grupo presenta diferentes requisitos de factores Gata para su diferenciación.

En primer lugar, se observó que las poblaciones Lateral y Distal-Lateral dependen estrictamente de Gata3, pero no de Gata2 (Figura 36 G,H). Las neuronas de estos grupos sólo fueron encontradas en la médula de animales con al menos un alelo de Gata3, sin importar la cantidad de alelos de Gata2 (Figura 36 G,H), como se había demostrado con los experimentos anteriores (Figura 31 y 32). Esto sugiere que las células Distal-Lateral siguen un programa de especificación muy similar al del grupo Lateral.

De manera similar, se observó que las neuronas Distal-Ventral disminuyen significativamente en ausencia de Gata3, en sus tres condiciones (*Gata3-cKO*, *Gata3-cKO;Gata2-Het*, *Gata3-cKO;Gata2-cKO*, Figura 36 C,E,F,I). El remanente Distal-Ventral en los *Gata3-cKO* va desapareciendo conforme se eliminan alelos funcionales Gata2 (Figura 36 I), lo que sugiere que Gata2 puede compensar la ausencia de Gata3, al menos parcialmente.

Finalmente, en el caso de las células Ventral se observó que el número de células cae a medida que se eliminan progresivamente alelos de Gata3/2 (Figura 36 A-F, J, K). En otras palabras, los tejidos *wildtype* con los cuatro alelos funcionales presentan el mayor número de células Ventral. Luego, cuando Gata3 o Gata2 está en heterocigosis se observa una caída, que se profundiza progresivamente a medida que se eliminan alelos de Gata3 o de Gata2. Esta disminución alcanza el mínimo en los ratones con uno o ningún alelo Gata (*Gata3-cKO;Gata2-Het*, *Gata2-cKO;Gata3-Het*, *Gata3-cKO;Gata2-cKO*, Figura 36 K). De esta forma, la producción de células Ventral depende directamente de la dosis génica de factores de transcripción Gata. Es interesante notar que, a diferencia de lo observado en los otros *clusters*, en este caso es indistinto si se trata de Gata3 o Gata2, lo cual indica que cumplen roles al menos parcialmente redundantes en la especificación de las neuronas Ventral. Esto también concuerda con el origen embrionario de estas neuronas en el dominio p3/fp, donde los factores Gata3/2 se activan en simultáneo (Figura 10-12).

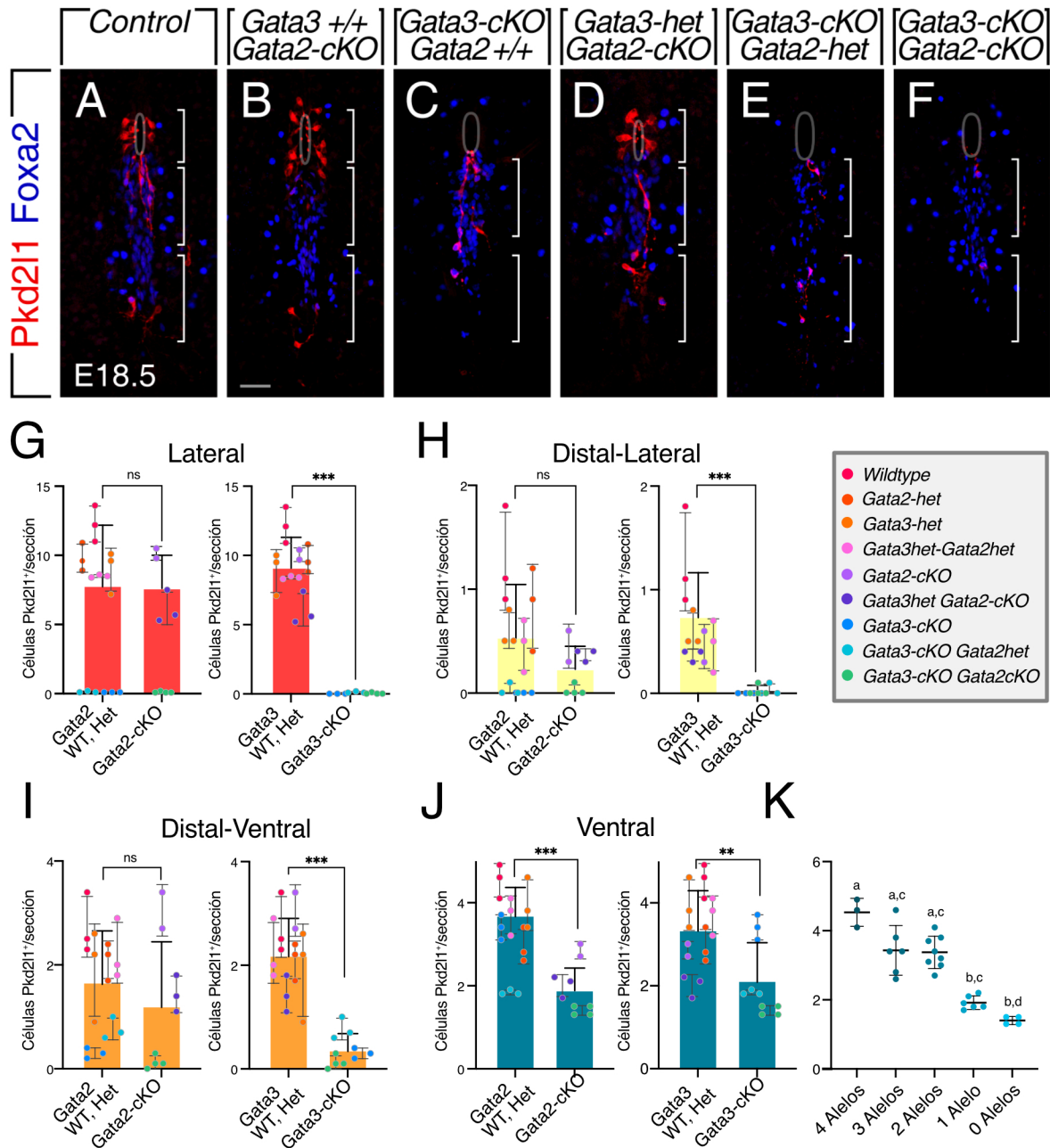


Figura 36. Cada grupo de neuronas Pkd2l1 tiene distinta dependencia de Gata3/2

A-F. Inmunohistoquímicas contra Pkd2l1 y Foxa2 en embriones E18.5 de los genotipos *Wildtype* ($Gata3^{+/+}; Gata2^{+/+}$) (**A**), $Gata3^{+/+}; Gata2-cKO$ ($Nes:Cre; Gata3^{+/+}; Gata2^{GFP/flox}$) (**B**), $Gata3-cKO; Gata2^{+/+}$ ($Nes:Cre; Gata3^{LacZ/flox}; Gata2^{+/+}$) (**C**), $Gata3-het; Gata2-cKO$ ($Nes:Cre; Gata3^{LacZ/+}; Gata2^{GFP/flox}$) (**D**), $Gata3-cKO; Gata2-het$ ($Nes:Cre; Gata3^{LacZ/flox}; Gata2^{GFP/+}$) (**E**), y $Gata3-cKO; Gata2-cKO$ ($Nes:Cre; Gata3^{LacZ/flox}; Gata2^{GFP/flox}$) (**F**). La delección progresiva de alelos *Gata3/2* afecta de manera diferencial a cada *cluster* de neuronas Pkd2l1. Los corchetes señalan las regiones que ocupan las poblaciones Lateral, Ventral y Distal-Ventral. Barra de escala 30 μm .

G-J. Cuantificación del número de neuronas Pkd2l1 por sección de los cuatro grupos. Se comparan los genotipos con al menos un alelo funcional de *Gata2* o *Gata3* ($Gata2$ WT, Het; $Gata3$ WT, Het) contra los que tienen dos alelos nulos. Cada círculo representa un embrión E18.5 y se marca con distintos colores cada genotipo.

Genotipos utilizados: $Gata3^{+/+}; Gata2^{+/+}$ (*Wildtype*) $n=3$, $Gata2-het$ ($Gata2^{GFP/+}$) $n=3$, $Gata3-het$ ($Gata3^{LacZ/+}$) $n=3$, $Gata3het-Gata2het$ ($Gata3^{LacZ/+}; Gata2^{GFP/+}$) $n=3$, $Gata2-cKO$

(*Nes:Cre;Gata2^{GFP/flox};Gata3^{+/+}*) n=2, *Gata3het Gata2-cKO (Nes:Cre;Gata3^{LacZ/+};Gata2^{GFP/flox})* n=3, *Gata3-cKO (Nes:Cre;Gata3^{LacZ/flox};Gata2^{+/+})* n=3, *Gata3-cKO Gata2-het (Nes:Cre;Gata3^{LacZ/flox};Gata2^{GFP/+})* n=3, *Gata3-cKO Gata2-cKO (Nes:Cre;Gata3^{LacZ/flox};Gata2^{GFP/flox})* n=4. Las barras son media+DE; ns=no significativo, **p<0.01, ***p<0.001 (Prueba de Mann-Whitney).

I. Número de neuronas Pkd2l1 del grupo Ventral en función de la cantidad de alelos *Gata3/2* funcionales (0-4). Los círculos indican mediciones en distintos embriones (n=27). Grupos que no comparten letras difieren significativamente (p<0.05, prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn). Los datos ajustan a un modelo de regresión lineal $r^2=0.78$.

