



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“EL PAPEL DE LA FOSFATASA DE LÍPIDOS
FOSFATADOS 3 (LPP3) EN LA CAPACIDAD
PROLIFERATIVA Y DE DIFERENCIACIÓN DE
PRECURSORES NEURALES DEL HIPOCAMPO
ADULTO EN UN MODELO IN VITRO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA**

PRESENTA:

RICARDO CASTRO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE

2015

Ciudad Universitaria, D. F.

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. Me han dado todo para poder estar donde me encuentro hoy. Su trabajo, dedicación y amor por su familia han definido al adulto en el que me he convertido y continúan siendo una inspiración para crecer y ser una mejor persona. A ustedes les debo todo.

A mi hermano, Román. Tienes una gran mente, pero un corazón aún más grande. Hablar contigo, enseñarte lo que sé y aprender juntos lo que no, me ayudaron a mantener la curiosidad y capacidad de asombro de un niño y me dan esperanza por el futuro.

A mi familia, que siempre ha estado ahí. Nadie cree tanto en mí como ustedes y su cariño ha sido una gran fuerza de apoyo en los momentos difíciles.

A todas las personas que han sido parte de mi formación. Maestros, tutores, compañeros. Particularmente a mi tutora. Diana, has sido un gran ejemplo para mí, en todos los aspectos. Eres una gran investigadora pero una mejor persona y te debo mucha de mi formación como científico y ser humano. Gracias por estos 4 años y por tanto que has hecho por mí.

A todos los miembros de mi laboratorio, presentes y pasados. Especialmente a Sara Luz, me enseñaste mucho cuando era apenas un niño. Lo que aprendí de ti acerca del trabajo científico me acompañará durante toda mi carrera. A Valeria, tu apoyo y amistad en el laboratorio fueron parte integral de este trabajo y durante los años que trabajamos juntos. Y a Alex, Angie, Arlen, Israel, Martha, Sandra y María José, gracias por su amistad, su apoyo, por escucharme mil veces y ayudarme a mejorar.

Sin todos ustedes no hubiera podido lograr esto, ni lo que seguiré.

RESUMEN

La neurogénesis es el proceso mediante el cual nuevas neuronas son generadas a partir de precursores neurales multipotentes. El giro dentado del hipocampo es una de las dos regiones en que este fenómeno ocurre durante la vida adulta en mamíferos. Ahí, a partir de células troncales neurales, se generan miles de neuronas que madurarán a células granulares, que van a integrarse al circuito existente en el giro dentado para modular los circuitos de la corteza entorrineal, con consecuencias en la memoria y el aprendizaje.

La neurogénesis adulta es un proceso altamente regulado y muy complejo. Entre las moléculas reguladoras más potentes y de importancia en el sistema nervioso, se encuentran los lípidos bioactivos. Éstos, principalmente la S1P y el LPA, actúan mediante receptores acoplados a proteínas G para regular procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

Estos y otros lípidos bioactivos son regulados por una familia de proteínas membranales llamada LPPs, cuya función es la defosforilación de estos lípidos para regular su interconversión. De esta familia sobresale la LPP3, una enzima que tiene una gran relevancia en el desarrollo embrionario debido a su importancia en la formación de vasos sanguíneos. Durante el desarrollo tardío y la vida adulta, la LPP3 toma mayor importancia en la regulación dentro del sistema nervioso y es expresada en niveles importantes en las regiones neurogénicas.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el papel que la LPP3 juega en la regulación de la proliferación y diferenciación de precursores neurales del hipocampo adulto, utilizando el cultivo de neuroesferas como herramienta.

En él, describimos el efecto negativo que la ausencia de LPP3 tiene sobre la capacidad de formación de neuroesferas, provocando la formación de menos esferas y de menor tamaño. Esto está causado, por lo menos parcialmente, por una disminución en la capacidad proliferativa de estos precursores y una posible reducción en el número de células proliferativas. También, las células mutantes con actividad mitótica parecen tener un patrón proliferativo distinto, que podría afectar la capacidad de autorrenovación de los progenitores neurales. Además, la mutación en LPP3 provocó que se favoreciera la diferenciación de precursores neurales hacia el linaje neural, sin alterar la proporción de células gliales, pero con algunas alteraciones morfológicas en las neuronas generadas.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular - UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Diana Escalante Alcalde. El trabajo fue posible también gracias a donativos de DGAPA-PAPIIT IN205812, SEP-CONACYT CB-165897 y el Estímulo para el Desarrollo de Investigación Fundación Miguel Alemán A.C./UNAM 2012.

CONTENIDO

1. Abreviaturas.....	7
2. Introducción	9
2.1 Lípidos Bioactivos	9
Esfingolípidos	10
Fosfolípidos	15
Regulación enzimática de lípidos bioactivos.....	18
2.2 Las fosfatasa de lípidos fosfatados (LPPs)	19
2.3 LPP3	20
LPP3 en el desarrollo embrionario.....	22
LPP3 durante la vida adulta.....	24
2.4 Neurogénesis adulta	26
La Zona Subventricular.....	28
La Zona Subgranular	31
La señalización mediada por lípidos en la neurogénesis.....	34
3. Planteamiento	35
4. Justificación	36
5. Objetivo.....	37
6. Materiales y Métodos.....	37
6.1 Mutante condicional de <i>Ppap2b</i>	37
6.2 Genotipificación.....	38
Extracción de DNA	39
PCR	40
6.3 Cultivo de Neuroesferas.....	43
El cultivo de neuroesferas como herramienta para estudiar la neurogénesis .	43
Soluciones y Medios	44
Protocolo de generación de neuroesferas	45
Ensayos de crecimiento celular y formación de neuroesferas.	47
Ensayos de marcaje y seguimiento con BrdU	48
Ensayos de diferenciación	51
Inmunocitoquímica.....	52
7. Resultados.....	54

7.1	La ausencia de LPP3 provoca deficiencias en la capacidad de formación de neuroesferas	54
7.2	Sin LPP3 los cultivos de neuroesferas tienen una menor proliferación celular	59
7.3	Las células carentes de LPP3 tienen una mayor retención del marcaje de BrdU	61
7.4	La diferenciación al linaje neuronal se ve favorecida en ausencia de LPP3.	64
8.	Discusión	67
9.	Conclusiones	71
10.	Perspectivas	72
11.	Referencias	74

1. ABREVIATURAS

aNSCs	<i>activated Neural Stem Cells</i> – Células troncales neurales activadas
ATX	<i>Autotaxin</i> – Autotaxina
C1P	<i>Ceramide-1-phosphate</i> – ceramida-1-fosfato
CDasa	Ceramidasa
CERK	<i>Ceramide kinase</i> – Cinasa de ceramida
DAG	Diacilglicerol
DG	<i>Dentate Gyrus</i> – Giro dentado del hipocampo
dhS1P	<i>Dihydro S1P</i> – Dihidro S1P
EBs	<i>Embryoid Bodies</i> – Cuerpos embrionarios
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> – Factor de crecimiento epidermal
EGFR	<i>EGF Receptor</i> – Receptor para EGF
ESCs	<i>Embryonic Stem Cells</i> – Células troncales embrionarias
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> – Factor de crecimiento de fibroblastos
GPCRs	<i>G-Protein Coupled Receptors</i> – Receptores acoplados a Proteínas G
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> – Lipoproteínas de alta densidad
LPA	<i>Lysophosphatidic Acid</i> – Ácido lisofosfatídico
LPPs	<i>Lipid Phosphate Phosphatases</i> – Fosfatasas de Lípidos Fosfatados
LRCs	<i>Label-retaining Cells</i> – Células retenedoras de marcaje
LV	<i>Lateral Ventricles</i> – Ventrículos laterales
MAG	Monoacilglicerol
NSCs	<i>Neural Stem Cells</i> – Células Troncales Neurales
OB	<i>Olfactory Bulbs</i> – Bulbos olfatorios
PAP2	<i>Phosphatidic Acid Phosphatases Type 2</i> – Fosfatasas de ácido fosfatídico tipo 2
PKC	<i>Protein Kinase C</i> – Cinasa de proteínas C
PLA/C/D	<i>Phospholipase A/C/D</i> – Fosfolipasa A/C/D
qNSCs	<i>quiescent Neural Stem Cells</i> – Células troncales neurales quiescentes
RMS	<i>Rostral Migratory Stream</i> – Corriente migratoria rostral
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i> – Esfingosina-1-fosfato
S1PP	<i>S1P Phosphatase</i> – Fosfatasa de S1P
SKs	<i>Sphingosine Kinases</i> – Cinasas de esfingosina
SMC	<i>Smooth Muscle Cells</i> – Células de músculo liso
SNC	Sistema Nervioso Central

Sphk1/2	<i>Sphingosine kinase 1/2</i> – Cinasa de esfingosina 1/2
SVZ	<i>Subventricular Zone</i> – Zona subventricular
SGZ	Subgranular Zone – Zona subgranular
TAPs	<i>Transient Amplifying Progenitor cells</i> – Células progenitoras de amplificación transitoria

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Lípidos Bioactivos

La aparición de la membrana celular, y la consecuente capacidad de separar un ambiente externo hostil e inhóspito de uno interno que podía ser adecuado para otorgar las condiciones más favorables para el material genético y maquinaria asociada que contenían, probó ser de una incomparable utilidad y marcó el destino de la vida en este planeta (Pohorille & Deamer 2009; Deamer et al. 2002).

Durante la evolución de la vida en este planeta, los lípidos han jugado un papel preponderante desde el inicio. Su ubicuidad a través de los reinos conocidos y la conservación de su uso, tanto en organismos simples como en los más complejos, atestiguan su importancia.

Como consecuencia de lo anterior, los lípidos han sido ampliamente estudiados. Al ser un grupo muy variado y altamente heterogéneo, sus roles en los seres vivos resultaron serlo también, y entender sus muchas funciones biológicas ha sido un fértil campo de estudio por muchos años.

Durante mucho tiempo, la mayoría del conocimiento que se tenía sobre las funciones biológicas de los lípidos estaba limitado a sus papeles esenciales en la estructura celular y el metabolismo. El primero, como ya se mencionó, como componentes fundamentales de la membrana plasmática de todo tipo de células; el segundo, como moléculas energéticas de reserva en organismos más complejos.

Fue hasta que se descubrió la capacidad de estas moléculas lipídicas de actuar como mensajeros en la señalización celular, que se amplió el panorama y cambió la forma en que eran vistas. Estos lípidos con actividad biológica, capaces de mediar cascadas de señalización complejas que regulan vitales procesos celulares, y las moléculas responsables de modular su señalización, han sido el objeto de una gran cantidad de estudios en años recientes.

Los fosfolípidos, esfingolípidos, eicosanoides, y esteroides, por mencionar algunos, han sido ampliamente estudiados por su participación en la regulación de procesos que van desde la supervivencia, proliferación, diferenciación y potencialidad celulares, hasta procesos inflamatorios y actividad hormonal. Los roles que juegan los lípidos parecen ser tan variados como las moléculas mismas.

Dentro de las moléculas que han recibido más atención recientemente están los fosfoesfingolípidos esfingosina-1-fosfato (S1P) y ceramida-1-fosfato (C1P), y los fosfolípidos ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA). Estas moléculas, junto con sus contrapartes defosforiladas – esfingosina, ceramida, monoacilglicerol (MAG) y diacilglicerol (DAG) respectivamente – representan un altamente complejo mecanismo de señalización, cuyos efectos dependen del contexto celular y de una gran variedad de efectores río abajo.

Esfingolípidos

Los principales miembros de este grupo de lípidos, esfingomielina, ceramida, esfingosina, C1P y S1P están íntimamente relacionados en sus vías de síntesis y metabolismo. Brevemente, estos esfingolípidos comienzan su vía de síntesis *de novo* a partir de serina y palmitato (por medio de la acción de la palmitoiltransferasa de serina y la ceramida sintasa) o a partir de la lisis de esfingomielina (dependiente de esfingomielinasas) para dar lugar a ceramida (Marchesini & Hannun 2004).

La síntesis y regulación de los niveles de ceramida es esencial en esta vía metabólica. Ésta actúa como una especie de nodo en la síntesis y consecuente señalización dependiente de esfingolípidos. Además, su señalización directa está asociada con procesos antiproliferativos como senescencia, diferenciación, apoptosis y arresto del ciclo celular (Venable et al. 1995; Obeid et al. 1993).

A partir de la ceramida, es posible la síntesis de esfingosina y S1P por medio de la actividad de ceramidasa (CDasas) y esfingosina cinasas (SKs). El equilibrio de la actividad de las enzimas mencionadas, además de la de fosfatasa exclusivas (como la esfingosina-1-fosfato fosfatasa, S1PP) o más generales (como las

fosfatasa de lípidos fosfatados, LPPs) logra mantener los niveles de ceramida y S1P dentro de los rangos fisiológicos en sistemas específicos (**Figura 1**) (Mendelson et al. 2013; Sigal et al. 2005).

Ceramida

El mecanismo de acción de la ceramida no es dependiente de la señalización por medio de receptores (Castro et al. 2014; Stancevic & Kolesnick 2010). Ésta actúa principalmente alterando la composición de la membrana plasmática en respuesta a estrés, o a la activación de algunas vías de señalización (como en el caso de los receptores de muerte celular FAS/CD95 y CD40), creando microdominios lipídicos que facilitan la señalización (Cremesti et al. 2001). También se conocen otros mecanismos distintos, que involucran el secuestro de inhibidores (como el caso de la oncoproteína SET) o simplemente, la regulación indirecta de la señalización de otros esfingolípidos al limitar la cantidad de éstos que puede ser sintetizada (Oaks & Ogretmen 2014; Castro et al. 2014).

C1P

La C1P se sintetiza a partir de la ceramida por medio de la acción de la ceramida cinasa (CERK) y es un esfingolípidos menos abundante (Castro et al. 2014). Se conocen principalmente dos funciones de la C1P en mamíferos. Primero, promueve la proliferación y crecimiento celular, por medio de la activación de ERK1/2, JNK y PKC α en algunos tipos celulares (Gomez-Muñoz et al. 1995; Gómez-Muñoz et al. 2004; Hoeflerlin et al. 2013). Y segundo, regula la síntesis de eicosanoides, moléculas importantes en el desarrollo de procesos inflamatorios, mediante la activación de la PLA₂ (Hoeflerlin et al. 2013; Dittel 2008; Maceyka & Spiegel 2014).

Esfingosina

La esfingosina se encuentra íntimamente ligada con la ceramida, en su similitud estructural y la cercanía en su vía de síntesis. Pero a diferencia ésta, que en general se encuentra confinada a las membranas lipídicas, la esfingosina y la S1P son más solubles, lo cual les permite actuar como potentes moléculas mensajeras

dentro y fuera de la célula (Hannun & Obeid 2008). En su forma no fosforilada, la esfingosina actúa (como activador o inhibidor) sobre una gran variedad de cinasas involucradas en diversas vías de señalización que están en su mayoría ligadas a muerte celular, pero probablemente su rol más estudiado es el de un fuerte inhibidor de la actividad de PKC (Woodcock 2006; Smith et al. 2000). Como resultado de lo anterior, la esfingosina es ampliamente considerada un promotor de la apoptosis en varios tipos celulares.

S1P

A pesar de su rol directo en la señalización, la importancia de la esfingosina en años recientes ha estado relacionada con su papel como el reservorio para la síntesis metabólica de otro esfingolípido, una potente molécula señalizadora que ha sido objeto de un gran interés en los últimos años: la S1P. Esta molécula actúa principalmente en el exterior de la célula, por medio de interacciones altamente específicas con receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a Proteínas G (GPCRs) (Mendelson et al. 2014). Actualmente se conocen 5 de estos receptores (S1P₁₋₅) y los efectos específicos de la señalización mediada por S1P dependen de los efectores intracelulares propios del receptor expresado (Chun et al. 2010).

En las células, la S1P es sintetizada en su mayoría intracelularmente y transportada al exterior por medio de transportadores específicos, como Spns2 (Fukuhara et al. 2012); además puede ser sintetizado extracelularmente por alguna cinasa específica – como Sphk1, que es secretada (Venkataraman et al. 2006). Una vez fuera de la célula es unida por proteínas como la HDL y albúmina, que le permiten alcanzar concentraciones en suero alrededor de 1µM (Christoffersen et al. 2011). Esto, aunado a la baja concentración en los espacios intercelulares y la maquinaria enzimática presente en la superficie de la célula que regula sus niveles, crea el gradiente necesario para que la S1P pueda actuar como un potente ligando (Cyster & Schwab 2012; Bréart et al. 2011). Además de su altamente estudiada señalización por medio de receptores de membrana, existen indicios de señalización intracelular independiente de receptores (por

ejemplo, liberación de calcio intracelular), aunque los mecanismos específicos por los cuales ésta es llevada a cabo no se conocen actualmente (Mitsutake et al. 2004).

Se ha observado que S1P regula directamente procesos celulares como migración, adhesión, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, y su señalización es importante en el control de desarrollo vascular y del sistema inmune. Además, durante el desarrollo embrionario, S1P es crucial para la angiogénesis, formación de extremidades, cardiogénesis y neurogénesis (Mendelson et al. 2013).

El efecto final que la S1P tendrá sobre un tipo celular específico dependerá del GPCR expresado (la mayoría de las células expresan más de un tipo de receptor) y la familia de proteínas G a la cual se encuentre asociado. Por ejemplo, el receptor S1P₁ (uno de los más abundantes y el de mayor expresión en el SNC) se une exclusivamente a proteínas de la familia G_i, las cuales mediante sus efectores como Ras/ERK, PI3K/AKT y Fosfolipasa C (PLC) promueven la proliferación y supervivencia celular (Windh et al. 1999; O'Sullivan & Dev 2013). El resto de los receptores pueden asociarse también con proteínas de la familia G_{12/13} (S1P₂₋₅) y G_q (S1P₂₋₃) para tener efectos sobre la migración y motilidad celular, dependientes de la activación de Rho y PLC (Windh et al. 1999; Mendelson et al. 2014).

Como se mencionó previamente, el receptor S1P₁ se encuentra altamente enriquecido en el tejido neural (Chae, et al. 2004). La señalización mediada por S1P parece ser crucial durante el desarrollo del sistema nervioso y estudios recientes lo implican en procesos más allá de la etapa embrionaria (López-Juárez 2011; Riccitelli et al. 2013; Herr & Chun 2007; Harada et al. 2004). Un indicio claro de ello es la mutación nula de Sphk1/Sphk2, la cual resulta en una disminución considerable de la neurogénesis, defectos en la formación del tubo neural y angiogénesis, derivando en letalidad embrionaria como consecuencia de la alteración de los niveles de S1P que provoca (Mizugishi et al. 2005).

A pesar de sus efectos pleiotrópicos sobre el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario y la vida adulta, y de la considerable expresión de proteínas

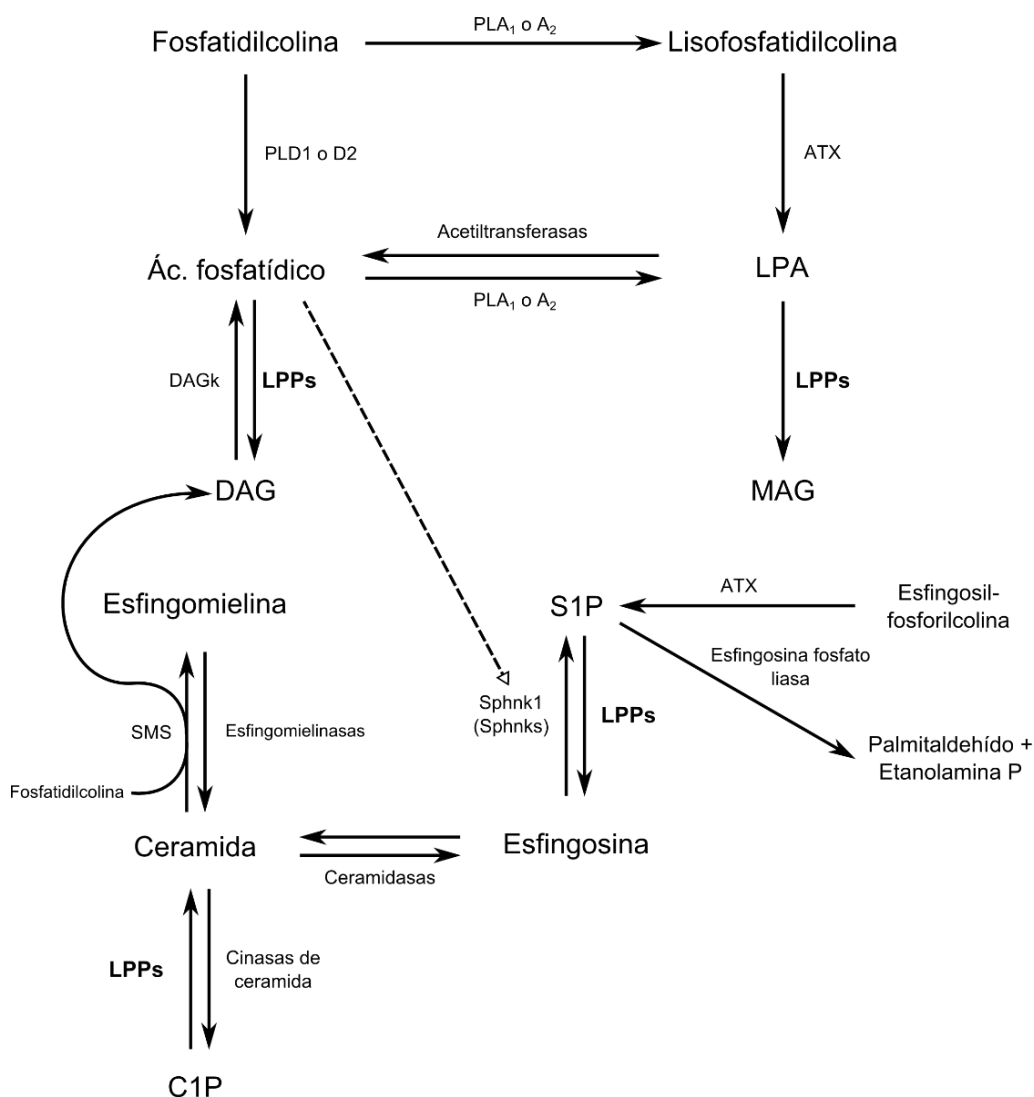


Figura 1. Biosíntesis y relación entre los lípidos bioactivos.

Relación entre fosfolípidos y esfingolípidos fosforilados y las enzimas encargadas de su síntesis, fosforilación o defosforilación. PLA, fosfolipasa A; PLD, fosfolipasa D; ATX, autotaxina; DAGk, cinasa de DAG; SMS, esfingomielina sintasa; Sphks, cinasas de esfingosina.

relacionadas (receptores, Sphks) en zonas neurogénicas durante la adultez, el papel de la S1P en la neurogénesis adulta ha sido muy poco explorado (Anderson & Maes 2014; Lein et al. 2007). Una de las evidencias más poderosas de su involucramiento en este proceso viene de un estudio reciente, donde se encontró que la señalización de S1P parece ser crucial para la transición de células troncales neurales quiescentes a activadas, en la zona subventricular del ratón adulto (Codega et al. 2014). Los mecanismos aún no se conocen, pero queda claro que aún queda mucho que explorar acerca de la participación de este fosfoesfingolípido en la neurogénesis adulta.

Fosfolípidos

Los fosfolípidos deben de ser de los grupos lipídicos más estudiados, debido a su importancia en la composición y estructura de la membrana celular. Al igual que con los esfingolípidos, su potencial como moléculas señalizadoras ha ido tomando mayor importancia y se ha convertido en un fértil campo de estudio en la actualidad.

Las moléculas señalizadoras más relevantes de este grupo son el LPA y PA. Éstas forman parte de una compleja e interconectada vía metabólica, en la cual pueden ser sintetizados a partir de fosfolípidos de membrana, dependiendo de la actividad de varias enzimas. Los fosfolípidos de membrana (como fosfatidilcolina) pueden ser hidrolizados, ya sea por la fosfolipasa A (PLA1/2) o la fosfolipasa D (PLD), para dar lugar a lisofosfolípidos (como lisofosfatidilcolina) o PA, respectivamente (Luquain et al. 2003). A partir de estas dos últimas moléculas, es posible sintetizar LPA mediante la acción de autotaxina (ATX/lisoPLD) o PLA1/2. Para agregar complejidad a este sistema, el LPA y PA pueden también ser sintetizados a partir de MAG y DAG, respectivamente por medio de cinasas específicas (MAG cinasa y DAGK) y la defosforilación correspondiente puede ser llevada a cabo por las LPPs (**Figura 1**) (Ye & Chun 2010; Brindley & Pilquill 2009).

El MAG y especialmente el DAG son lípidos que también tienen una importante actividad biológica. Este último actúa principalmente como segundo mensajero

intracelular, es formado como consecuencia de la hidrólisis, por parte de la PLC, del fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) y actúa como activador de la PKC (Berridge 1984). El MAG parece tener papeles más limitados en señalización y hasta ahora se le conoce como agonista de receptores a endocannabinoides y ligando de receptores asociados a la ingesta de alimentos (Savinainen et al. 2001; Hansen et al. 2011). Dado el enfoque sobre los lípidos bioactivos de este escrito, las funciones y mecanismos de señalización dependientes de estas moléculas no serán analizadas a detalle. El MAG y DAG, entonces, son relevantes para este estudio como las contrapartes defosforiladas del LPA y PA, respectivamente.

PA

El ácido fosfatídico es un glicerofosfolípido abundante en las membranas celulares, donde alcanza concentraciones de entre 2 y 6% (Andreyev et al. 2010). Debido a su función como molécula integral de la membrana y su capacidad de unión a varios dominios proteicos, el PA cumple diversas funciones como activador y reclutador de proteínas hacia la membrana (principalmente enzimas involucradas en la señalización de otros lípidos). De entre las muchas proteínas cuya actividad se ve influenciada por la presencia del PA, cabe mencionar el papel de activador/reclutador que tiene sobre la Sphk1 (la principal enzima encargada de la síntesis de S1P) y varias isoformas de PKC y PLC (Delon et al. 2004; Nakashima 2002; Jose Lopez-Andreo et al. 2003; Murthy et al. 2006). Muchos de los efectos de su señalización están íntimamente ligados a la presencia de PLD y tienen consecuencias en la regulación del tráfico celular, exocitosis, autofagia, metabolismo celular y tumorigénesis en mamíferos (Bruntz et al. 2014).

LPA

El ácido lisofosfatídico es, posiblemente, el más estudiado de todos los lípidos bioactivos, y con razón. Desde el descubrimiento de su rol como molécula de señalización, se ha encontrado que el LPA participa en procesos de proliferación celular, diferenciación, supervivencia, reorganización del citoesqueleto, retracción de procesos y migración celular en contextos tan diversos, que van desde el sistema nervioso, desarrollo vascular, el sistema inmune, cáncer, y hasta la

obesidad (Choi et al. 2010; Lajtha et al. 2010; Tsujiuchi et al. 2014; Choi et al. 2008).