Estos experimentos demuestran que los factores de transcripción *Gata3/2* cumplen roles clave en la diferenciación de las neuronas Pkd2l1 de la médula espinal del ratón. Cada *cluster* muestra diferentes requisitos de actividad de factores *Gata* para su diferenciación, los cuales coinciden, a grandes rasgos, con la secuencia de activación de genes *Gata* en sus precursores. De esta forma, las neuronas Lateral y Distal-Lateral, que derivan del dominio p2-pOL donde se activa primero *Gata3*, muestran una fuerte dependencia de *Gata3*. En cambio, las células Ventral que se producen p3/fp donde las proteínas *Gata3/2* se coactivan, presentan una dependencia graduada de la cantidad de alelos *Gata* funcionales. Finalmente, las células Distal-Ventral dependen principalmente de *Gata3*, pero se observó que *Gata2* podría reemplazar parcialmente su ausencia. Esto las diferencia de las otros *clusters* de origen p2-pOL e indica que podrían seguir un programa de especificación celular diferente, o podría reflejar el origen mixto que encontramos para esta población.

DISCUSIÓN

Las neuronas que contactan con el líquido cefalorraquídeo fueron descritas inicialmente en anfibios por Kolmer y Agduhr (Agduhr, 1922; Kolmer, 1921) a principios del siglo XX. Desde entonces se ha encontrado que este tipo celular está conservado en los distintos grupos de vertebrados estudiados (Djenoune et al., 2014; Jalalvand et al., 2014; Vigh et al., 1983). Sin embargo, la disección del programa que gobierna su especificación y la diversidad de este tipo neuronal no ha sido completamente resuelto.

LAS NEURONAS DEL CANAL CENTRAL SE SUBDIVIDEN EN CUATRO GRUPOS

En este trabajo encontramos que las neuronas del canal central espinal pueden ser divididas en cuatro subgrupos, Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral, según su ubicación anatómica, morfología y expresión de marcadores moleculares. La mayoría de las células Pkd2l1⁺ en estadios perinatales corresponden al grupo Lateral, previamente denominado CSF-cN'. El soma de estas neuronas se encuentra dentro de la capa endimaria o subendimaria y extienden sus axones hacia el funículo ventral. Las neuronas Ventral, anteriormente nombradas CSF-cN", representan en número la segunda población. Estas células se anclan al extremo ventral del canal central, alinean su soma con la línea media y también proyectan sus axones hacia el borde ventral de la médula espinal. Las neuronas Pkd2l1⁺ de los grupos Lateral y Ventral representan las CSF-cN tradicionales, descritas en las distintas especies de vertebrados (Djenoune et al., 2014; Djenoune and Wyart, 2017; Jalalvand et al., 2014; Stoeckel et al., 2003; Vigh et al., 1983; Wyart et al., 2023).

En contraste, los grupos distales que pierden el contacto apical y pueblan regiones diferentes del parénquima espinal, habían sido mayormente soslayados en los estudios previos. Por un lado, las células del grupo Distal-Ventral se ubican en la región ventromedial, en la proximidad del surco ventral de la médula espinal. A diferencia del subgrupo Ventral, han perdido la especialización apical que contacta con el CSF durante su desarrollo. Las células del *cluster* Distal-Lateral, en cambio, se encuentran diseminadas en el parénquima lateral de la médula espinal y representan la menor cantidad de células. Es interesante resaltar que la localización distal parece ser

específica de amniotas, ya que solo hay algunas evidencias de su existencia en roedores (Jurcic et al., 2021; Tonelli Gombalova et al., 2020), conejos (Tonelli Gombalova et al., 2020) y aves (Stanchak et al., 2022). Sin embargo, no hay reportes que hayan distinguido células Pkd2l1⁺ distales en otros organismos vertebrados como pez cebra o lamprea, donde las CSF-cN han sido estudiadas en profundidad (Andrzejczuk et al., 2018; Djenoune et al., 2014; Jalalvand et al., 2014; Wyart et al., 2023; Yang et al.).

Un trabajo reciente de Jurcic et al. (2021) describió en la médula de ratones adultos un grupo de células que denominaron dPKD2L1, cuya ubicación y morfología coincide, a grandes rasgos, con el grupo Distal-Ventral. Sin embargo, los autores agruparon las células Distal-Ventral con células que consideramos parte del subgrupo Ventral, ya que describen que una porción de las dPKD2L1 forma ‘ramilletes’, se alinea con la línea media ventral y mantiene el contacto con el canal central. Estas son características propias de las células Ventral descritas en esta tesis y en estudios previos (Kutna et al., 2014; Petracca et al., 2016; Yang et al., 2010). En esta tesis se demuestra que, si bien los territorios de las células Ventral y Distal-Ventral pueden solaparse, estos grupos no sólo difieren en su morfología sino también en su origen ontogénico, dependencia de la proteína proneural *Ascl1*, programa de especificación celular y expresión de *Foxa2*, lo cual refuerza que se trata de dos subtipos diferentes.

Los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1 espinales presentan una serie de características en común. Los rastreos de linaje en ratones *Ascl1^{CreER}*, demuestran que las neuronas de los cuatro *clusters* derivan de progenitores tardíos *Ascl1⁺*. A su vez, la expresión de *Nkx6.1* en la totalidad de las células Pkd2l1⁺ refleja su origen en dominios ventriculares ventrales. La expresión de los factores de transcripción *Gata3* y *Gata2* es también común a los cuatro subtipos Pkd2l1⁺. Sumado a esto, las neuronas Pkd2l1⁺ tienen niveles bajos o nulos de las proteínas *Sox9* y *Foxj1*, asociadas a identidades no neuronales.

Se ha encontrado que las CSF-cN de ratón tienen características de neuronas inmaduras, como la expresión de *Doublecortin* y *Sox2*, bajos niveles de *NeuN* (Petracca et al., 2016; Stoeckel et al., 2003), elevada resistencia de membrana (Di Bella et al., 2019; Orts-Del'Immagine et al., 2020; Sternberg et al., 2018), y maduración incompleta

del gradiente de cloruro (Riondel et al., 2024). Consistente con esto, encontramos que los cuatro grupos de células Pkd2l1⁺ expresan Sox2 y niveles bajos o ausencia de NeuN, aunque algunas células distales muestran niveles comparables al resto de las neuronas espinales. Esto podría sugerir que sufren una maduración neuronal acelerada respecto a los grupos anclados al canal central.

Finalmente, encontramos que Foxa2 distingue a la población Ventral y a una parte minoritaria de la Distal-Ventral. Considerando que Foxa2 es característico del extremo ventral del dominio p3, este hallazgo implica que, al igual las neuronas Ventral, una parte minoritaria (10-20%) del grupo Distal-Ventral desciende de los progenitores ventriculares en la frontera con la placa de piso del tubo neural.

En conjunto, los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1 del canal central pueblan regiones distintivas de la médula espinal perinatal. Las observaciones aquí presentadas revelan que comparten una misma identidad neuronal y que Foxa2 distingue selectivamente a las neuronas Pkd2l1 con ancestría en los progenitores del extremo ventral.

DOS FUENTES PROGENITORAS PARA CUATRO SUBTIPOS NEURONALES

En el ratón las células Lateral y Ventral (previamente descriptas como CSF-cN' y CSF-cN'") se originan de células ventriculares Ascl1⁺ tardías en la región p2-pOL y p3/fp, respectivamente (Di Bella et al., 2019; Petracca et al., 2016). Los estudios de linaje aquí mostrados indicaron que los grupos distales también derivan de los progenitores Ascl1⁺ tardíos con similares características (Figura 37).

Para elucidar cuál es la fuente de neuronas de los subgrupos distales, utilizamos ratones mutantes de Pax6 en los que los progenitores p2-pOL, pero no los p3/fp, pierden la capacidad neurogénica. En los Pax6^{-/-} se encontró ausencia de las células Pkd2l1⁺ Lateral, Distal-Lateral y Distal-Ventral, sin alteración de las Ventral. Esto indica que los grupos Lateral, Distal-Lateral y la mayor parte del Distal-Ventral proceden de la región p2-pOL del tubo neural (Figura 37). Sin embargo, si bien en la médula Pax6 mutante hay una significativa reducción de células Distal-Ventral, las neuronas remanentes en este

grupo son *Foxa2*⁺. Por lo tanto, estas evidencias refuerzan que, a diferencia de los otros tres grupos, el *cluster* Distal-Ventral es una población mixta, compuesta por células que derivan de las dos fuentes progenitoras embrionarias (Figura 37).

En la Figura 37 se presenta una representación esquemática de los cuatro *clusters* de neuronas *Pkd2l1*⁺ de la médula espinal y la relación de cada grupo con los dominios progenitores que las generan.

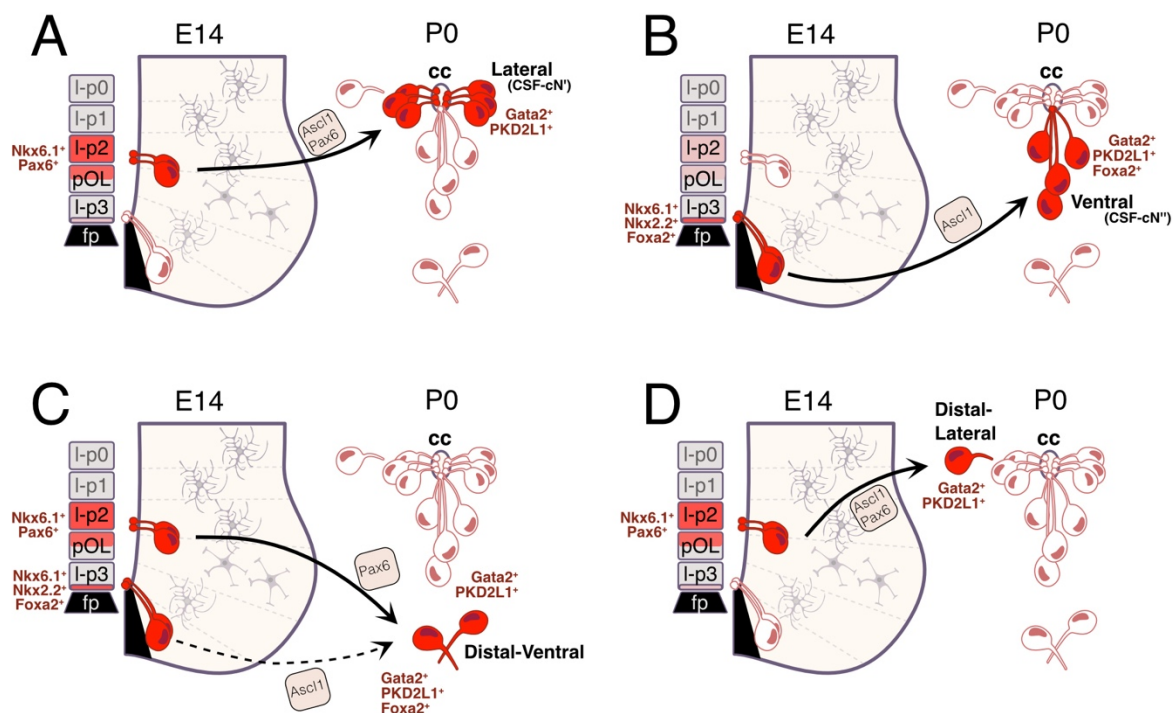


Figura 37. Los cuatro grupos de neuronas del canal central derivan de progenitores p2-pOL y p3.

Esquemas del origen ontogénico de cada subgrupo de neuronas *Pkd2l1*⁺ del canal central de la médula espinal del ratón. A la izquierda se muestra los dominios progenitores ventrales tardíos al estadio E14, en rojo se marca las regiones que generan neuronas *Pkd2l1* del *cluster* en cuestión. A la derecha se representa la distribución en estadios perinatales (P0), donde se marca en rojo las neuronas del subgrupo de interés. Sobre las flechas (en cajas) se indica factores críticos de la diferenciación.

A P0 los cuatro subgrupos expresan *Pkd2l1* y *Gata2* pero sólo las Ventral y parte de las Distal-Ventral se identifican por *Foxa2*. **A,D.** Los *clusters* Lateral y Distal-Lateral se diferencian a partir de progenitores *Ascl1*⁺ de la región *Nkx6.1*⁺, *Pax6*⁺ p2-pOL. **B.** El grupo Ventral se origina de los progenitores p3 *Nkx6.1*⁺ *Nkx2.2*⁺ *Foxa2*⁺. **C.** Las neuronas Distal-Ventral tienen origen dual, siendo mayoritaria la descendencia p2-pOL (*Nkx6.1*⁺ *Pax6*⁺) y con una contribución menor del p3 (*Nkx6.1*⁺ *Nkx2.2*⁺ *Foxa2*⁺).

PROGRAMAS DE LA ESPECIFICACIÓN NEURONAL PKD2L1

Secuencias de activación génica en la diferenciación neuronal

Los progenitores *Ascl1*⁺ tardíos de los dominios ventriculares p2-pOL y p3 se diversifican en los cuatro subgrupos de neuronas *Pkd2l1*⁺. Para estudiar el curso de la especificación de las células *Pkd2l1*⁺ utilizamos mapeos de progenie con el deletor *Ascl1*^{CreER}, asistidos además por los reporteros genéticos *Gata3*^{LacZ}, *Gata2*^{GFP} y *Gata3*^{Cre}. El análisis detallado de los experimentos de expresión nos permitió deducir una secuencia de activación génica durante la especificación de las neuronas *Pkd2l1*, con las particularidades distintivas de cada región progenitora.

La diferenciación en el dominio p2-pOL involucra la activación sucesiva de *Gata3* y *Gata2* río abajo de *Ascl1*, donde *Gata3* precede a *Gata2*. Esta secuencia tiene relevancia funcional dado que los mutantes de *Gata3* fallan en la inducción de *Gata2* y consecuentemente en la producción de los tres subtipos neuronales *Pkd2l1*⁺ producidos en este dominio ventricular (Figura 38). Los experimentos de manipulación de *Gata3* controlada en el tiempo indican que la acción crítica de *Gata3* está restringida a una fase intermedia de la diferenciación postmitótica.

En cambio, en el dominio p3, ambos factores comienzan a expresarse de forma temporalmente coincidente en la trayectoria de la especificación neuronal. En línea con la coexpresión, en los mutantes simples de *Gata3* o de *Gata2* no se altera la presencia del otro factor *Gata* (Figura 38).

En el sistema nervioso central la activación de *Gata2* está generalmente río arriba de la expresión de *Gata3* (Kala et al., 2009; Nardelli et al., 1999). Ejemplos de este orden son la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal y de las interneuronas V2b de la médula espinal, donde la expresión de *Gata2* antecede y regula la activación de *Gata3* (Haugas et al., 2016; Peng et al., 2007). En ambos casos la eliminación de *Gata2*, pero no de *Gata3*, provoca un cambio en el destino celular.

En contraste, los resultados de este trabajo muestran que las células de origen p2-pOL presentan un ordenamiento invertido, en el cual *Gata3* antecede a *Gata2*, controla su expresión y es un determinante crítico de la especificación de neuronas *Pkd2l1*⁺ Lateral,

Distal-Lateral y Distal-Ventral. Esta activación secuencial podría ser un ejemplo de *Gata switch*, donde *Gata3* inhibe la expresión de *Gata2* mediante la unión a dos elementos regulatorios del locus *Gata2*. *Gata3* es luego desplazado, posibilitando la expresión de *Gata2* (Ray et al., 2009).

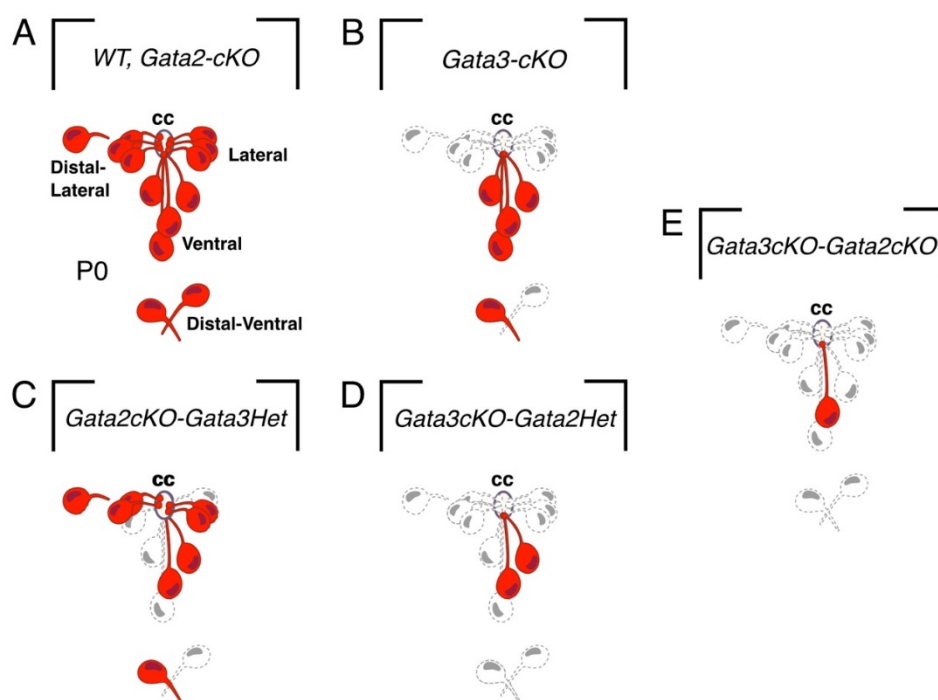


Figura 38. Fenotipos de mutantes condicionales *Gata3/2*

Esquemas de la distribución de neuronas *Pkd2l1* en los distintos genotipos de mutantes condicionales de factores *Gata3/2* al estadio P0. Se representa en rojo las neuronas producidas en cada caso. **A.** Tanto en ratones *wildtype* (WT) como en mutantes de *Gata2* se representan las condiciones control de los cuatro *clusters*. **B.** Los ratones *Gata3-cKO* carecen de neuronas Lateral y Distal-Lateral, y de parte de las Distal-Ventral. **C.** En *Gata2-cKO;Gata3-Het* hay una leve reducción en el número de células Lateral, Distal-Ventral y Ventral. **D.** En *Gata3-cKO;Gata2-Het* se reduce el número de células Ventral y Distal-Ventral. **E.** Los mutantes doble sólo presentan un número residual del subgrupo Ventral. cc.canal central.

En la diferenciación p3, en cambio, ambos factores *Gata* se activan a la vez, de manera independiente y sin evidenciar regulaciones mutuas. El desarrollo de las neuronas Ventral no requiere una proteína *Gata* específica, sino que depende de manera sorprendentemente lineal de la dosis alélica total de *Gata3/2*. Por lo tanto, *Gata3/2* cumplirían funciones redundantes, donde ambas podrían accionar sobre blancos transcripcionales compartidos o actuar como factores pioneros en la remodelación

cromatínica (Tremblay et al., 2018). El rol combinado de Gata3/2 en las neuronas del p3 de ratón contrasta con las observaciones hechas en pez cebra, donde el desarrollo de las neuronas CSF-cN” depende estrictamente de Gata2 (Andrzejczuk et al., 2018; Yang et al., 2010). En cambio, la diferenciación Ventral se asemeja a la especificación de las neuronas D-GABA (neuronas GABAérgicas asociadas a dopaminérgicas) del cerebro medio de ratón. Estas no son afectadas por la eliminación de Gata2 o de Gata3, pero la ausencia de ambos aborta completamente su desarrollo (Lahti et al., 2016).