La mayoría de su actividad señalizadora está mediada por su unión a una familia de receptores membranales acoplados a proteínas G (Choi et al. 2010). Hasta ahora se han descrito seis receptores (LPA₁₋₆, con más receptores propuestos), que se encuentran expresados diferencialmente en casi todos los tipos celulares (Yung et al. 2015). Esta gran variedad de receptores, la heterogeneidad en su expresión, así como las posibles vías de transducción de sus efectores, le dan a esta molécula una gran potencia, especificidad y pleiotropía que le permiten regular muy diversos procesos biológicos (Lajtha et al. 2010).

Los 5 primeros receptores son los mejor descritos. Se pueden acoplar a proteínas de la familia G_i (LPA_{1, 2, 3}), G_{12/13} (LPA_{1, 2, 4, 5}) y G_{q/11} (LPA₁₋₅) (Kotarsky et al. 2006; Contos et al. 2002; Contos et al. 2000). Como se mencionó previamente, G_i actúa por medio de la activación de PI3K, Ras y PLC para promover la supervivencia, migración, proliferación y diferenciación. G_{12/13} activa principalmente a Rho y río abajo promueve la proliferación y retracción de neuritas, mientras que G_{q/11} activa a PLC, provocando la activación de PKC y liberación de Ca²⁺ (Lajtha et al. 2010).

LPA₁ fue el primer receptor de LPA identificado (Hecht et al. 1996). Su expresión está muy distribuida en todo el ratón adulto pero se encuentra considerablemente enriquecido en el cerebro adulto. Debido a su asociación con G_{i/o}, G_{12/13} y G_{q/11}, su activación induce proliferación y supervivencia celular, migración y cambios en el citoesqueleto, dependiente de la activación de las vías de MAPK, PLC, Akt y Rho.

Durante el desarrollo embrionario se encuentra más restringido espacialmente y se ubica predominantemente en el SNC en desarrollo. Durante este proceso de desarrollo neural, LPA (y particularmente LPA₁) parece tener una participación crucial en la proliferación, crecimiento, diferenciación y maduración neuronal, tanto *in vivo* como *in vitro* (Herr & Chun 2007; Leong et al. 2011; Spohr et al. 2008; Svetlov & Ignatova 2004; Kingsbury et al. 2003; Fukushima et al. 2007).

Recientemente LPA₁ ha sido también asociado con el proceso de neurogénesis adulta (Santin et al. 2009; Castilla-Ortega et al. 2011; Castilla-Ortega et al. 2013). Su presencia en niveles de expresión considerables en las zonas neurogénicas de los ventrículos laterales y principalmente en el giro dentado del hipocampo, así como sus previamente descritas funciones en la neurogénesis embrionaria, indican su probable participación como un importante mediador de la señalización por lípidos en estas regiones (Herr & Chun 2007; Lein et al. 2007). La evidencia más clara del papel del LPA a través de LPA₁, viene de un trabajo reciente en el cual la mutación nula del receptor provoca alteraciones en la neurogénesis en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. Además de los defectos en proliferación de los precursores neurales, se observaron anomalías morfológicas en los neuroblastos y en la sobrevivencia y diferenciación de las neuronas resultantes (Matas-Rico et al. 2008). Las observaciones parecen apuntar hacia un papel relevante de la señalización dependiente de LPA en la neurogénesis adulta, donde sus efectos pueden emular los que se han descrito en la neurogénesis embrionaria.

Regulación enzimática de lípidos bioactivos

Como se mencionó previamente, la señalización por lípidos bioactivos ha mostrado ser crucial para el correcto desarrollo y vida adulta en mamíferos. Generalmente ésta involucra complejos sistemas metabólicos y de síntesis, que permiten su interconversión dependiendo del contexto celular. Como consecuencia, los niveles de estos lípidos deben de encontrarse finamente regulados para permitir que las potentes moléculas señalizadoras que se encuentran en concentraciones muy bajas y localizadas actúen correctamente y sobre los tipos celulares apropiados. Para lograr lo anterior, existe una gran cantidad de enzimas involucradas en la interconversión y síntesis de estos lípidos, que actúan de manera específica o inespecífica para mantener los niveles de lípidos dentro de los rangos apropiados para ese contexto.

Dentro de la sección anterior fueron mencionadas la mayoría de las enzimas relevantes en el metabolismo e interconversión de los lípidos bioactivos, muchas de ellas específicas como la CDasa, Sphks, S1PP, ATX, PLA, DAGKs y MAGKs, entre otras. Pero existen otras enzimas que son capaces de reconocer y actuar sobre más de una clase de lípidos bioactivos y que son esenciales para la regulación de sus niveles en algunos tejidos, como las LPPs (Brindley et al. 2009; Kok et al. 2012).

2.2 Las fosfatasa de lípidos fosfatados (LPPs)

Estas proteínas, previamente conocidas como las fosfatasa de fosfatidato dependientes de Mg^{2+} e insensibles a N-etilmaleimida (PAP2), son enzimas membranales cuya función es la hidrólisis de lípidos fosforilados, entre ellos el PA, LPA, S1P, C1P y el diacilglicerol pirofosfato (Brindley & Waggoner 1998; Roberts et al. 1998). Existen 4 tipos de LPPs: LPP1, LPP2 y LPP3 – codificadas, respectivamente, por los genes Ppap2a, Ppap2c y Ppap2b – y LPP1a, una variante de splicing. Todas son proteínas de alrededor de 300 aminoácidos, con una homología cercana al 40%. Tienen 6 pases transmembranales, con el extremo amino y carboxilo localizados en la cara citosólica de la membrana y el sitio catalítico en la cara externa de la membrana plasmática o la cara luminal de compartimentos subcelulares y son capaces de formar homo o heterodímeros con actividad catalítica (Sigal et al. 2005; Long et al. 2008; Brindley 2004).

Sus dominios catalíticos conservados, C1, C2 y C3 se encuentran en sus segundas y terceras asas extracelulares y es en donde la actividad de fosfatasa toma lugar, además de tener una región blanco para N-glicosilación. Se cree que el dominio C1 es el responsable del reconocimiento de sustrato y C2 y C3 es donde la reacción de fosfotransferasa ocurre (**Figura 2**) (Sigal et al. 2005).

El patrón de expresión de estas enzimas es heterogéneo y cambia durante la vida del organismo. LPP1 y LPP2 se expresan difusa y generalizadamente durante el desarrollo embrionario, mientras que LPP3 se expresa dinámicamente y de forma tejido específica durante el mismo periodo (Escalante-Alcalde et al. 2003). En contraste, durante la vida adulta, LPP1 y 2 tienen patrones de expresión más

localizados, mientras que LPP3 tiene una más generalizada (Hooks et al. 1998; Kai et al. 1997).

Se han realizado numerosos estudios para descubrir el papel de estas LPPs en contextos celulares específicos. La mutación nula de LPP1 no mostró ningún fenotipo visible en cuanto morfología, comportamiento y fertilidad de los ratones transgénicos que la tienen, pero sí una alteración en los niveles de LPA en sangre (Tomsig et al. 2009). Mientras tanto, la sobreexpresión de esta misma enzima mostró efectos severos en el tamaño, fertilidad y el pelaje, sin ver diferencias en los niveles de LPA (Yue 2004). Aunque LPP1 parece tener una ectoactividad enzimática importante, representando alrededor de la mitad de la actividad de fosfatasa y fosfohidrolasa de LPA en los tejidos donde es expresada, su relevancia en la regulación de los niveles de LPA u otros lípidos bioactivos, ya sea en sangre, extra o intracelularmente, es aún controvertida (Chun 2013; Tomsig et al. 2009). Otros estudios parecen apuntar a un papel como regulador de la señalización intracelular, asociándolo con la activación de ERK en respuesta a LPA y su participación en algunos tipos de cánceres (principalmente de ovario y próstata, tejidos donde la enzima se expresa de forma considerable) y en la maduración de tejido linfático ha sido reportada en varias ocasiones (Long et al. 2006; Smyth et al. 2003; Imai et al. 2000; Tanyi et al. 2003).

Similarmente a lo observado con LPP1, la mutación de LPP2 no tiene fenotipos visibles sobre el desarrollo embrionario, la morfología, comportamiento o fertilidad de los ratones transgénicos carentes de la enzima y su patrón de expresión se encuentra mucho más limitado (Zhang et al. 2000; Chun 2013). La LPP2 ha sido relacionada con la regulación de la entrada al ciclo celular y de algunas ciclinas no esenciales en fibroblastos, pero aún no existe suficiente información para conocer su papel en otros tipos celulares (Morris et al. 2006).

2.3 LPP3

La fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (anteriormente conocida como Pap2b) es el tercer miembro de las LPPs y posiblemente el más versátil de ellos. Esta enzima

es estructuralmente idéntica a los otros miembros de la familia y comparte una gran homología con ellos.

A diferencia de LPP1 y LPP2, la LPP3 contiene un dominio RGE (homólogo al RGD en humanos) de unión a integrinas en la segunda asa extracelular, que posiblemente le confiere funciones relacionadas a adhesión celular, independientemente de su actividad ectoenzimática (**Figura 2**) (Humtsoe et al. 2005).

Se sabe que la LPP3 también es capaz de regular negativamente la señalización canónica de Wnt mediada por β -catenina durante el desarrollo embrionario mediante mecanismos dependientes e independientes de su actividad catalítica (Escalante-Alcalde & Hernandez 2003). En otros contextos parece que regula a esta vía de forma positiva. Su localización subcelular, dependiente de confluencia, determina su efecto sobre la estabilización o activación de β -catenina y posteriormente de LEF-1, y su asociación con las uniones adherentes (mediante la proteína p120) en células endoteliales (Humtsoe et al. 2010). Es precisamente esta vía de señalización, y la regulación de Ciclina D1, las que se creen responsables de algunas propiedades tumorigénicas que se han observado como consecuencia de la expresión de LPP3 en algunos tipos de cánceres (Chatterjee et al. 2011).

Intracelularmente, se ha descrito que la ausencia de LPP3 provoca defectos en el transporte retrógrado entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (ER), dependientemente de su actividad catalítica. Lo anterior aparentemente es provocado por la disminución en los niveles de DAG asociado al Golgi, que se ven afectados por la ausencia de la enzima, la cual transita por esta vía en su camino hacia la membrana plasmática (Gutiérrez-Martínez et al. 2013).

La LPP3 ha demostrado tener papeles muy importantes durante el desarrollo embrionario y la vida adulta en mamíferos en una gran variedad de tipos celulares. Existe un volumen amplio de estudios que han buscado determinar su función en varios estadios de la vida del ratón y en las distintas regiones donde se expresa. Muchos de sus efectos descritos pueden ser asociados a su papel en la formación

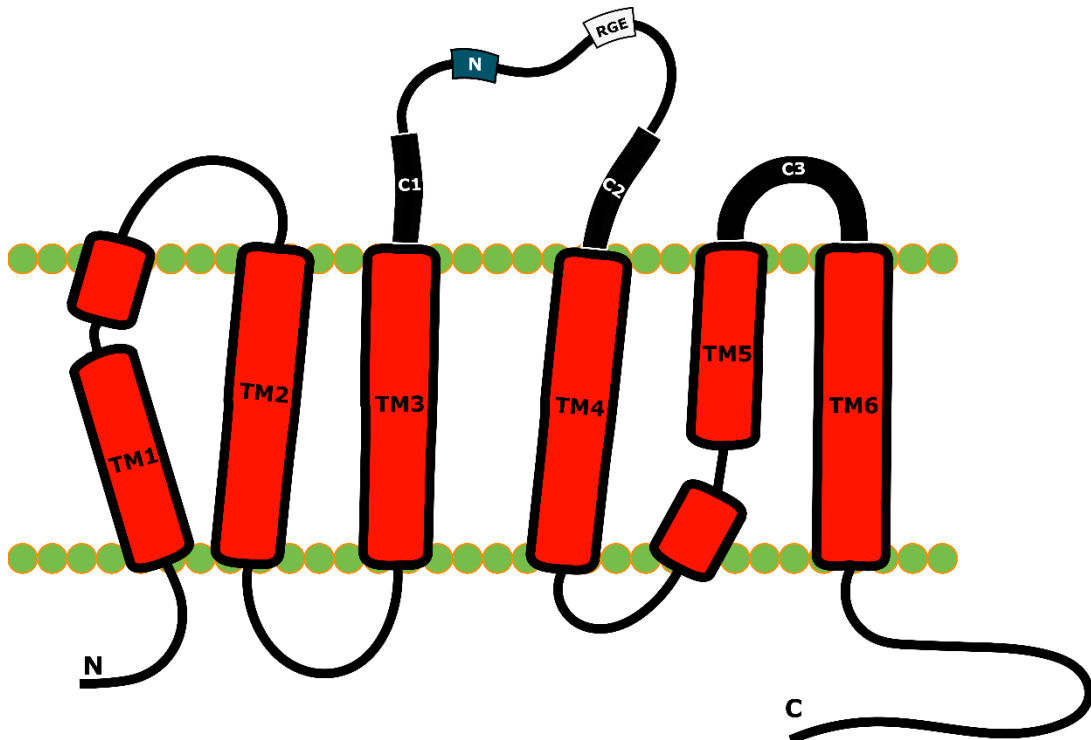


Figura 2. Estructura de la LPP3.

Modelo de la estructura de la LPP3, conservada en todas las LPPs. Se observan sus 6 segmentos transmembranales (TM1-6), el sitio catalítico en las asas extracelulares 2 y 3 (C1-3) y los sitios para N-glicosilación (N) y de unión a integrinas (RGE) en el asa extracelular 2.

y mantenimiento de la vasculatura, pero existe evidencia que apunta hacia su participación directa en otros contextos celulares.