Modelo de la especificación de los subgrupos de neuronas Pkd2l1⁺

Considerando los resultados de esta tesis, proponemos un modelo que resume la secuencia de activación génica de cada grupo de neuronas Pkd2l1 y los pasos más relevantes de la regulación transcripcional (Figura 39).

Por un lado, los progenitores Ascl1⁺ de la región p2-pOL que originarán las neuronas Lateral inducen rápidamente Gata3, que luego activará Gata2 para concluir en una neurona Pkd2l1⁺ diferenciada (Figura 39 A). Dado que las neuronas Distal-Lateral se comportan muy similarmente a las Lateral, probablemente sigan el mismo programa de diferenciación, aunque con los cambios de localización luego del desprendimiento del ventrículo (Figura 39 A).

Por otro lado, los progenitores p3/fp Ascl1⁺ darán origen principalmente a neuronas del grupo Ventral. Durante su diferenciación estas neuronas coactivan Gata3 y Gata2 (en un estadio más tardío respecto a los tiempos del p2-pOL) para luego expresar Pkd2l1 que caracteriza este tipo neuronal (Figura 39 C).

Además de células Ventral, estos progenitores también producen un número minoritario de neuronas Distal-Ventral, cuya especificación también depende de Ascl1 y sigue el programa de diferenciación celular del grupo Ventral (Figura 39 C).

Finalmente, los progenitores p2-pOL también darán lugar a la mayoría de las células Distal-Ventral. La dispensabilidad de Ascl1 para su producción sugiere la participación de otros genes proneurales, como Neurog2. Asimismo, es posible que el

desprendimiento de los precursores del ventrículo actúe como disparador de su diferenciación independiente de Ascl1 (Figura 39 B).

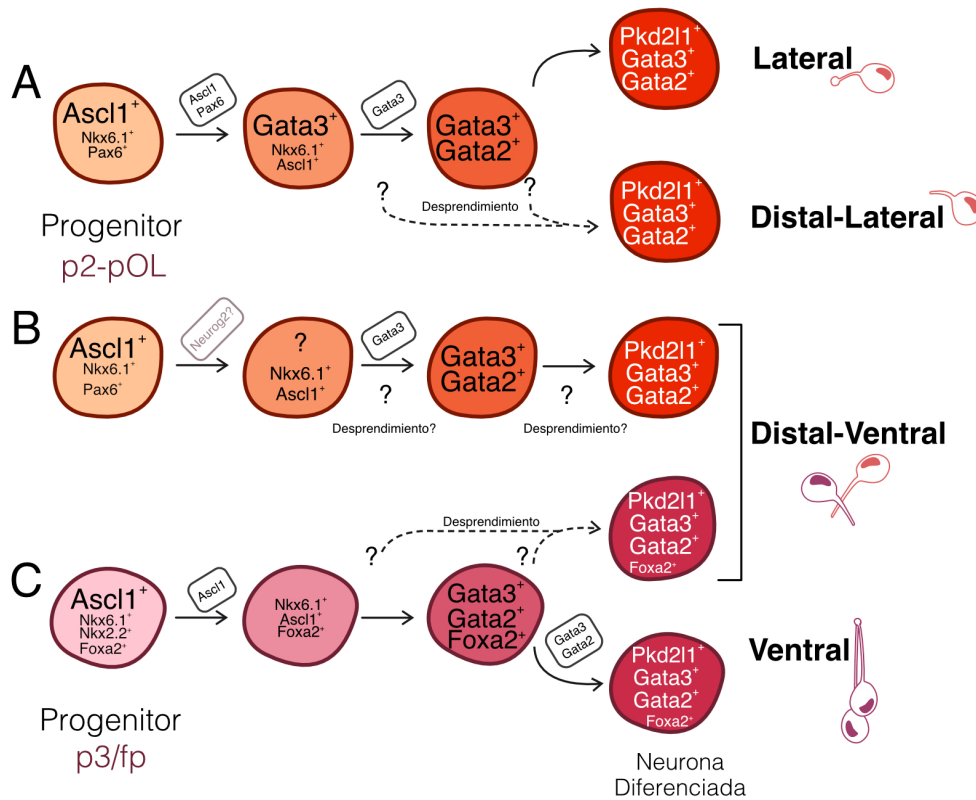


Figura 39. Secuencias de activación génica en la diferenciación de los cuatro clusters de neuronas del canal central.

A. Progenitores p2-pOL Nkx6.1⁺,Pax6⁺ que expresan Ascl1 activan primero Gata3 y luego Gata2 y Pkd211, para dar origen a las neuronas de los grupos Lateral y Distal-Lateral, cuyo desarrollo requiere Ascl1 y Gata3 (cajas). **B.** Progenitores p2-pOL Nkx6.1⁺,Pax6⁺,Ascl1⁺ activan Gata3 y Gata2 generando neuronas Distal-Ventral. Su desarrollo es independiente de Ascl1 y podría ser resultado de la derepresión ejercida por determinantes apicales o de la participación de Neurog2. **C.** Los progenitores p3/fp Ascl1⁺,Nkx6.1⁺,Foxa2⁺ coactivan Gata3 y Gata2 produciendo neuronas Pkd211⁺ Ventral y Distal-Ventral.

Las cajas sobre las flechas indican factores de transcripción críticos para esa transición. El gris marca el potencial rol de Neurog2 en la diferenciación de las neuronas Distal-Ventral y las flechas en línea punteada con signos de interrogación señalan posibles fases donde podría ocurrir el desprendimiento de las células distales.

DETERMINANTES APICALES, DIFERENCIACIÓN NEURONAL Y DELAMINACIÓN

Las células Lateral y Ventral no sufren la abscisión apical

Las CSF-cN son neuronas atípicas. A nuestro entender, las neuronas del canal central de los grupos Lateral y Ventral son la única clase de neuronas en el sistema nervioso central que mantienen su anclaje apical durante la diferenciación y en la adultez. El desarrollo de las CSF-cN contrasta con la diferenciación neuronal clásica, en la cual los precursores neuronales cortan su pie apical para desprenderse del neuroepitelio ventricular y luego migrar hacia la zona del manto (Das and Storey, 2014; Ge et al., 2006; Rouso et al., 2012). Esto implica que, a diferencia del resto de las neuronas, la diferenciación y el desprendimiento están desconectados durante su neurogénesis. Las CSF-cN del canal central guardan similitudes con las neuronas receptoras del epitelio olfatorio que presentan una morfología bipolar, tienen una protusión apical expandida que se baña en la mucosa y extienden un axón basal que transmite la información olfatoria (Brann and Firestein, 2014). Al igual que las neuronas del canal central, las células olfativas se producen localmente a partir de progenitores residentes en el mismo epitelio (Brann and Firestein, 2014). Este comportamiento peculiar podría deberse a varios factores interconectados, incluyendo N-cadherina, pequeñas GTPasas, proteínas de polaridad y factores de transcripción bHLH, Foxp y/o Sox.

Las células progenitoras se adhieren a la superficie luminal a través de uniones adherentes entre células vecinas que contienen N-cadherina. La disociación de estas uniones adherentes es normalmente un requisito para la salida de la zona ventricular y el comienzo de la diferenciación neuronal. Zhang *et al* (2010) y Rouso *et al* (2012) han aportado evidencia sólida de que, tanto en la médula espinal como en el cerebro, los factores de transcripción Foxp son esenciales para promover la delaminación durante la neurogénesis, mediante la represión de N-cadherina y la disrupción de las uniones adherentes. Aunque no sabemos si las proteínas Foxp se expresan en los precursores espinales tardíos, este proceso debería estar suprimido durante la diferenciación de las CSF-cN. Un posible mecanismo es el hecho que las CSF-cN mantienen atípicamente una expresión alta de Sox2 (como se muestra en esta tesis), lo que ha demostrado

activar la transcripción de N-cadherina y mantener la adhesión apical (Matsumata et al., 2005; Rouso et al., 2012).

La familia Rho de GTPasas pequeñas, incluyendo RhoA y Cdc42, son reguladores clave del citoesqueleto de actina en el polo apical de los progenitores, modulando tanto la estabilidad de las uniones adherentes como la integridad del neuroepitelio (Cappello et al., 2006; Herzog et al., 2011; Katayama et al., 2011). Por otro lado, se ha encontrado que las proteínas bHLH (como Neurog1/2 y Ascl1) promueven la salida de la zona ventricular mediante la downregulación (directa e indirecta) de la actividad de las pequeñas GTPasas Rho (Ge et al., 2006; Pacary et al., 2011). Aún queda por esclarecer cómo Ascl1 activa el programa neurogénico de las CSF-cN sin inducir la migración celular. Ge et al (2006) han demostrado que, en la corteza, mutaciones en Neurog2 que eliminan sitios susceptibles a modificaciones postraduccionales bloquean la migración celular sin afectar su capacidad de iniciar el programa neurogénico. Estudios más recientes han mostrado que Ascl1 también sufre un conjunto complejo de fosforilaciones que influyen profundamente en sus actividades (Guillemot and Hassan, 2017). Será necesario realizar estudios dedicados para determinar si la disociación entre la diferenciación neuronal y el desprendimiento apical observada en los progenitores espinales tardíos de las neuronas del canal central está relacionada con modificaciones postraduccionales particulares de Ascl1.