LPP3 en el desarrollo embrionario

Durante el desarrollo del ratón, LPP3 tiene un patrón de expresión dinámico y localizado – a diferencia de LPP1 y LPP2 – y se expresa de manera importante en muchas estructuras embrionarias. Desde estados tempranos (día E9.5) se pueden observar claramente regiones con niveles altos de expresión de LPP3, en el alantoides, mesodermo paraxial, notocorda, endodermo visceral, entre otras. Este patrón de expresión cambia al avanzar el desarrollo embrionario y se hace presente en los epitelios endo y ectodermales de la membrana timpánica, somitas

y mesodermo presomítico, corion, tejido paraxial, placenta y la cresta epidérmica apical, hacia el día E13.5. Cabe mencionar que en estados avanzados del desarrollo, la LPP3 parece tomar un papel más preponderante en regiones del Sistema Nervioso Central y periférico, evidente por su expresión en la corteza anterior, mesencéfalo, romboencéfalo, ganglios e interneuronas periféricos y el primordio del cerebelo (Escalante-Alcalde et al. 2009).

Acorde con la importancia de esta enzima en el desarrollo, la mutación nula demostró ser letal embrionaria al día E9.5, probablemente provocado por severos defectos en la vasculogénesis del saco vitelino y el consecuente colapso del plexo capilar del alantoides. Además, los embriones carentes de LPP3 mostraron defectos en la gastrulación y duplicación de ejes como consecuencia de la mutación (Escalante-Alcalde et al. 2003).

En cuerpos embrionarios derivados a partir de células troncales embrionarias (ESCs) de ratones mutantes para LPP3 se observó un aumento en la muerte celular por apoptosis y una disminución en la proliferación celular. Cuando estas células fueron diferenciadas hacia el linaje neuronal, el número de neuronas formadas y la extensión de las neuritas generadas disminuyeron considerablemente como consecuencia de la mutación, en adición a la aparición de células de músculo liso. Aunque el mecanismo no está del todo claro, se pudo medir un aumento significativo en los niveles extracelulares de DHS1P (dihidro-S1P) en los EB mutantes, lo cual apunta hacia un mecanismo mediado por lípidos (Sánchez-Sánchez et al. 2012).

LPP3 es la proteína homóloga en ratón de wunen (wun y wun2), una fosfatasa de lípidos de *D. melanogaster* que dirige la migración de células germinales primordiales durante el desarrollo embrionario. Wunen es expresado en el intestino y actúa generando señales repulsivas, muy probablemente de lípidos, que dirigen la migración de las células germinales hacia las gónadas, además de promover su supervivencia (Zhang et al. 1997; Renault et al. 2010). La expresión de LPP3 durante el desarrollo podría apuntar hacia una función homóloga en el desarrollo de la línea germinal en ratón.

LPP3 durante la vida adulta

En contraste a lo observado durante el desarrollo, en el ratón adulto la expresión de LPP3 es más ubicua aunque con algunas regiones de mayor expresión, como el SNC, pulmón o endotelio vascular (Su et al. 2004; Kai et al. 1997). Dada la letalidad embrionaria mencionada, el estudio del papel de la LPP3 durante la vida adulta *in vivo* es complicado, pero estudios *in vitro* y realizados utilizando mutantes condicionales han mostrado una amplia variedad de roles en los que puede estar participando.

Como ocurre durante el desarrollo embrionario, la LPP3 juega un papel importante en el desarrollo y la fisiología del sistema vascular y linfático en el adulto (Senda et al. 2009). Su ausencia en células endoteliales tiene como consecuencia una mayor permeabilidad y sensibilidad a procesos inflamatorios. Lo anterior, fue atribuido a la disrupción en la señalización mediada por LPA y regulada por LPP3 (Panchatcharam et al. 2014).

LPP3 también es expresada en células de músculo liso (SMC) vascular, donde regula la tasa de proliferación celular y migración, dependientes de LPA. En ratones con la enzima deletada selectivamente en SMCs, la respuesta ante lesiones vasculares se vio considerablemente afectada.

Función de la LPP3 en el SNC

En el SNC, existen regiones con expresión de la LPP3 durante la vida adulta del ratón, la de mayor nivel de expresión es el cerebelo.

Utilizando un ratón con una mutación condicional (Escalante-Alcalde et al 2009) en el que LPP3 se encuentra deletado solamente en el tejido neural, se buscó determinar el papel que esta enzima juega en el desarrollo y mantenimiento del cerebelo. Como consecuencia de la mutación, se observaron defectos en el desarrollo de dicha estructura, alteraciones en la arquitectura celular y distribución de células de la Glía de Bergmann (un tipo de glía radial que es esencial para el desarrollo y funcionamiento del cerebelo), así como defectos motores en el ratón adulto. Los fenotipos anteriores fueron explicados, mediante técnicas moleculares

y farmacológicas, por la disminución en la señalización de S1P observada, como consecuencia de la ausencia de LPP3, provocada por desensibilización por internalización del receptor S1P₁ (López-Juárez 2011).

Además del cerebelo, la LPP3 es expresada en buena medida en otras regiones del cerebro adulto. Es de importancia, especialmente para este trabajo, su presencia en el giro dentado (DG) del hipocampo, los ventrículos laterales (LV), la Corriente Migratoria Rostral (RMS) y los bulbos olfatorios (**Figura 3**) (Lein et al. 2007). Todas estas regiones y en particular los LV y DG han cobrado una gran relevancia al ser las únicas en las que neurogénesis adulta ha sido observada en

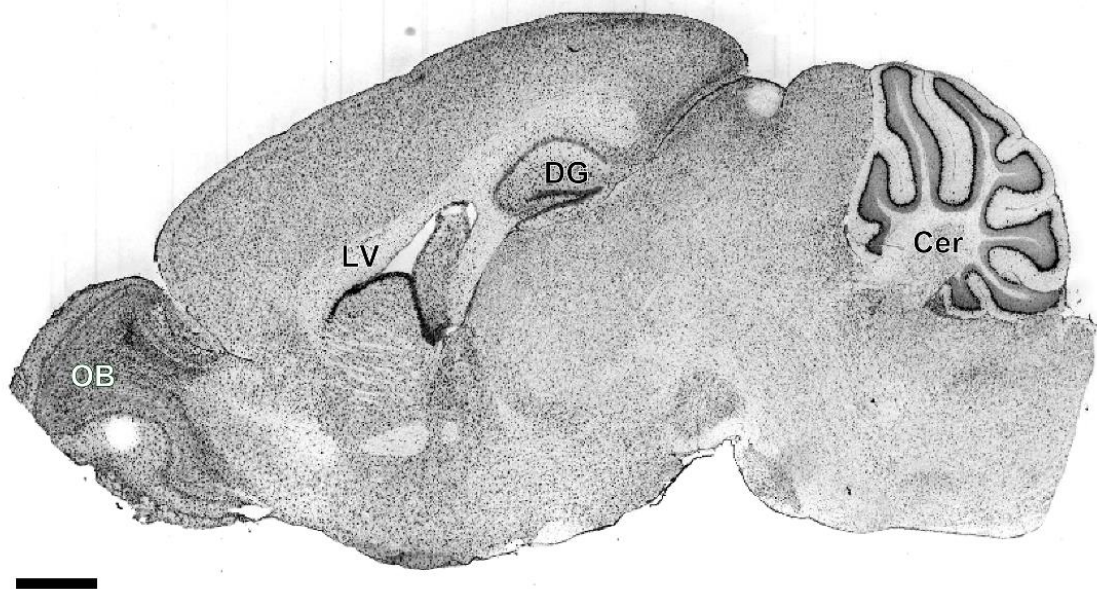


Figura 3. Patrón de expresión de la LPP3 en el SNC adulto.

Hibridación *in situ*, mostrando las regiones de mayor expresión de LPP3 en una sección sagital del cerebro de un ratón adulto. OB, bulbo olfatorio; LV, ventrículo lateral; DG, giro dentado del hipocampo; Cer, cerebelo. Barra de escala =: 1 mm. Tomada y modificada del Allen Brain Atlas (Lein et al. 2007).

mamíferos. Ésta es la habilidad de algunas regiones de mantener su capacidad neurogénica en la vida adulta, y se ha convertido en un fértil campo de estudio debido al gran potencial que puede ofrecer.

Lo anterior, aunado a las propiedades señalizadoras de las moléculas blanco de la LPP3 durante procesos neurogénicos – en particular LPA y, en menor medida, S1P – abre la puerta para esta enzima como un mediador importante de la señalización por lípidos en este complejo proceso.

2.4 Neurogénesis adulta

Durante mucho tiempo, fue ampliamente aceptada la noción de que en los vertebrados superiores no existía la generación de neuronas en el cerebro adulto. La falta de evidencia de la presencia de actividad mitótica en el SNC en los organismos maduros fue suficiente para soportar la idea de un cerebro estático e incapaz de generar nuevas neuronas funcionales e integrarlas a su circuito. Estudios realizados utilizando métodos radiográficos en la década de los 60 dieron los primeros indicios de la existencia de actividad mitótica postnatal en la corteza cerebral de ratas adultas y, posteriormente, en el giro dentado del hipocampo y lo que posteriormente se conocería como RMS (Altman 1962; Altman 1969; Altman & G. Das 1965).

Después de un par de décadas de evidencia que soportaba las observaciones que Altman realizó en los años 60, finalmente pudo ser rebatida la antigua idea del cerebro adulto estático e incapaz de generar neuronas funcionales. Hoy sabemos que en mamíferos esto continúa sucediendo en la edad adulta del organismo, pero esta capacidad neurogénica se encuentra limitada a solamente dos regiones discretas: la zona subventricular (SVZ, también conocida como zona subependimal) de los ventrículos laterales (LVs) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo (Abrous et al. 2005; Lee et al. 2012).

Como será mencionado más adelante, ambos nichos neurogénicos comparten muchas similitudes en cuanto a su composición y la progresión de sus procesos

de neurogénesis, pero con diferencias fundamentales que las hacen únicas. En ambas, miles de neuronas nuevas son generadas cada día (cerca de 15,000 en la SVZ del ratón; se estima que entre 4,000 y 9,000 en la SGZ de rata). De ellas, sólo una fracción logra sobrevivir e integrarse funcionalmente al circuito preexistente de su correspondiente blanco – en el caso de las neuronas de la SVZ, los bulbos olfatorios; en el de la SGZ, la capa molecular del DG del hipocampo (Belzung & Wigmore 2013).

Aún no existe un consenso acerca de la función que la neurogénesis adulta tiene en los organismos en los que se presenta. La evidencia sugiere que la conservación de la capacidad neurogénica en la vida adulta ha sido favorecida debido a la plasticidad y adaptabilidad que confiere a los sistemas en los que se lleva a cabo, a pesar del alto costo que representa (Jessberger & Gage 2014). En roedores, donde el sentido del olfato tiene un papel preponderante, la alta tasa neurogénica en la SVZ adulta y la consecuente plasticidad en los circuitos de reconocimiento de olores que confiere, han representado una ventaja evolutiva que ha permitido su existencia en el cerebro adulto (Doetsch et al. 1997). En humanos, donde el sentido del olfato tiene un papel más secundario, la neurogénesis en la SGZ parece estar más conservada y ser de mayor relevancia. Lo anterior puede ser explicado dada la importancia que la memoria espacial y el aprendizaje han tenido durante nuestro camino evolutivo y la adaptabilidad que el proceso neurogénico proporciona ante ambientes ricos en estímulos (Kempermann 2012; Ming & Song 2011).

El descubrimiento de la existencia de actividad neurogénica en estas regiones durante la vida adulta ha tenido un gran impacto en la investigación médica actual. Además de ayudar a probar que el cerebro es un órgano altamente plástico y en constante reestructuración, la posibilidad de generar neuronas nuevas en un cerebro viejo, con la capacidad de formar conexiones funcionales con un circuito preexistente abre la puerta a un promisorio campo de investigación. El proceso neurogénico durante la adultez es altamente complejo y en él participan una gran cantidad de señales que se encargan de regular su progresión adecuada.

Entender los procesos que regulan la neurogénesis adulta puede acercarnos a, en el futuro, obtener la capacidad de tratar enfermedades que representan la pérdida progresiva de poblaciones específicas de neuronas que no podrían ser recuperadas de otra forma.

La Zona Subventricular

La región directamente debajo de la superficie de las paredes laterales de los ventrículos laterales – la zona subventricular o subependimal (SVZ o SEZ) – ha sido la zona neurogénica más estudiada desde que este fenómeno fue descrito (Altmann 1969). El nicho neurogénico de la SVZ contiene una población heterogénea de células que mantienen las condiciones necesarias para la generación continua de neuronas durante la edad adulta. Ahí, a partir de células troncales neurales, se generan progenitores neurales que tienen una alta actividad mitótica y que, a su vez, son capaces de diferenciarse hacia neuroblastos que posteriormente darán lugar a neuronas maduras. Dado que las neuronas generadas en esta región tienen como destino final diferenciarse hacia interneuronas en los bulbos olfatorios (OB), éstas migran una gran distancia hasta alcanzarlos, dando lugar a la RMS (Ihrie & Alvarez-Buylla 2011; Lledo et al. 2008).

El nicho neurogénico de la SVZ

La región de la SVZ adulta donde es posible la generación de neuronas tiene una composición única que permite que se den las condiciones para la progresión del proceso neurogénico.