Delaminación de los grupos distales

Un estudio reciente identificó que en la subcepa de ratones C57B6/N las células Pkd2l1⁺ pierden masivamente su anclaje apical y se reubican en la región ventral de la médula espinal (Tonelli Gombalova et al., 2020), de manera similar a las células Distal-Ventral. Este fenotipo es exclusivo a los ratones C57BL/6N y se ha identificado que los polimorfismos en las proteínas de polaridad apical Crumbs1 y Cyfip2 son responsables del posicionamiento ectópico de las neuronas Pkd2l1 en la médula de los C57BL/6N (Tonelli Gombalova et al., 2020). El rol que cumple la posible *downregulación* de estos determinantes apicales en la delaminación de las neuronas Distal-Ventral se encuentra actualmente bajo estudio en el laboratorio.

Por último, se ha observado que el congestionamiento o la constricción apical en el neuroepitelio, pueden inducir el desprendimiento celular (Okamoto et al., 2013). Es posible que durante el remodelado de la zona ventricular que acompaña el cierre del ventrículo para formar el canal central (Canizares et al., 2020; Tait et al., 2020), se generen fuerzas mecánicas que promuevan el desprendimiento de las neuronas que se asentarán en regiones distales.

CONCLUSIONES

Las neuronas en contacto con el canal central representan una población de neuronas espinales emblemática. En este trabajo se demuestra que este tipo neuronal está compuesto por cuatro *clusters*: Lateral, Ventral, Distal-Ventral y Distal-Lateral. Encontramos que en estadios perinatales cada grupo ocupa regiones distintivas de la médula espinal, pero presentan un perfil de expresión molecular común. Los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1⁺ se diferencian a partir de progenitores Ascl1 de los dominios ventrales p2-pOL y p3 a partir del estadio E14, durante la fase gliogénica del desarrollo espinal. Los progenitores p2-pOL y p3 muestran diferencias en la secuencia de activación de factores Gata3/2 río abajo de Ascl1. Demostramos además que Gata3, pero no Gata2, es crítico para la diferenciación de las células Lateral y Distal-Lateral. Las neuronas Distal-Ventral, se diferencian aún en ausencia de Ascl1 y muestran también mayor dependencia de Gata3. Por último, las células Ventral dependen de la dosis total de los parálogos Gata que cumplen funciones redundantes en su diferenciación. Por lo tanto, en este trabajo de tesis se describe por primera vez dos grupos adicionales de neuronas Pkd2l1, así como los mecanismos genéticos detrás de la especificación de los cuatro subtipos neuronales.

ANEXO I

	Grupo	Células Gata2 ⁺	Células GFP ⁺	Células Gata2 ⁺ GFP ⁺	Células totales	n embriones
E14.7	Todos	0	5	93	98	2
P0	Todos	0	2	385	387	3

Tabla4. *Gata2^{GFP}* recapitula la expresión de Gata2 endógeno. Datos relacionados Figura 8.

	Grupo	Células Gata3 ⁺	Células β-gal ⁺	Células Gata2 ⁺ β-gal ⁺	Células totales	n embriones
	Todos	66	52	520	638	
E14.7	Neuronas V2b (Zona marginal)	0	52	474	526	1
	Zona Ventricular	66	0	46	112	

Tabla5. *Gata3^{LacZ}* recapitula la expresión de Gata3 endógeno. Datos relacionados Figura 8.

Células Tomato⁺						
	Grupo	Gata3 ⁺ cells	Células Tomato ⁺ totales		n embriones	
	Todos	8	84			
E14.0	Células p2/p0L	8	70		2	
	Células p3/fp	0	14			
	Todos	102	327			
E14.5	Células p2/p0L	99	234		6	
	Células p3/fp	3	93			
	Todos	61	131			
E15.5	Células p2/p0L	58	106		4	
	Células p3/fp	3	25			
	Todos	156	256			
E16.5	Células p2/p0L	131	203		2	
	Células p3/fp	25	53			

Tabla 6. Expresión de Gata3 (mediante *Gata3^{LacZ}*) en el linaje Ascl1 tardío. Datos relacionados Figura 9

		Células Tomato ⁺		n embriones
	Grupo	Células Gata2 ⁺	Células Tomato ⁺ totales	
	Total	0	15	
E14.0	Células p2/p0L	0	10	1
	Células p3/fp	0	5	
	Total	44	282	
E14.5	Células p2/p0L	40	211	5
	Células p3/fp	4	71	
	Total	107	234	
E15.5	Células p2/p0L	90	181	3
	Células p3/fp	17	53	
	Total	316	406	
E16.5	Células p2/p0L	251	316	3
	Células p3/fp	65	90	

Tabla 7. Expresión de Gata2 (mediante *Gata2^{GFP}*) en el linaje Ascl1 tardío. Datos relacionados Figura 9

		Células Tomato ⁺		n embriones
	Grupo	Células Nkx6.1 ⁺	Células tomato ⁺ totales	
	Todos	97	100	
E14.5	Células p2/p0L	70	73	3
	Células p3/fp	27	27	
	Todos	118	118	
E16.5	Células p2/p0L	94	94	3
	Células p3/fp	24	24	

Tabla 8. Expresión de Nkx6.1 en el linaje Ascl1 tardío. Datos relacionados Figura 9

	Grupo	Células Gata3 ⁺	Células Gata3 ⁺ Gata2 ⁺	Células Gata2 ⁺	Células totales	n embriones
E14.5	Grupo	211	174	38	423	4
	Células p2/p0L	211	157	23	391	
	Células p3/fp	0	17	15	32	
E15.5	Grupo	446	825	155	1426	7
	Células p2/p0L	444	724	88	1256	
	Células p3/fp	2	101	67	170	

Tabla 9. Expresión de Gata2 y Gata3 visto por sus reporteros genéticos *Gata2^{GFP}* y *Gata3^{LacZ}* en células p2-p0L y p3/fp. Datos relacionados Figura 10

Gata3^{Cre};CAG:LSL-tdTomato					
	Grupo	Células Tomato ⁺ Gata2 ⁺	Células Gata2 ⁺	Células totales	n embriones
E15.5	Todos	162	17	179	2
	Células p2/p0L	162	11	173	
	Células p3/fp	11	6	17	
E16.5	Todos	483	30	513	2
	Células p2/p0L	358	3	361	
	Células p3/fp	132	27	159	
E18.5	Todos	285	0	285	2
	Células p2/p0L	202	0	202	
	Células p3/fp	83	0	83	

Tabla 10. Expresión de Gata2 visto por *Gata2^{GFP}* en células del linaje *Gata3^{Cre};td-Tomato*. Datos relacionados Figura 10.

	Grupo	Células Gata2 ⁺	Células Gata2 ⁺ Pkd2l1 ⁺	Células Pkd2l1 ⁺	Células totales	n embriones
	Todos	128	67	0	195	
E14.5	Células p2/p0L	116	54	0	170	3
	Células p3/fp	12	13	0	25	
	Todos	79	435	10	524	
E15.5	Células p2/p0L	51	376	8	435	5
	Células p3/fp	28	59	2	89	

Tabla 11. Temporalidad de la activación de Gata2 (visto por el reportero *Gata2^{GFP}*) y Pkd2l1 en células p2-p0L y p3/fp. Datos relacionados Figura 11.

	Grupo	Células Gata3 ⁺	Células Pkd2l1 ⁺		Sin marcador	Células Pkd2l1 ⁺ totales	n embriones
			Células Gata3 ⁺ Gata2 ⁺	Células Gata2 ⁺			
	Todos	0	43	18	0	61	
E14.5	Células p2/p0L	0	27	7	0	34	2
	Células p3/fp	0	5	6	0	11	
	Células desprendidas	0	11	0	0	11	
	Todos	13	526	71	5	615	
E15.5	Células p2/p0L	5	334	42	3	384	5
	Células p3/fp	1	41	18	1	61	
	Células desprendidas	7	151	11	1	170	

Tabla 12. Expresión de Gata2 y Gata3 visto por sus reporteros genéticos *Gata2^{GFP}* y *Gata3^{LacZ}* en células Pkd2l1. Datos relacionados Figura 11.

Grupo		Células positivas	Células totales	%	embriones
Nkx6.1	Todos	744	747	99.7 ± 0.3	
	Células Lateral	432	433	99.9 ± 0.4	4
	Células Ventral	167	167	100 ± 0.2	
	Células Distal-Ventral	117	118	99.6 ± 2.9	
	Células Distal-Lateral	28	29	98.3 ± 3.3	
Sox2	Todos	280	282	99.3 ± 0.9	
	Células Lateral	163	165	98.6 ± 1.9	
	Células Ventral	60	60	100 ± 0	2
	Células Distal-Ventral	40	40	100 ± 0	
	Células Distal-Lateral	17	17	100 ± 0	
Gata2	Todos	1120	1121	99.9 ± 0.2	
	Células Lateral	706	707	99.8 ± 0.4	
	Células Ventral	317	317	100 ± 0	4
	Células Distal-Ventral	239	239	100 ± 0	
	Células Distal-Lateral	159	159	100 ± 0	
Gata3	Todos	769	964	79.1 ± 10.4	
	Células Lateral	374	483	76.6 ± 12.9	
	Células Ventral	211	260	79.8 ± 9.4	5
	Células Distal-Ventral	138	168	82.4 ± 11.7	
	Células Distal-Lateral	46	53	92.4 ± 11.9	
Foxj1	Todos	High 35	397	8.8	
	Low 229			57.7	
	Células Lateral	High 33		13.3	
		Low 150	249	60.2	
	Células Ventral	High 1		1.4	1
		Low 41	70	58.6	
	Células Distal-Ventral	High 1		1.7	
		Low 27	58	46.6	
	Células Distal-Lateral	High 0		0	
		Low 11	20	55	
Todos	High 6	469	1.3		

Sox9		Low	79		16.8		
		High	5		1.8	1	
	Células Lateral	Low	50	277		18.1	
		High	0			0	
	Células Ventral	Low	14	90		15.6	
		High	1			1.3	
	Células Distal-Ventral	Low	11	78		14.1	
		High	0			0	
	Células Distal-Lateral	Low	4	24		16.7	
		High	5			2	
NeuN	Todos	Low	115	248	46.4		
		High	0		0		
	Células Lateral	Low	50	123		40.7	
		High	0			0	
	Células Ventral	Low	33	65		50.8	1
		High	4			8.2	
	Células Distal-Ventral	Low	27	49		55.1	
		High	1			9.1	
	Células Distal-Lateral	Low	5	11		45.5	

Tabla 13. Perfil de expresión de los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1⁺. Datos relacionados Figura 19.

	Grupo	Células positivas	Células totales	%	embriones
Ascl1-derivadas <i>Ascl1^{CreER};</i> <i>tdTomato</i>	Todos	396	266	67.1 ± 3.3	2
	Células Lateral	283	200	70.8 ± 7.8	
	Células Ventral	62	34	55.0 ± 7.1	
	Células Distal-Ventral	40	24	60.6 ± 8.6	
	Células Distal-Lateral	11	8	73.2 ± 2.5	
	Todos	376	384	98.1 ± 0.3	
Nestin-tomato <i>Nes:Cre;</i> <i>tdTomato</i>	Células Lateral	193	195	98.9 ± 0.4	2
	Células Ventral	84	88	95.6 ± 0.2	
	Células Distal-Ventral	80	82	98.9 ± 2.9	
	Células Distal-Lateral	19	19	100 ± 0	
	Todos	517	513	99.1 ± 1.3	
Gata3-derivadas <i>Gata3^{Cre};</i> <i>tdTomato</i>	Células Lateral	194	191	99.1 ± 1.3	4
	Células Ventral	108	108	98 ± 2.6	
	Células Distal-Ventral	42	42	100 ± 0	
	Células Distal-Lateral	861	854	100 ± 0	
	Todos	517	513	99.1 ± 1.3	

Tabla 14. Perfil de expresión de los cuatro grupos de neuronas Pkd2l1⁺. Datos relacionados Figura 20.

BIBLIOGRAFÍA

- Agduhr, E., 1922. Über ein zentrales Sinnesorgan (?) bei den Vertebraten. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 66, 223-360.
- Alaynick, W.A., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., 2011. SnapShot: spinal cord development. *Cell* 146, 178-178 e171.
- Andrzejczuk, L.A., Banerjee, S., England, S.J., Voufo, C., Kamara, K., Lewis, K.E., 2018. *Tal1*, *Gata2a*, and *Gata3* Have Distinct Functions in the Development of V2b and Cerebrospinal Fluid-Contacting KA Spinal Neurons. *Front. Neurosci.* 12, 170.
- Aydin, B., Kakumanu, A., Rossillo, M., Moreno-Estelles, M., Garipler, G., Ringstad, N., Flames, N., Mahony, S., Mazzoni, E.O., 2019. Proneural factors *Ascl1* and *Neurog2* contribute to neuronal subtype identities by establishing distinct chromatin landscapes. *Nat. Neurosci.* 22, 897-908.
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517-530.
- Bocanegra-Moreno, L., Singh, A., Hannezo, E., Zagorski, M., Kicheva, A., 2023. Cell cycle dynamics control fluidity of the developing mouse neuroepithelium. *Nat Phys* 19, 1050-1058.
- Bohm, U.L., Prendergast, A., Djenoune, L., Nunes Figueiredo, S., Gomez, J., Stokes, C., Kaiser, S., Suster, M., Kawakami, K., Charpentier, M., Concordet, J.P., Rio, J.P., Del Bene, F., Wyart, C., 2016. CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nat. Commun.* 7, 10866.
- Brann, J.H., Firestein, S.J., 2014. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front. Neurosci.* 8, 182.
- Briscoe, J., Ericson, J., 2001. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 43-49.
- Burrill, J.D., Moran, L., Goulding, M.D., Saueressig, H., 1997. *PAX2* is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of *EN1+* interneurons that require *PAX6* for their development. *Development* 124, 4493-4503.
- Cambray, N., Wilson, V., 2007. Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors. *Development* 134, 2829-2840.
- Canizares, M.A., Albors, A.R., Singer, G., Suttie, N., Gorkic, M., Felts, P., Storey, K.G., 2020. Multiple steps characterise ventricular layer attrition to form the ependymal cell lining of the adult mouse spinal cord central canal. *J. Anat.* 236, 334-350.
- Cappello, S., Attardo, A., Wu, X., Iwasato, T., Itohara, S., Wilsch-Brauninger, M., Eilken, H.M., Rieger, M.A., Schroeder, T.T., Huttner, W.B., Brakebusch, C., Gotz, M., 2006. The Rho-GTPase *cdc42* regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat. Neurosci.* 9, 1099-1107.
- Catala, M., 2021. Overview of Secondary Neurulation. *J Korean Neurosurg Soc* 64, 346-358.
- Charles, M.A., Saunders, T.L., Wood, W.M., Owens, K., Parlow, A.F., Camper, S.A., Ridgway, E.C., Gordon, D.F., 2006. Pituitary-specific *Gata2* knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol. Endocrinol.* 20, 1366-1377.
- Cote, M.P., Murray, L.M., Knikou, M., 2018. Spinal Control of Locomotion: Individual Neurons, Their Circuits and Functions. *Front Physiol* 9, 784.
- Council, N.R., 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press, Washington, DC.

- Das, R.M., Storey, K.G., 2014. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science* 343, 200-204.
- Delas, M.J., Kalaitzis, C.M., Fawzi, T., Demuth, M., Zhang, I., Stuart, H.T., Costantini, E., Ivanovitch, K., Tanaka, E.M., Briscoe, J., 2023. Developmental cell fate choice in neural tube progenitors employs two distinct cis-regulatory strategies. *Dev. Cell* 58, 3-17 e18.
- Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C.J., Gronostajski, R.M., Anderson, D.J., 2006. The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* 52, 953-968.
- Deneris, E.S., Hobert, O., 2014. Maintenance of postmitotic neuronal cell identity. *Nat. Neurosci.* 17, 899-907.
- Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitsch, B.G., Briscoe, J., 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717-720.
- Di Bella, D.J., Carcagno, A.L., Bartolomeu, M.L., Pardi, M.B., Lohr, H., Siegel, N., Hammerschmidt, M., Marin-Burgin, A., Lanuza, G.M., 2019. *Ascl1* Balances Neuronal versus Ependymal Fate in the Spinal Cord Central Canal. *Cell Rep* 28, 2264-2274 e2263.
- Djenoune, L., Desban, L., Gomez, J., Sternberg, J.R., Prendergast, A., Langui, D., Quan, F.B., Marnas, H., Auer, T.O., Rio, J.P., Del Bene, F., Bardet, P.L., Wyart, C., 2017. The dual developmental origin of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons gives rise to distinct functional subtypes. *Scientific reports* 7, 719.
- Djenoune, L., Khabou, H., Joubert, F., Quan, F.B., 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. *Front. Neuroanat.* 8, 26.
- Djenoune, L., Wyart, C., 2017. Light on a sensory interface linking the cerebrospinal fluid to motor circuits in vertebrates. *J. Neurogenet.* 31, 113-127.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J., 1997. *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell* 90, 169-180.
- Exelby, K., Herrera-Delgado, E., Perez, L.G., Perez-Carrasco, R., Sagner, A., Metzis, V., Sollich, P., Briscoe, J., 2021. Precision of tissue patterning is controlled by dynamical properties of gene regulatory networks. *Development* 148.
- Frith, T.J.R., Briscoe, J., Boezio, G.L.M., 2024. From signalling to form: the coordination of neural tube patterning. *Curr. Top. Dev. Biol.* 159, 168-231.
- Ge, W., He, F., Kim, K.J., Blanchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., Wu, X., Zhao, J., Heng, J.I., Martinowich, K., Tao, J., Wu, H., Castro, D., Sobeih, M.M., Corfas, G., Gleeson, J.G., Greenberg, M.E., Guillemot, F., Sun, Y.E., 2006. Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1319-1324.
- Gerstmann, K., Jurcic, N., Blasco, E., Kunz, S., de Almeida Sassi, F., Wanaverbecq, N., Zampieri, N., 2022. The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion. *Curr. Biol.* 32, 2442-2453 e2444.
- Gilyarov, A.V., 2008. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci. Behav. Physiol.* 38, 165-169.