Cubriendo la pared de los ventrículos se encuentran las células ependimales. Estas células multiciliadas de características neuroepiteliales son las encargadas de la secreción del líquido cefalorraquídeo y del transporte de nutrientes en el sistema ventricular del cerebro y el canal central de la médula espinal (Spassky et al. 2005). Su importancia para la neurogénesis adulta radica en el aislamiento que proporcionan al nicho neurogénico, manteniéndolo separado de la región ventricular, al mismo tiempo que favorecen el suministro de los nutrientes

esenciales y factores regulatorios para mantener la actividad de células troncales y progenitores neurales (Mirzadeh et al. 2010; Gajera et al. 2010).

En una asociación muy cercana con las células endodimales se encuentran las células troncales neurales (NSCs; también llamadas células B). Estas células tienen características morfológicas de células de astrogliá y expresan combinaciones de marcadores moleculares característicos de células de este tipo celular como GFAP, BLBP, Glast, Nestina y SOX2, entre otros (Hartfuss et al. 2001; Hack et al. 2005; Mirzadeh et al. 2010). Generalmente son separadas en dos poblaciones: las células B1, de morfología más radial y menor actividad mitótica, con proyecciones hasta las paredes ventriculares donde hacen contacto con el ventrículo; y células B2, morfológicamente menos radiales y se encuentran alejadas de los ventrículos, sin tener contacto con ellos (Seri et al. 2001). Ambas poblaciones tienen contactos con los vasos sanguíneos en la cercanía de la SVZ, con la matriz extracelular y con los neuroblastos recién generados, alrededor de los cuales generan una capa aislante que los recubre (Ihrie & Alvarez-Buylla 2011).

Aunque algunas subpoblaciones de las NSCs tienen actividad mitótica, la mayor parte de la proliferación celular en esta región es llevada a cabo por otro tipo celular: los progenitores neurales de amplificación transitoria (TAPs; células tipo C). Estas células son progenitores multipotentes con una alta tasa de división y ciclo celular corto, capaces de dar lugar a los linajes neuronal, glial y oligodendrogliá, aunque con una mayor preferencia por los primeros. Las TAPs se encuentran también cercanas a las NSCs en el nicho pero conforme progresa su diferenciación hacia neuroblastos éstas migran, alejándose de la SVZ (Doetsch et al. 1997; Morshead et al. 1998).

Los neuroblastos (células A) son los precursores neuronales con actividad mitótica y son las células con mayor capacidad migratoria en el proceso neurogénico. Tras ser generados en la SVZ por medio de divisiones asimétricas de las TAPs, los neuroblastos comienzan el largo camino (de entre 3 y 8 mm) hacia los OBs dando lugar a la RMS, una larga cadena de neuroblastos en migración, asociados por

medio de uniones intercelulares y cubiertos por una capa de células gliales envolventes (Temple & Alvarez-Buylla 1999; Kaneko & Sawamoto 2007).

Generación de neuroblastos en la SVZ y su maduración en el OB

Como se mencionó anteriormente, el fin del proceso neurogénico en la SVZ es la generación de neuronas que serán integradas en el circuito de los OBs a partir de NSCs.

Estas células troncales son una población heterogénea. Se sabe que pueden tener una muy limitada actividad mitótica, es decir, encontrarse en estado quiescente (qNSCs), o bien, estar activadas (aNSC) para entrar en ciclo celular y generar progenie neural. Aunque determinar la identidad de las NSC en la SVZ ha sido un reto para los grupos que han estudiado esta región en el pasado, evidencia reciente apunta a que es las verdaderas NSCs son células de morfología radial que coexpresan GFAP y Prominina y que la transición entre qNSC y aNSC está marcada por la expresión de EGFR en las células activadas (Codega et al. 2014; Pastrana et al. 2009).

Las aNSCs pueden generar TAPs por medio de divisiones simétricas, además de ser capaces de autorrenovarse por medio de divisiones asimétricas. Los mencionados progenitores amplificativos representan el paso más proliferativo; estas células son capaces de dividirse simétricamente hasta 5 veces, dando lugar a los progenitores neuronales comprometidos: los neuroblastos (Costa et al. 2011).

Una vez diferenciados, los neuroblastos conservan su capacidad mitótica y altamente migratoria. Es en este estado de diferenciación en el que las células migran desde la SVZ hasta los OBs (Lois & Alvarez-Buylla 1994). La cadena de neuroblastos en migración (cubiertos por una capa de células gliales envolventes) que abandona el nicho de la SVZ continúa anteriormente y da lugar a la RMS. Dentro de la corriente migratoria es posible que los neuroblastos sufran posteriores divisiones que darán lugar a un mayor número de neuronas maduras (Pastrana et al. 2009; Hack et al. 2005).

Al llegar a su destino, los neuroblastos proceden a diferenciarse terminalmente hacia neuronas postmitóticas. Éstas podrán integrarse funcionalmente como células granulares o periglomerulares, interneuronas GABAérgicas que forman contactos con muchas de las células que componen el circuito de los OBs. Existen muchas subpoblaciones de estas interneuronas, morfológica y funcionalmente distintas (dependiendo del tipo de conexiones que realicen al integrarse al OB) y se sabe que el tipo específico de interneurona que será formada depende de la posición de origen dorso-ventral y antero-posterior dentro de la SVZ, así como dentro de la RMS (Hack et al. 2005; Mercier et al. 2002; Lledo et al. 2008).

La Zona Subgranular

El hipocampo ha sido descrito por mucho tiempo como una de las zonas de mayor plasticidad y adaptabilidad en el SNC de mamíferos. Se asocia con la formación de memoria de corto plazo, sensorial, espacial y temporal, así como con aprendizaje. Dentro del giro dentado del hipocampo, debajo de la capa de células granulares, se encuentra la SGZ. Aunque similar en muchos aspectos a la SVZ, el nicho de la SGZ difiere considerablemente en sus características citoarquitectónicas y en menor medida en la identidad de las células que lo componen.

Al igual que en la SVZ, en la zona subgranular son generadas un gran número de neuronas a partir de NSCs que mediante ciclos celulares progresivos dan lugar a progenitores neurales, neuroblastos y finalmente neuronas, que madurarán hacia células granulares. Éstas migran tangencialmente una distancia muy corta y sus proyecciones contactan la capa molecular del giro dentado del hipocampo integrándose a este circuito. La función de estas células granulares consiste en la modulación de señales que provienen de la corteza entorrineal a través de la vía perforante, y la transmisión de sus impulsos hacia las neuronas piramidales de CA3 en el hipocampo (Rolls 1996; Masiulis et al. 2011).

El nicho de la SGZ, formación de neuronas en el DG y los factores que la modulan

Estructuralmente, el nicho de la SGZ es muy distinto al de la SVZ, sin embargo, el proceso neurogénico es similar y se cree que las NSCs de ambos nichos son fundamentalmente análogas. La zona subgranular se encuentra entre la capa de células granulares y la región hiliar del DG del hipocampo. Ahí, una población

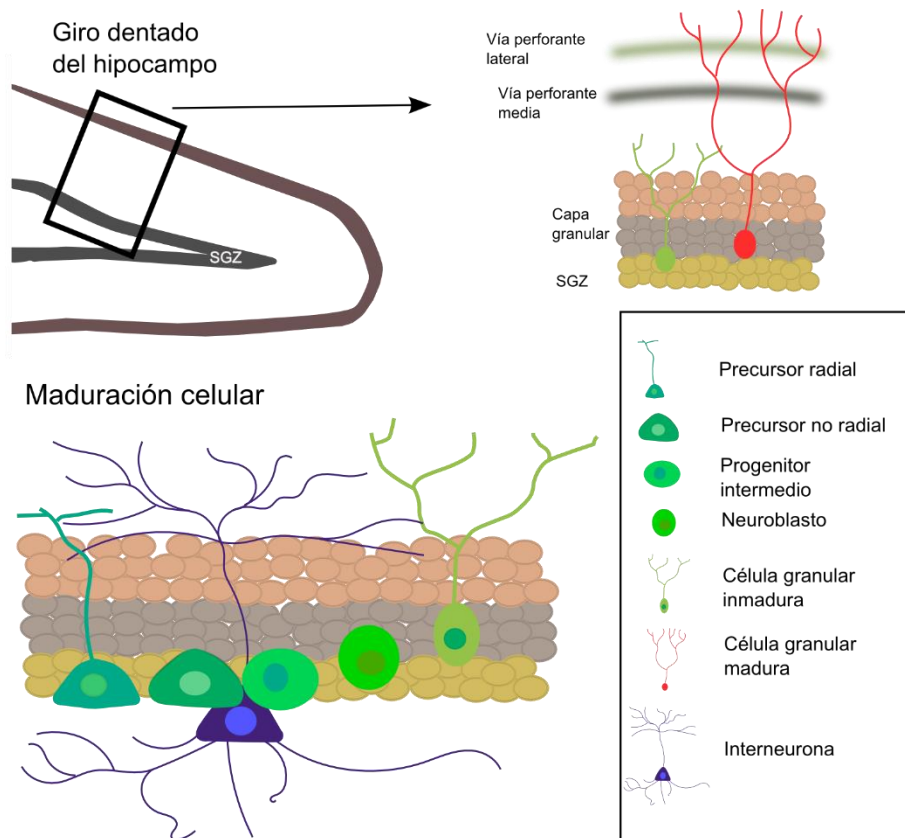


Figura 4. El nicho de la SGZ y el proceso de neurogénesis.

Ubicación de la SGZ dentro del DG del hipocampo. Proceso de formación de neuronas granulares maduras y su inclusión en el circuito hipocampal, a partir de NSCs.

residente de NSCs con morfología radial es capaz de activarse, entrar en ciclo celular y dar lugar a progenitores intermedios que tras algunos ciclos de división (2-3) dan lugar a los neuroblastos que madurarán hasta convertirse en células granulares (**Figura 4**). A diferencia de lo que ocurre en la SVZ, en la SGZ el

proceso completo ocurre dentro del mismo giro dentado, en una región muy pequeña. Debido a esto, la capacidad migratoria de los neuroblastos tiene una menor relevancia en el caso de la neurogénesis hipocampal.

Se conocen marcadores moleculares que son expresados por los distintos tipos celulares dentro del nicho de la SGZ y en su mayoría coinciden con los de la SVZ. Debido a la alta heterogeneidad celular de la región, marcadores individuales pueden ser poco confiables para determinar la identidad de una célula y en algunos casos es necesario el uso de combinaciones de ellos. Las NSCs expresan GFAP, GLAST, Sox2, Nestina y BLBP y, al igual que en la SVZ, la expresión de Prominina y EGFR son marcadores de la activación de las células troncales (Platel et al. 2009; Costa et al. 2011; Pastrana et al. 2009; Doetsch et al. 1999; Coskun et al. 2008). Cuando las NSCs comienzan a diferenciarse hacia progenitores intermedios, aumenta la expresión de Tbr2 y Mash1 al mismo tiempo que disminuyen los marcadores de troncalidad (Parras et al. 2004; Hartfuss et al. 2001). Los neuroblastos que son formados a partir de estos progenitores intermedios comienzan a expresar Doblecortina, el marcador de neuroblastos por excelencia (Francis et al. 1999). Conforme éstos comienzan a madurar, aparecen marcadores como β -III Tubulina y PSA-NCAM de neuronas jóvenes; finalmente, las neuronas maduras y funcionales pueden ser identificadas por la expresión de NeuN, Calbindina o Calretinina (Ihrie & Alvarez-Buylla 2011; Celio et al. 1990; Seki & Arai 1993; Seri et al. 2004).

Existen también muchos factores que afectan la tasa de neurogénesis adulta tanto en la SGZ como en la SVZ. La edad, factores hormonales, ejercicio y ambientes enriquecidos, entre otros, tienen efectos sobre la generación de neuronas en el cerebro adulto: el ejercicio y enriquecimiento de estímulos la promueven, mientras que el envejecimiento y el embarazo, por ejemplo, la limitan (Galea et al. 2006; Lee et al. 2012). En el caso de la SGZ, se sabe que el estado natural es el de una muy activa neurogénesis y los efectos positivos del ejercicio y ambientes ricos en estímulos emulan lo que sucede en roedores salvajes (Klaus & Amrein 2012; Clark et al. 2009).

Además de los factores endógenos y exógenos que inciden en la capacidad neurogénica de la SGZ y SVZ, existen varias vías de señalización que han sido relacionadas con los procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación dentro de estos nichos. La vía de Wnt, por ejemplo, ha sido asociada con la diferenciación y proliferación celular en progresión hacia linaje oligodendroglial o neuronal en precursores neurales de SVZ y SGZ, respectivamente, así como en la proliferación y regulación de ciclo celular a través de la señalización por medio de su vía canónica (Varela-Nallar & Inestrosa 2013; Ortega et al. 2013; Lie et al. 2005).

La señalización mediada por lípidos en la neurogénesis

A pesar de todo lo que se conoce acerca de los factores ambientales y fisiológicos que afectan la neurogénesis en el cerebro adulto, existe información muy limitada relacionada al papel de la señalización por lípidos en este proceso. Lo anterior resulta sorprendente, debido a su importancia en la regulación de procesos celulares en el SNC.

Mucha de la información que existe acerca del papel de los lípidos bioactivos en el proceso neurogénico viene de estudios realizados durante el desarrollo embrionario, donde la neurogénesis es un proceso esencial en el sistema nervioso en formación.

S1P ha sido descrito como un potente regulador en el sistema nervioso, con altos niveles de expresión de sus receptores (particularmente S1P1) en tejido neural y con efectos diversos dependiendo del tipo específico de receptor expresado (Chae, Paik, et al. 2004). La señalización dependiente de S1P ha sido asociada con procesos proliferativos y de diferenciación hacia linaje neuronal, siendo la mutación de Sphk1 letal embrionaria con severos defectos en el desarrollo neural y angiogénesis (Mizugishi et al. 2005; Mendelson et al. 2013). Su asociación cercana con la vía de Notch y la regulación dependiente de ERK la hacen también un poderoso regulador de la neurogénesis y su papel en la neurogénesis adulta

apenas comienza a ser elucidado (Harada et al. 2004; Herr & Chun 2007; Anderson & Maes 2014).