- Gosgnach, S., Lanuza, G.M., Butt, S.J., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., Riethmacher, D., Callaway, E.M., Kiehn, O., Goulding, M., 2006. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440, 215-219.
- Guillemot, F., 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134, 3771-3780.
- Guillemot, F., Hassan, B.A., 2017. Beyond proneural: emerging functions and regulations of proneural proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 42, 93-101.
- Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., Joyner, A.L., 1993. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.
- Haugas, M., Tikker, L., Achim, K., Salminen, M., Partanen, J., 2016. Gata2 and Gata3 regulate the differentiation of serotonergic and glutamatergic neuron subtypes of the dorsal raphe. *Development* 143, 4495-4508.
- Hayashi, S., McMahon, A.P., 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244, 305-318.
- Herzog, D., Loetscher, P., van Hengel, J., Knusel, S., Brakebusch, C., Taylor, V., Suter, U., Relvas, J.B., 2011. The small GTPase RhoA is required to maintain spinal cord neuroepithelium organization and the neural stem cell pool. *J. Neurosci.* 31, 5120-5130.
- Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., Anderson, D.J., 2008. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 133, 510-522.
- Home, P., Kumar, R.P., Ganguly, A., Saha, B., Milano-Foster, J., Bhattacharya, B., Ray, S., Gunewardena, S., Paul, A., Camper, S.A., Fields, P.E., Paul, S., 2017. Genetic redundancy of GATA factors in the extraembryonic trophoblast lineage ensures the progression of preimplantation and postimplantation mammalian development. *Development* 144, 876-888.
- Hosoya, T., Maillard, I., Engel, J.D., 2010. From the cradle to the grave: activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation. *Immunol. Rev.* 238, 110-125.
- Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J., Zuker, C.S., 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.
- Huang, J., Liu, X., Li, D., Shao, Z., Cao, H., Zhang, Y., Trompouki, E., Bowman, T.V., Zon, L.I., Yuan, G.C., Orkin, S.H., Xu, J., 2016. Dynamic Control of Enhancer Repertoires Drives Lineage and Stage-Specific Transcription during Hematopoiesis. *Dev. Cell* 36, 9-23.
- Hubbard, J.M., Bohm, U.L., Prendergast, A., Tseng, P.B., Newman, M., Stokes, C., Wyart, C., 2016. Intraspinous Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion. *Curr. Biol.* 26, 2841-2853.
- Hui, C.C., Angers, S., 2011. Gli proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 513-537.
- Imayoshi, I., Kageyama, R., 2014. bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron* 82, 9-23.
- Itoh, Y., Tyssowski, K., Gotoh, Y., 2013. Transcriptional coupling of neuronal fate commitment and the onset of migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 957-964.

- Jalalvand, E., Robertson, B., Wallen, P., Grillner, S., 2016. Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nat. Commun.* 7, 10002.
- Jalalvand, E., Robertson, B., Wallen, P., Hill, R.H., Grillner, S., 2014. Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *J. Comp. Neurol.* 522, 1753-1768.
- Jessell, T.M., 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20-29.
- Johnson, E., Clark, M., Oncul, M., Pantiru, A., MacLean, C., Deuchars, J., Deuchars, S.A., Johnston, J., 2023. Graded spikes differentially signal neurotransmitter input in cerebrospinal fluid contacting neurons of the mouse spinal cord. *iScience* 26, 105914.
- Joshi, K., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., Lee, S.K., 2009. LMO4 controls the balance between excitatory and inhibitory spinal V2 interneurons. *Neuron* 61, 839-851.
- Jurcic, N., Michelle, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., Kastner, A., 2021. Evidence for PKD2L1-positive neurons distant from the central canal in the ventromedial spinal cord and medulla of the adult mouse. *Eur. J. Neurosci.*
- Kala, K., Haugas, M., Lillevali, K., Guimera, J., Wurst, W., Salminen, M., Partanen, J., 2009. Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons. *Development* 136, 253-262.
- Kang, P., Lee, H.K., Glasgow, S.M., Finley, M., Donti, T., Gaber, Z.B., Graham, B.H., Foster, A.E., Novitch, B.G., Gronostajski, R.M., Deneen, B., 2012. Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron* 74, 79-94.
- Katayama, K., Melendez, J., Baumann, J.M., Leslie, J.R., Chauhan, B.K., Nemkul, N., Lang, R.A., Kuan, C.Y., Zheng, Y., Yoshida, Y., 2011. Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7607-7612.
- Kaufman, C.K., Zhou, P., Pasolli, H.A., Rendl, M., Bolotin, D., Lim, K.C., Dai, X., Alegre, M.L., Fuchs, E., 2003. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev.* 17, 2108-2122.
- Kaufman, M.H., 1992. *The Atlas of Mouse Development*. Elsevier Science.
- Kawaguchi, A., 2020. Neuronal Delamination and Outer Radial Glia Generation in Neocortical Development. *Front Cell Dev Biol* 8, 623573.
- Kicheva, A., Briscoe, J., 2023. Control of Tissue Development by Morphogens. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 39, 91-121.
- Kim, E.J., Ables, J.L., Dickel, L.K., Eisch, A.J., Johnson, J.E., 2011. Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS ONE* 6, e18472.
- Kinney, B.A., Al Anber, A., Row, R.H., Tseng, Y.J., Weidmann, M.D., Knaut, H., Martin, B.L., 2020. Sox2 and Canonical Wnt Signaling Interact to Activate a Developmental Checkpoint Coordinating Morphogenesis with Mesoderm Fate Acquisition. *Cell Rep* 33, 108311.
- Kolmer, W., 1921. Das "Sagittalorgan" der Wirbeltiere. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 60, 652-717.
- Krauss, S., Concordet, J.P., Ingham, P.W., 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-1444.

- Kutejova, E., Sasai, N., Shah, A., Gouti, M., Briscoe, J., 2016. Neural Progenitors Adopt Specific Identities by Directly Repressing All Alternative Progenitor Transcriptional Programs. *Dev. Cell* 36, 639-653.
- Kutna, V., Sevc, J., Gombalova, Z., Matiasova, A., Daxnerova, Z., 2014. Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta Histochem.* 116, 278-285.
- Lahti, L., Haugas, M., Tikker, L., Airavaara, M., Voutilainen, M.H., Anttila, J., Kumar, S., Inkinen, C., Salminen, M., Partanen, J., 2016. Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. *Development* 143, 516-529.
- Lanuza, G.M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T.M., Goulding, M., 2004. Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* 42, 375-386.
- Le Douarin, N.M., Teillet, M.A., Catala, M., 1998. Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 909-916.
- Lim, K.C., Lakshmanan, G., Crawford, S.E., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J.D., 2000. Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat. Genet.* 25, 209-212.
- Lowry, J.A., Atchley, W.R., 2000. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J. Mol. Evol.* 50, 103-115.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., Lein, E.S., Zeng, H., 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133-140.
- Matsumata, M., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H., 2005. Multiple N-cadherin enhancers identified by systematic functional screening indicate its Group B1 SOX-dependent regulation in neural and placodal development. *Dev Biol* 286, 601-617.
- Mukoyama, Y.S., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Novitch, B.G., Wichterle, H., Jessell, T.M., Anderson, D.J., 2006. Olig2+ neuroepithelial motoneuron progenitors are not multipotent stem cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1551-1556.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., Takada, S., 2002. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* 16, 548-553.
- Nakamura, Y., Kurabe, M., Matsumoto, M., Sato, T., Miyashita, S., Hoshina, K., Kamiya, Y., Tainaka, K., Matsuzawa, H., Ohno, N., Ueno, M., 2023. Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *Elife* 12.
- Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F.Y., Orkin, S.H., 1999. Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 210, 305-321.
- Nishi, Y., Zhang, X., Jeong, J., Peterson, K.A., Vedenko, A., Bulyk, M.L., Hide, W.A., McMahon, A.P., 2015. A direct fate exclusion mechanism by Sonic hedgehog-regulated transcriptional repressors. *Development* 142, 3286-3293.
- Okamoto, M., Namba, T., Shinoda, T., Kondo, T., Watanabe, T., Inoue, Y., Takeuchi, K., Enomoto, Y., Ota, K., Oda, K., Wada, Y., Sagou, K., Saito, K., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Nakajima, K., Adachi, T., Fujimori, T., Ueda, M., Hayashi, S., Kaibuchi, K., Miyata, T., 2013. TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. *Nat. Neurosci.* 16, 1556-1566.

- Oosterveen, T., Kurdija, S., Alekseenko, Z., Uhde, C.W., Bergsland, M., Sandberg, M., Andersson, E., Dias, J.M., Muhr, J., Ericson, J., 2012. Mechanistic differences in the transcriptional interpretation of local and long-range Shh morphogen signaling. *Dev. Cell* 23, 1006-1019.
- Orts Del'Imagine, A., Seddik, R., Tell, F., Airault, C., Er-Raoui, G., Najimi, M., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., 2016. A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology* 101, 549-565.
- Orts-Del'Imagine, A., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Roussel, J., Baskaran, A., Langui, D., Koeth, F., Bivas, P., Lejeune, F.X., Bardet, P.L., Wyart, C., 2020. Sensory Neurons Contacting the Cerebrospinal Fluid Require the Reissner Fiber to Detect Spinal Curvature In Vivo. *Curr. Biol.* 30, 827-839 e824.
- Orts-Del'Imagine, A., Kastner, A., Tillement, V., Tardivel, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., 2014. Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice. *PLoS ONE* 9, e87748.
- Orts-Del'Imagine, A., Seddik, R., Tell, F., Airault, C., Er-Raoui, G., Najimi, M., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., 2016. A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology* 101, 549-565.
- Orts-Del'Imagine, 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. *J. Physiol.* 590, 3719-3741.
- Pacary, E., Heng, J., Azzarelli, R., Riou, P., Castro, D., Lebel-Potter, M., Parras, C., Bell, D.M., Ridley, A.J., Parsons, M., Guillemot, F., 2011. Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron* 69, 1069-1084.
- Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D., Lindenbaum, M.H., 1995. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* 11, 40-44.
- Park, H.C., Shin, J., Appel, B., 2004. Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Development* 131, 5959-5969.
- Peng, C.Y., Yajima, H., Burns, C.E., Zon, L.I., Sisodia, S.S., Pfaff, S.L., Sharma, K., 2007. Notch and MAML signaling drives Scl-dependent interneuron diversity in the spinal cord. *Neuron* 53, 813-827.
- Petracca, Y.L., Sartoretti, M.M., Di Bella, D.J., Marin-Burgin, A., Carcagno, A.L., Schinder, A.F., Lanuza, G.M., 2016. The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord. *Development* 143, 880-891.
- Prendergast, A.E., Jim, K.K., Marnas, H., Desban, L., Quan, F.B., Djenoune, L., Laghi, V., Hocquemiller, A., Lunsford, E.T., Roussel, J., Keiser, L., Lejeune, F.X., Dhanasekar, M., Bardet, P.L., Levraud, J.P., van de Beek, D., Vandenbroucke-Grauls, C., Wyart, C., 2023. CSF-contacting neurons respond to *Streptococcus pneumoniae* and promote host survival during central nervous system infection. *Curr. Biol.* 33, 940-956 e910.
- Ray, S., Dutta, D., Rumi, M.A., Kent, L.N., Soares, M.J., Paul, S., 2009. Context-dependent function of regulatory elements and a switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate *Gata2* transcription during trophoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 284, 4978-4988.
- Riondel, P., Jurcic, N., Mounien, L., Ibrahim, S., Ramirez-Franco, J., Stefanovic, S., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., Seddik, R., 2024. Evidence for Two Subpopulations of Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons with Opposite GABAergic Signaling in Adult Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.* 44.