El otro lípido más estudiado debido a sus efectos en señalización, LPA, también ha sido relacionado con la neurogénesis embrionaria. LPA ha sido asociado principalmente con el inicio y progresión de la neurogénesis en la corteza cerebral en desarrollo, así como la migración, maduración y doblamiento de estructuras corticales (Sheng et al. 2015; Frisca et al. 2013; Kingsbury et al. 2003; Spohr et al. 2008). Además, estudios *in vitro* han demostrado un considerable efecto en la proliferación de precursores neurales y la extensión de proyecciones en neuronas en maduración, promoviendo la retracción axonal (Yamane et al. 2010; Sánchez-Sánchez et al. 2012; Svetlov & Ignatova 2004).

A pesar de lo anterior, es posible encontrar indicios de la relevancia de los lípidos bioactivos en el proceso neurogénico adulto, en particular en el del hipocampo. La alta expresión en la SGZ de receptores de lípidos para S1P y LPA es el primero de ellos, principalmente los receptores 1 y 2 para LPA y el receptor 1 de S1P (Lein et al. 2007). Como se mencionó anteriormente en ratones nulos para el LPA₁, se observaron defectos en la capacidad neurogénica de la SGZ *in vivo*. Los ratones mutantes mostraron una disminución en la proliferación, diferenciación, maduración y supervivencia de las neuronas generadas postnatalmente, así como una morfología aberrante de estas células y de sus proyecciones. Además, como consecuencia de la mutación, los ratones muestran alteraciones del comportamiento, memoria espacial y respuesta a condiciones de estrés (Matas-Rico et al. 2008; Santin et al. 2009).

3. PLANTEAMIENTO

Sabemos que la LPP3 se encuentra expresada de manera importante en las zonas neurogénicas del cerebro adulto. En estudios previos del papel de la LPP3 en el sistema nervioso, se ha observado una contribución significativa de algunas

de sus moléculas blanco en procesos de proliferación, migración, diferenciación y muerte celular.

Tomando en cuenta lo anterior, podemos suponer que la presencia de la enzima en la SGZ del hipocampo adulto tiene relevancia para el proceso de neurogénesis *in vivo*, posiblemente en los procesos celulares mencionados y que se ven afectados en ausencia de la enzima. Al evaluarlos *in vitro*, se espera encontrar diferencias significativas entre los cultivos obtenidos de ratones silvestres y aquellos carentes de la LPP3, como consecuencia de alteraciones en la señalización por lípidos.

4. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la neurogénesis adulta es un campo muy promisorio y que ha generado un gran interés en la comunidad científica debido a las posibilidades que puede ofrecer. Conocer las moléculas involucradas en promover y mantener este proceso en las regiones únicas en donde se lleva a cabo, es un paso crucial para llegar al entendimiento de la neurogénesis en general y representa un obstáculo clave que sortear para poder comenzar a explorar su potencial como blanco terapéutico.

La LPP3 ha demostrado ser una enzima multifacética y con funciones relevantes durante el desarrollo y vida adulta de mamíferos. Hasta ahora, en las regiones y tipos celulares en los que se ha demostrado su presencia, se le han podido atribuir papeles como reguladora de la señalización mediada por lípidos. Su expresión en el SNC, la evidencia de señalización de sus moléculas blanco y su localización en regiones neurogénicas, apuntan a la LPP3 como un posible regulador del proceso neurogénico en el hipocampo adulto. Por todo lo anterior, es necesario obtener datos que ayuden a determinar el nivel de su participación, si es que existe, así como el rol particular que desempeña en este proceso.

5. OBJETIVO

Utilizando el cultivo de neuroesferas como herramienta, determinar si la ausencia de LPP3 en células del sistema nervioso del ratón afecta la proliferación o diferenciación de precursores neurales del hipocampo adulto *in vitro*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Mutante condicional de *Ppap2b*

Dada la letalidad embrionaria de la mutación nula de la LPP3, es necesario utilizar mutantes condicionales que nos permiten analizar las consecuencias de su ausencia de forma tejido específica. Para esto fue generado previamente un ratón mutante condicional exclusivo para el SNC, utilizando el sistema *Cre/loxP* (Escalante-Alcalde et al. 2007).

Brevemente, los exones 3 y 4 de la LPP3 fueron flanqueados por secuencias *loxP* en ratones transgénicos (LPP3 *f/f*) y cruzados con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de Nestina (Nestin:Cre), un marcador de linaje neural que se expresa temprano durante el desarrollo. Como resultado del genotipo de esta cruce, la progenie que heredó la expresión de Cre tiene también escindida la región de los exones 3 y 4 del gen de LPP3 y, por lo tanto, carece de la actividad de esta enzima (se genera una proteína trunca sin actividad catalítica y sin RGE) solamente en el SNC (**Figura 5**).

Los ratones resultantes ($\Delta f / \Delta f$) carentes de LPP3 en el sistema nervioso, fueron analizados en varios aspectos con relación a su contraparte control (f/f).

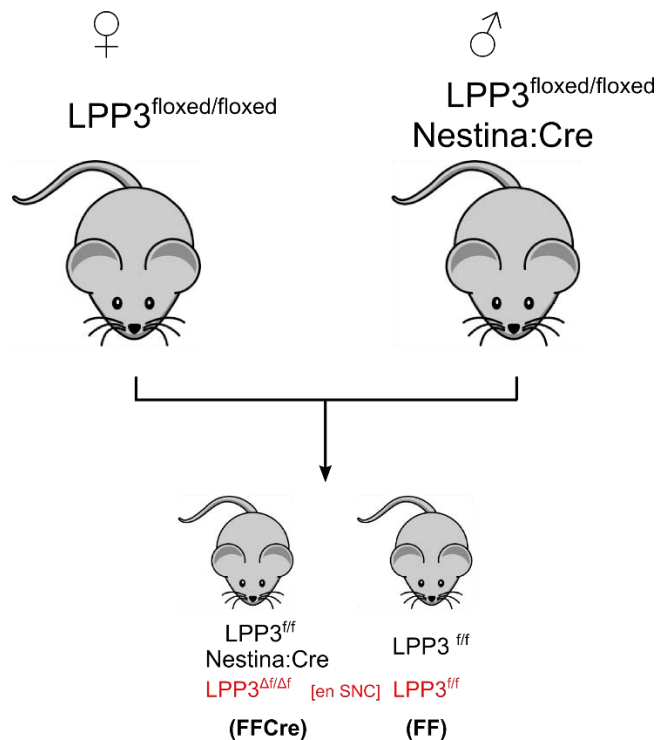


Figura 5. Cruzas de ratones transgénicos para obtener mutante condicional.

Los ratones hembra f/f fueron cruzados con machos f/f Nestina:Cre. La progenie que heredó la expresión de Cre porta la mutación condicional de LPP3 en el sistema nervioso, $LPP3^{\Delta f/\Delta f}$ (FF Cre); los que no heredaron Cre fueron considerados de fenotipo silvestre (FF).

6.2 Genotipificación

Para determinar si la mutación estaba presente, cada ratón nacido debió ser genotipado al cumplir tres semanas de edad. Primero, fue asignado un número específico a cada ratón correspondiente a la cuenta total llevada en la colonia. El

número siempre se encuentra asociado al ratón por medio de un sistema de identificación por perforaciones en las orejas. Todos los ratones marcados fueron, entonces, genotipados como se describe a continuación.

Extracción de DNA

Buffer de lisis para DNA

	[Final]
- 10 ml SDS 20%	2%
- 200 µl NaCl 5M	10mM
- 2 ml EDTA 0.5M pH 8	10mM
- 1 ml Tris 1M pH 8	10mM

En 100 ml de agua MilliQ estéril.

Protocolo

1. Obtener segmentos de alrededor de 0.5 cm de cola de cada ratón. Colectar en tubos marcados.
2. Agregar 375 µl de Buffer de lisis para DNA y 25 µl de Proteinasa K (Roche, 031115844001). Vortexear. Incubar a 37°C ON o a 56°C 2h.
3. Agregar 1 vol (400 µl) de Fenol (Sigma, P1037-500G). Agitar.
4. Agregar 1 vol de Cloroformo-isoamílico (49:1). Agitar.
5. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm. Recolectar 1 vol del sobrenadante en la fase acuosa.
6. Agregar 1 vol de Cloroformo isoamílico. Mezclar. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm. Recolectar 1 vol de sobrenadante en la fase acuosa.
7. Agregar 1 vol de isopropanol. Mezclar. Si se espera obtener una cantidad pequeña de DNA, dejar precipitando ON a -20°C.

8. Centrifugar 10 min a 14,000 rpm. Descartar sobrenadante.
9. Lavar con 500 µl de etanol 70% en agua MilliQ estéril. Centrifugar 10 min a 14,000 rpm.
10. Descartar sobrenadante y dejar secar. Resuspender en 20-100 µl de agua MilliQ estéril/buffer TE dependiendo del tamaño del pellet. Guardar a 4°C a corto plazo.

PCR

Oligonucleótidos

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en las reacciones de PCR para determinar el genotipo de los ratones:

Hlox5' [c] (sentido): 5' GAA GTG CCA TTA CTC TCT CAG C 3'

Hlox3' [d] (antisentido): 5' CCA GGG TGC TAT CTA TCT GTA AC 3'

Nlox5' [a] (sentido): 5' CTA CAG ATG TCA GTC AGT GTG G 3'

Cre1 (sentido): 5' GAA GTG CCA TTA CTC TCT CAG 3'

Cre2 (antisentido): 5' GTG AAA CG CAT TGC TGT CAC TT 3'

Reacción de PCR Flox

	[Final]
- 11.2 µl - Agua MilliQ estéril	
- 1.5 µl - Buffer Mg+ 10X	1X
- 0.3 µl - DNTPs 10 mM	0.2 mM
- 0.3 µl - Nlox5' 10 µM	0.2 µM
- 0.3 µl - Hlox5' 10 µM	0.2 µM
- 0.3 µl - Hlox3' 10 µM	0.2 µM
- 0.1 µl - Taq Polimerasa (Unidad BM, IFC)	0.2 U
- 1 µl - DNA extraído	

Reacción de PCR Cre

	[Final]
- 11.5 μ l - Agua MilliQ estéril	
- 1.5 μ l - Buffer Mg+ 10X	1X
- 0.3 μ l - DNTPs 10 mM	0.2 mM
- 0.3 μ l - Cre1 10 μ M	0.2 μ M
- 0.3 μ l - Cre2 10 μ M	0.2 μ M
- 0.1 μ l - Taq Polimerasa (Unidad BM, IFC)	0.2 U
- 1 μ l - DNA extraído	

Programas

Floxed (Floxed)

1. Lid	110°C	
2. Denaturation	94°C	3'
3. Start	56°C	30"
4.	56°C	1'
5.	72°C	1'
6.	94°C	30"
7. Go to 3. Rep 29		
8. Fin extend	72.5°C	5'
9. Hold	10°C	

Cre genotip (Cre)

1. Lid	105°C	
2. Denaturation	94°C	2'
3. Start	94°C	45"
4.	60°C	45"
5.	72°C	1'
6. Go to 3. Rep 29		
7. Fin extend	72°C	5'
8. Hold	22°C	

Electroforesis

Todos los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de Agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X con bromuro de etidio, durante 30 minutos a

100V. Los gels fueron, después, observados en un transiluminador de luz UV y fotografiados para determinar el genotipo del ratón correspondiente.

Utilizando los oligonucleótidos descritos arriba se pueden obtener una variedad de productos de PCR (Figura 6):

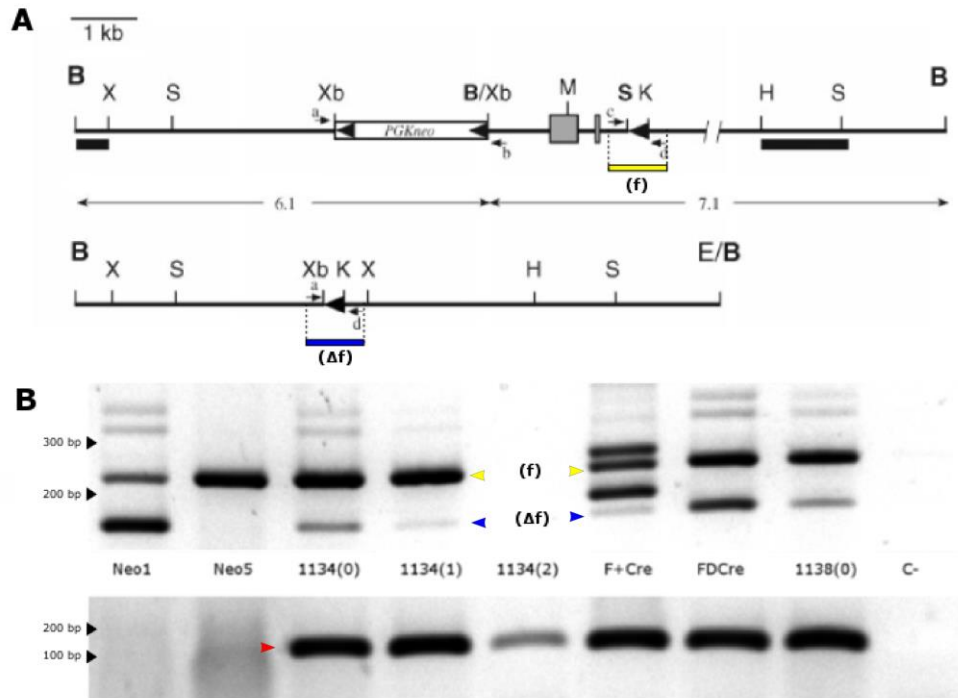


Figura 6. La escisión de los exones 3 y 4 en la mutante condicional de LPP3.

A. Mapa de la construcción de la mutante condicional, en la cual se pueden ver los exones 3 y 4 (cajas grises) flanqueados por secuencias loxP (cabezas de flecha negras) y los productos de las reacciones de PCR generados por los oligonucleótidos específicos para encontrar el genotipo (f y Δf). Modificado de (Escalante-Alcalde et al 2007) **B.** Ejemplo de un gel de agarosa en el cual se pueden ver todos los posibles resultados de la genotipificación. Bandas: f (amarillo) = 235 bp; Δf (azul) = 162 bp; WT= 191 bp; Cre (rojo) = 100 bp.

- (f/f) – FF. Exones flanqueados pero sin expresión de Cre. Ratón silvestre.
- (f/Δf * + Cre) – FFCre. Mutante carente de LPP3 en el sistema nervioso.
- (f/Δf** + Cre) – FΔCre. Mutante con una escisión posiblemente independiente de Cre.
- (f/Δf **) – FΔ. Mutante con escisión independiente de Cre.

Para propósitos de experimentos en este trabajo, sólo fueron utilizados ratones claramente genotipados como FF o FFCre.

**La banda de Δf debe de ser considerablemente más tenue que la de f , al provenir la primera únicamente del tejido neural (que no es predominante en la región de la cola de la cual es extraído el DNA).*

***Si las bandas de f y Δf tienen intensidades similares, es posible que la recombinación y escisión de la región flanqueada por los sitios loxP haya sido independiente de la acción de Cre, posiblemente en la línea germinal de los padres.*

6.3 Cultivo de Neuroesferas

El cultivo de neuroesferas como herramienta para estudiar la neurogénesis

Desde que fue descrito, el ensayo de neuroesferas se ha convertido en uno de los métodos experimentales más socorridos para evaluar la capacidad de células con potencial neurogénico (Tropepe et al. 1999).

Este método se basa en la respuesta que las células troncales y progenitores neurales tienen a la señalización de EGF y, en menor medida, FGF. Estos mitógenos promueven la proliferación celular en estos tipos de precursores *in vitro*, y el incremento de actividad proliferativa provoca la formación de esferas de células, derivadas a partir de uno de estos precursores.

Aunque existen limitaciones inherentes a este sistema, es posible obtener información acerca del tipo de precursores presentes en el tejido, su capacidad proliferativa y, sobre ellos, evaluar *in vitro* otros procesos celulares como la diferenciación o supervivencia, con una alta capacidad de autorrenovación (Xiong et al. 2011; Singec et al. 2006).

Por estas razones, el cultivo de neuroesferas fue la principal herramienta utilizada en este proyecto para evaluar el proceso neurogénico (**Figura 7**).

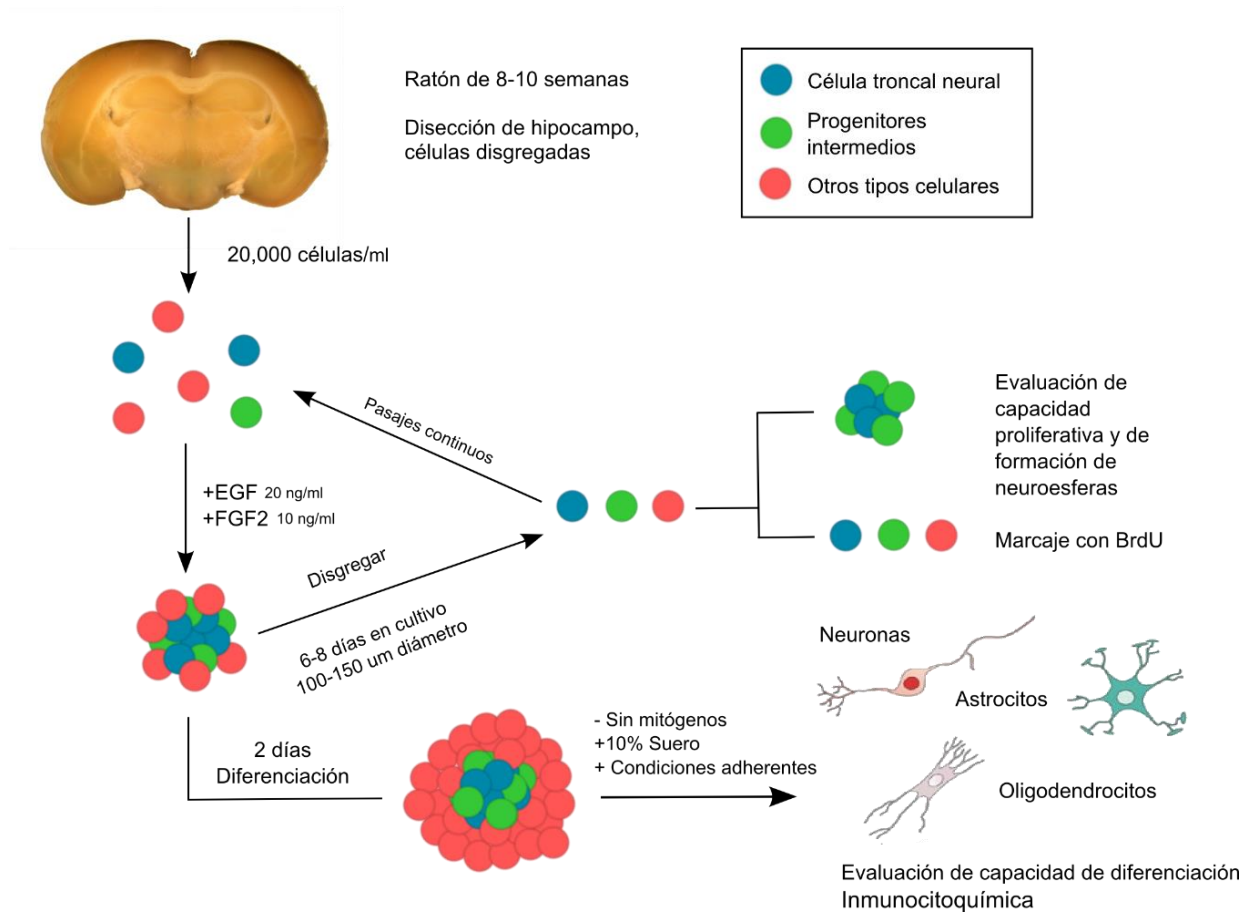


Figura 7. Mapa metodológico

A partir de ratones FF y FF Cre fueron obtenidos precursores neurales, los cuales se cultivaron en presencia de mitógenos (EGF y FGF2). Pasados algunos días en cultivo, neuroesferas con un tamaño de alrededor de 150 µm pueden ser visibles. A partir de éstas, es posible realizar ensayos que permitan evaluar la capacidad de formación de neuroesferas, proliferación y diferenciación de los precursores neurales presentes.

Soluciones y Medios

Medio Completo

- DMEM:F12 (Gibco, 11320)
- Glutamax (Gibco, 35050-061)

[Final]

1X

- PenStrep (Gibco, 15070) 1X
- N2 (Gibco, 17502-048) 1X
- B27 1X

Medio completo con factores de crecimiento (suplementado)

- Medio Completo
- EGF (Sigma, E9644) 20 ng/ml
- FGF2 (Preprotech, 100-18B) 10 ng/ml
- Heparina 0.679U/ml

Medio de Diferenciación

- Medio Completo
- Suero de caballo 10%

Solución de Krebs

- NaCl 119mM
- KCl 2.5mM
- NaH₂PO₄ 1mM
- CaCl₂ 2.5mM
- MgCl₂ 1.3mM
- HEPES 20mM
- D-glucosa 11mM

Protocolo de generación de neuroesferas

Fue utilizado un protocolo modificado de Deleroylle, et al (Deleyrolle & Reynolds 2009), ajustado y estandarizado.

1. Sacrificar ratones de entre 8 y 10 semanas por perfusión cardiaca con 40ml de 0.9% NaCl helado.

2. Extraer el cerebro completo y colocar en solución de Krebs en hielo. Recuperar el hipocampo.

Reducir al mínimo el tiempo que el tejido pasa en contacto con el aire y usar soluciones estériles para evitar contaminación.

3. Colocar en tubos con 20 μ l de solución de Krebs estériles y con tijeras finas cortar el tejido lo más posible.
4. En cultivo, disociar usando 1 ml de Accutase (GIBCO) a 37°, pipeteando con una punta de 1ml hasta que los fragmentos de tejido puedan pasar libremente. Incubar a 37° por 10 minutos.
5. Pipetear por unos segundos hasta que los trozos de tejido pasen libremente por una punta de 10 μ l y hacer pasar por una malla de 40 μ m para eliminar los trozos más grandes. Agregar 1ml de Medio Completo.
6. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos y retirar el sobrenadante. Resuspender en 1ml de Medio Completo con factores de crecimiento.
7. Tomar 10 μ l de las células resuspendidas y juntar con 10 μ l de Azul de Tripiano. Contar las células vivas en cámara de Neubauer.

Habrá muchos restos del tejido y células muertas que no se eliminen por los pasos anteriores. Contar solo las células vivas; después del primer pase casi todos los restos de tejido podrán eliminarse.

8. Sembrar en cajas de cultivo 20000 células/ml de Medio Completo con factores de crecimiento.
9. Cultivar a 37° con 5% CO₂ y humedad del 100%.
10. Después de 3-4 días reemplazar el medio, centrifugando a 1000 rpm para eliminar todos los restos celulares que aún continúan en el medio y separando las neuroesferas en formación. Agregar medio nuevo y continuar en cultivo.
11. Cuando las neuroesferas alcancen un diámetro promedio de 100-150 μ M (días 7-10), disgregar usando Accutase o Tripsina 0.25% a 37° por 10 minutos y pipeteando.

La velocidad a la que crecen las neuroesferas puede ser altamente variable, dependiendo de las condiciones de cultivo y la densidad celular.

Al estandarizar el pasaje y disociación de neuroesferas, vale la pena hacerlo en referencia al diámetro de éstas más que al tiempo que lleven en cultivo.

Tratar de evitar que las células comiencen a adherirse al plato de cultivo.

12. Contar las células y resembrar en las condiciones y densidad deseadas.

En condiciones ideales las neuroesferas pueden resembrarse un número indefinido de veces. En la realidad, los cultivos comienzan a declinar su crecimiento después de un número variable de pases hasta que no pueden ser mantenidos.

Ensayos de crecimiento celular y formación de neuroesferas.

Se partió de cultivos de 10,000 células derivadas de neuroesferas primarias en pozos de 4 cm² (5,000 células/ml; 2,500 células/cm²) en medio suplementado y con EGF y FGF2, para evaluar la capacidad de formación de neuroesferas de células de ratones silvestres y mutantes.

Formación de neuroesferas

Las células fueron cultivadas durante 8 días (con un cambio de medio intermedio en el día 4) en las condiciones descritas. Pasado este periodo, se contó el número total de neuroesferas por pozo y el diámetro, de todas las mayores a 30 µm en por lo menos 5 campos tomados al azar, utilizando el programa BioImageXD (Kankaanpää et al. 2012).

Crecimiento celular

Las células fueron cultivadas en las condiciones de formación de neuroesferas previamente descritas. Después del primer cambio de medio, las células fueron observadas y contadas en 3 campos al azar por pozo (3 pozos por ratón) y separadas dependiendo de su tamaño y características morfológicas. Las células

claramente individuales (I) fueron diferenciadas de las que se encontraban claramente en crecimiento celular o se encontraban ya en proceso de formar neuroesferas (NS, neuroesferas en suspensión.)

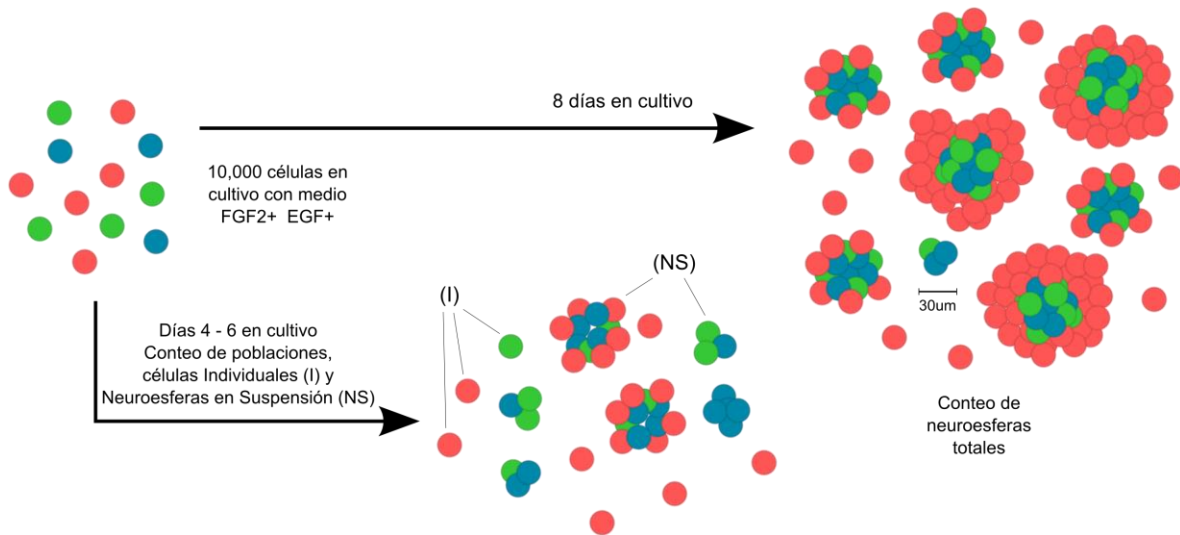


Figura 8. Ensayos de crecimiento celular y formación de neuroesferas.