- Rouso, D.L., Pearson, C.A., Gaber, Z.B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C., Morrisey, E.E., Novitch, B.G., 2012. Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron* 74, 314-330.
- Rowitch, D.H., Kriegstein, A.R., 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214-222.
- Sagner, A., Briscoe, J., 2019. Establishing neuronal diversity in the spinal cord: a time and a place. *Development* 146.
- Sartoretti, M.M., Campetella, C.A., Lanuza, G.M., 2022. Dbx1 controls the development of astrocytes of the intermediate spinal cord by modulating Notch signaling. *Development* 149.
- Schafer, M., Kinzel, D., Winkler, C., 2007. Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish. *Dev Biol* 301, 117-129.
- Sepulveda, V., Maurelia, F., Gonzalez, M., Aguayo, J., Caprile, T., 2021. SCO-spondin, a giant matricellular protein that regulates cerebrospinal fluid activity. *Fluids Barriers CNS* 18, 45.
- Shaker, M.R., Lee, J.H., Sun, W., 2021. Embryonal Neuromesodermal Progenitors for Caudal Central Nervous System and Tissue Development. *J Korean Neurosurg Soc* 64, 359-366.
- Stanchak, K.E., Miller, K.E., Lumsden, E.W., Shikhar, D., Davis, C., Brunton, B.W., Perkel, D.J., 2022. Molecular Markers of Mechanosensation in Glycinergic Neurons in the Avian Lumbosacral Spinal Cord. *eNeuro* 9.
- Sternberg, J.R., Prendergast, A.E., Brosse, L., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Orts-Del'Immagine, A., Castillo, L., Djenoune, L., Kurisu, S., McDearmid, J.R., Bardet, P.L., Boccara, C., Okamoto, H., Delmas, P., Wyart, C., 2018. Pkd2l1 is required for mechanoreception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature. *Nat. Commun.* 9, 3804.
- Stoeckel, M.E., Uhl-Bronner, S., Hugel, S., Veinante, P., Klein, M.J., Mutterer, J., Freund-Mercier, M.J., 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, C.C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M.C., Schedl, A., Wegner, M., 2003. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* 17, 1677-1689.
- Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C., Gruss, P., 1996. Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development* 122, 3453-3465.
- Suzuki, N., Ohneda, O., Minegishi, N., Nishikawa, M., Ohta, T., Takahashi, S., Engel, J.D., 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.
- Tait, C.M., Chinnaiya, K., Manning, E., Murtaza, M., Ashton, J.P., Furley, N., Hill, C.J., Alves, C.H., Wijnholds, J., Erdmann, K.S., Furley, A., Rashbass, P., Das, R.M., Storey, K.G., Placzek, M., 2020. Crumbs2 mediates ventricular layer remodelling to form the spinal cord central canal. *PLoS Biol.* 18, e3000470.
- Tanabe, Y., Jessell, T.M., 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274, 1115-1123.
- Tonelli Gombalova, Z., Kosuth, J., Alexovic Matiasova, A., Zrubakova, J., Zezula, I., Giallongo, T., Di Giulio, A.M., Carelli, S., Tomaskova, L., Daxnerova, Z., Sevc, J., 2020. Majority of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the spinal cord of C57Bl/6N mice is present in ectopic position unlike in other studied experimental mice strains and mammalian species. *J. Comp. Neurol.* 528, 2523-2550.

- Tremblay, M., Sanchez-Ferras, O., Bouchard, M., 2018. GATA transcription factors in development and disease. *Development* 145.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., 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.
- Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., Orkin, S.H., 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.
- Tsai, H.H., Li, H., Fuentealba, L.C., Molofsky, A.V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., Tenney, A., Murnen, A.T., Fancy, S.P., Merkle, F., Kessler, N., Alvarez-Buylla, A., Richardson, W.D., Rowitch, D.H., 2012. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 337, 358-362.
- Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F.J., Wilson, V., Nicolas, J.F., 2009. Redefining the progression of lineage segregations during mammalian embryogenesis by clonal analysis. *Dev. Cell* 17, 365-376.
- van Doorninck, J.H., van Der Wees, J., Karis, A., Goedknecht, E., Engel, J.D., Coesmans, M., Rutteman, M., Grosveld, F., De Zeeuw, C.I., 1999. GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. *J. Neurosci.* 19, RC12.
- Vigh, B., Manzano e Silva, M.J., Frank, C.L., Vincze, C., Czirok, S.J., 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.
- 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, M.J., van den Pol, A.N., 1983. Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates. *Cell Tissue Res.* 231, 615-621.
- Vigh-Teichmann, I., Rohlich, P., Vigh, B., Aros, B., 1980. Comparison of the pineal complex, retina and cerebrospinal fluid contacting neurons by immunocytochemical antirhodopsin reaction. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 94, 623-640.
- Virolainen, S.M., Achim, K., Peltopuro, P., Salminen, M., Partanen, J., 2012. Transcriptional regulatory mechanisms underlying the GABAergic neuron fate in different diencephalic prosomeres. *Development* 139, 3795-3805.
- Vokes, S.A., Ji, H., McCuine, S., Tenzen, T., Giles, S., Zhong, S., Longabaugh, W.J., Davidson, E.H., Wong, W.H., McMahon, A.P., 2007. Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development* 134, 1977-1989.
- Wu, M.Y., Carbo-Tano, M., Mirat, O., Lejeune, F.X., Roussel, J., Quan, F.B., Fidelin, K., Wyart, C., 2021. Spinal sensory neurons project onto the hindbrain to stabilize posture and enhance locomotor speed. *Curr. Biol.*
- Wyart, C., Carbo-Tano, M., Cantaut-Belarif, Y., Orts-Del'Immagine, A., Bohm, U.L., 2023. Cerebrospinal fluid-contacting neurons: multimodal cells with diverse roles in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 24, 540-556.

- Yadav, A., Matson, K.J.E., Li, L., Hua, I., Petrescu, J., Kang, K., Alkaslasi, M.R., Lee, D.I., Hasan, S., Galuta, A., Dedek, A., Ameri, S., Parnell, J., Alshardan, M.M., Qumqumji, F.A., Alhamad, S.M., Wang, A.P., Poulen, G., Lonjon, N., Vachierey-Lahaye, F., Gaur, P., Nalls, M.A., Qi, Y.A., Maric, D., Ward, M.E., Hildebrand, M.E., Mery, P.F., Bourinet, E., Bauchet, L., Tsai, E.C., Phatnani, H., Le Pichon, C.E., Menon, V., Levine, A.J., 2023. A cellular taxonomy of the adult human spinal cord. *Neuron* 111, 328-344 e327.
- Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T., Jessell, T.M., 1993. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 73, 673-686.
- Yang, H.Y., Evans, T., 1992. Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4562-4570.
- Yang, L., Rastegar, S., Strahle, U., 2010. Regulatory interactions specifying Kolmer-Agduhr interneurons. *Development* 137, 2713-2722.
- Ye, W., Chang, R.B., Bushman, J.D., Tu, Y.H., Mulhall, E.M., Wilson, C.E., Cooper, A.J., Chick, W.S., Hill-Eubanks, D.C., Nelson, M.T., Kinnamon, S.C., Liman, E.R., 2016. The K⁺ channel KIR2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E229-238.
- Yu, K., McGlynn, S., Matise, M.P., 2013. Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development* 140, 1594-1604.
- Zhang, D., Chen, Y., Wei, Y., Chen, H., Wu, Y., Wu, L., Li, J., Ren, Q., Miao, C., Zhu, T., Liu, J., Ke, B., Zhou, C., 2024. Spatial transcriptomics and single-nucleus RNA sequencing reveal a transcriptomic atlas of adult human spinal cord. *Elife* 12.
- Zhang, J., Lanuza, G.M., Britz, O., Wang, Z., Siembab, V.C., Zhang, Y., Velasquez, T., Alvarez, F.J., 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, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N., Chenn, A., 2010. Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Dev. Cell* 18, 472-479.
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C.J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J.F., Jr., Guo, L., Paul, W.E., 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat. Immunol.* 5, 1157-1165.