Progresión de un cultivo primario de neuroesferas hacia ensayos de crecimiento celular y formación de neuroesferas. Categorías de células individuales (I) y neuroesferas en suspensión (NS) visibles antes de contar el número total de neuroesferas en el día 8 de cultivo.

Ensayos de marcaje y seguimiento con BrdU

Fueron utilizados dos protocolos distintos de marcaje de BrdU para evaluar la actividad de dos poblaciones distintas de precursores neurales. Primero, se usó un protocolo de marcaje durante 2 horas en el cuarto día de cultivo, para observar todas las células con actividad mitótica alta durante este periodo. Después, se utilizó un protocolo con 24 horas de marcaje, seguidas de un periodo de

seguimiento de 7 días, con el objetivo de analizar la retención de marca en las poblaciones con actividad mitótica.

Para evaluar la marca de BrdU, se utilizó el kit de marcaje de BrdU (1129673001, Roche) según el protocolo que se describe más adelante. Las células fueron posteriormente fotografiadas mediante microscopía confocal (Microscopio confocal FV10, Olympus) y las imágenes analizadas manualmente utilizando el programa ImageJ (NIH, Schneider et al. 2012).

Protocolo de marcaje BrdU 2hd4

1. Sembrar 10,000 células disgregadas a partir de neuroesferas secundarias en condiciones de proliferación (2500 células/cm²) en medio completo suplementado. Crecer durante 4 días a 37°C y 5% CO₂.
2. En cuarto día de cultivo agregar 10µM de BrdU. Incubar durante 2 horas.
3. Colectar las neuroesferas en suspensión. Centrifugar a 1000 rpm 5 min y aspirar sobrenadante.
4. Lavar el botón de células con 1 ml de PBS estéril y centrifugar a 1000 rpm 5 min. Resuspender en medio de diferenciación.
5. Sembrar las neuroesferas en suspensión sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-ornitina (10mg/ml; ON a 37°) y posteriormente con laminina/fibronectina (15mg/ml; 2 h a 37°C). Quitar cualquier exceso antes de sembrar las neuroesferas.
6. Permitir que las neuroesferas se adhieran a los cubreobjetos en un plazo temporal corto, preferentemente 4-5 h en la incubadora.
7. Lavar con PBS, cuidando de mantener la adherencia de las neuroesferas. Fijar 10 minutos con PFA4%. (PBS y PFA suplementados con 1mM CaCl₂).
8. Lavar con PBS y mantener a 4°C.

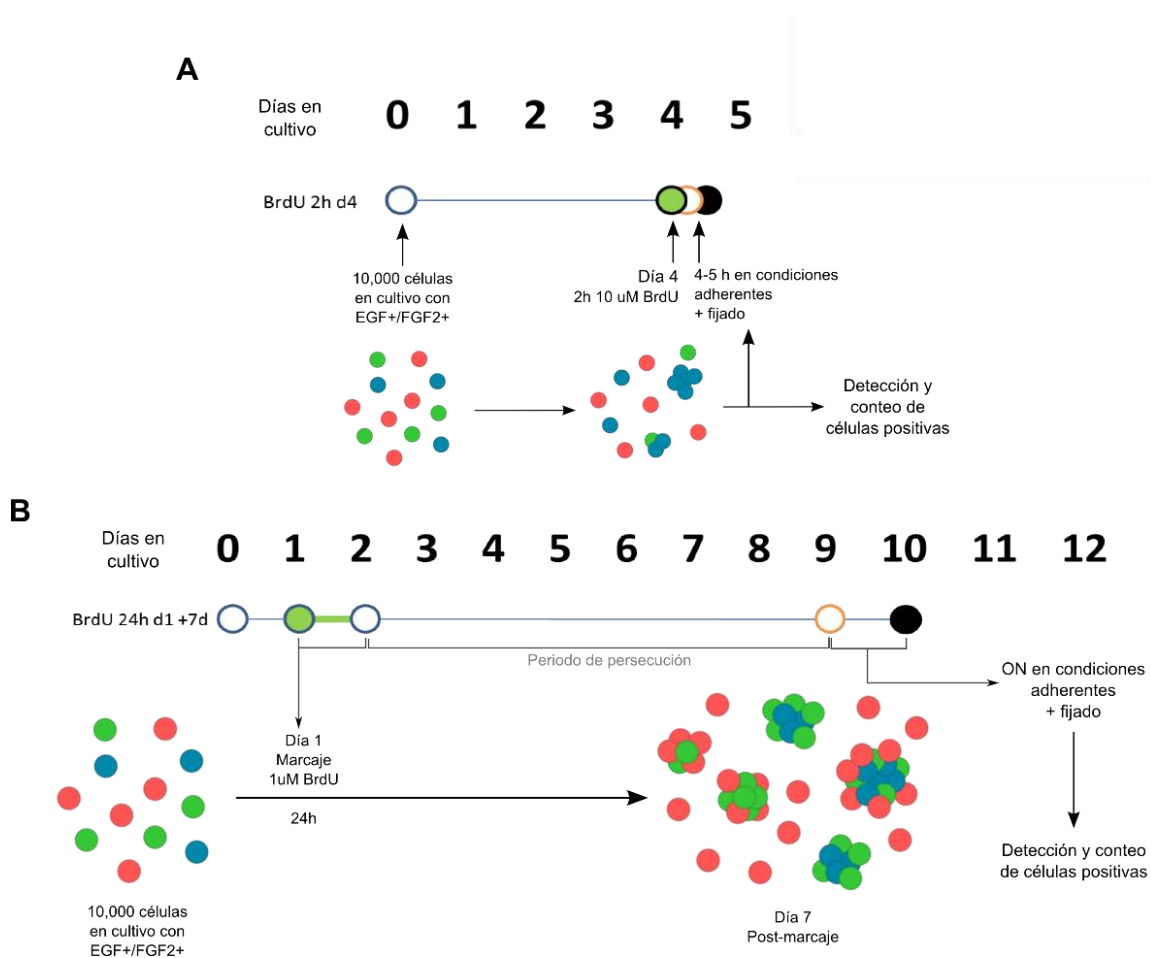


Figura 9. Protocolos de marcaje BrdU.

Esquema temporal de los protocolos de marcaje BrdU **A.** 2h d4 – 2 horas de marcaje con 10 μ M BrdU en el 4 $^{\circ}$ día de cultivo en condiciones mitogénicas.

B. 24h d1 – 24 horas de marcaje con 1 μ M BrdU, más un periodo de persecución de 7 días para permitir la dilución de la marca. Las neuroesferas fueron posteriormente puestas en condiciones adherentes, fijadas y analizadas.

Protocolo de marcaje BrdU 24hd1 + 7d

1. Sembrar 10,000 células disgregadas a partir de neuroesferas secundarias en condiciones de proliferación (2,500 células/cm²) en medio completo suplementado. Crecer a 37°C y 5 % CO₂

2. Pasadas 24 horas, agregar 1 μ M BrdU. Incubar durante 24 h más.
3. Colectar las células sembradas, centrifugar a 1500 rpm 5 min. Lavar con 1 ml PBS y centrifugar de nuevo a 1500 rpm por 5 min. Resuspender en medio completo suplementado fresco.
4. Sustituir medio viejo tras 3-4 días de cultivo.
5. Cumplidos los 7 días de seguimiento posterior al marcaje de 24 h con BrdU, colectar las neuroesferas en suspensión. Centrifugar a 1000 rpm 5 min, lavar con PBS estéril y centrifugar de nuevo a 1000 rpm 5 min. Resuspender en medio de diferenciación.
6. Sembrar las neuroesferas en suspensión sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-ornitina (10mg/ml; ON a 37°) y posteriormente con laminina/fibronectina (15mg/ml; 2 h a 37°C). Quitar cualquier exceso antes de resembrar las neuroesferas.
7. Permitir que las neuroesferas se adhieran a los cubreobjetos ON en la incubadora.
8. Lavar con PBS, cuidando de mantener la adherencia de las neuroesferas. Fijar 10 minutos con PFA4%. (PBS y PFA suplementados con 1mM CaCl₂).
9. Lavar con PBS y mantener a 4°C.

Ensayos de diferenciación

Protocolo de diferenciación

1. Sembrar las células obtenidas a partir de neuroesferas disgregadas en condiciones de proliferación (2500 células/cm²) en medio completo suplementado. Crecer durante 8 días a 37° y 5% CO₂.
2. Recolectar el medio con las neuroesferas en suspensión, centrifugar a 1000 rpm 5 min y lavar con PBS. Centrifugar de nuevo y resuspender en 200 μ l de medio de diferenciación.
3. Sembrar las neuroesferas sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-ornitina (10mg/ml; ON a 37°) y posteriormente con laminina/fibronectina

(15mg/ml; 2 h a 37°C). Tratar de sembrar lo más cercano al centro del cubreobjetos posible.

4. Dejar diferenciando durante 2 días.
5. Fijar con PFA 4% en PBS con 1mM CaCl₂ durante 15 minutos.
6. Identificar las células mediante marcadores de tipo celular e inmunocitoquímica. Contar las células pertenecientes a cada población distinta.

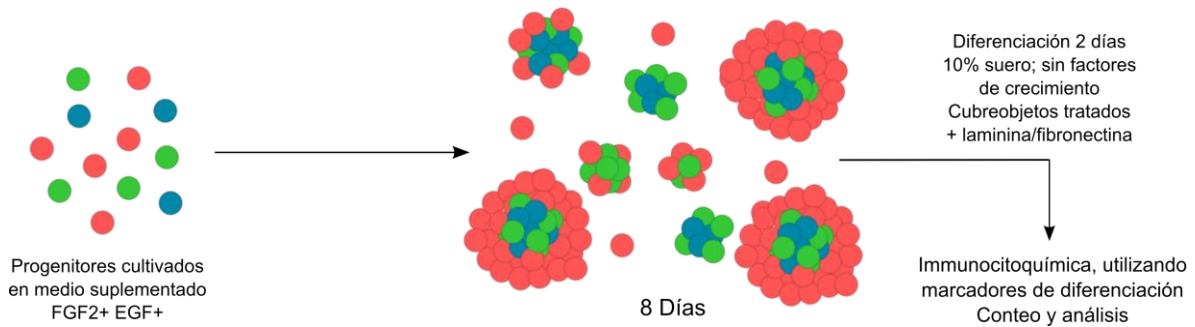


Figura 10. Ensayos de diferenciación.

Las neuroesferas formadas a partir de cultivos en condiciones mitogénicas durante 8 días fueron diferenciadas en condiciones adherentes y adicionadas con suero durante 2 días.

Inmunocitoquímica

Detección de marcaje BrdU

El protocolo utilizado fue modificado de lo descrito en el kit:

1. Fijar células con PFA 4% en PBS con 1 mM CaCl₂ durante 15 minutos. Lavar con PBS.
2. Tratar con HCl 2N durante 30 minutos. Lavar 3 veces con PBS 5 minutos.
3. Bloquear 1 hora con Blocking Reagent 1x (Roche) en 0.1% Tritón en PBS (solución de bloqueo). Lavar con PBS.

4. Incubar con anticuerpo primario (anti-BrdU) en dilución 1:20-1:40 en Incubation Buffer, durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. 3 lavados de 5 minutos con PBS.
5. Incubar 30 minutos a 37°C con anticuerpo secundario (anti-Mouse-FITC) en dilución 1:20 en PBS. 3 lavados de 5 minutos con PBS.
6. Contrateñir núcleos con 1:1000 Hoechst (stock 1 mg/ml, Sigma) en PBS 10 minutos. Lavar.
7. Montar utilizando medio de montaje Vectashield (VECTOR, H-1000).

Protocolo para inmunofluorescencia

1. Fijar células con PFA 4% en PBS con 1 mM CaCl₂ durante 15 minutos. Lavar con PBS.
2. Bloquear 1 hora con Blocking Reagent 1x (Roche) en 0.1% Tritón en PBS. Lavar con PBS.
3. Incubar con anticuerpo primario (concentraciones variables) en solución de bloqueo, ON a 4°C o 2h a 37°C. Lavar 3 veces 5 minutos con PBS.
4. Incubar con anticuerpo secundario 1:500 en solución de bloqueo 1-2 horas a 37°C. Lavar 3 veces 5 minutos con PBS.
5. Contrateñir núcleos con 1:1000 Hoechst (stock 1 mg/ml, Sigma) en PBS. Lavar.
6. Montar utilizando medio de montaje Vectashield (VECTOR, H-1000).

Anticuerpos y diluciones

Primarios:

Anti- GFAP: Conejo, Policlonal (SAB4300647, Sigma). Dilución 1:1000.

Anti- β -III Tubulina (Tuj1): Ratón, Monoclonal (MAB1195, R&D). Dilución 1:400

Anti- BrdU: Ratón (Kit 1129673001, Roche). Dilución 1:20-1:40

Secundarios (todos usados a dilución 1:500):

Alexa Fluor 594. Chicken anti-rabbit (A214442, Life Technologies)

Alexa Fluor 568. Goat anti-mouse (A11031, Invitrogen)

Alexa Fluor 488. Chicken anti-rabbit (A21441, Invitrogen)

Alexa Fluor 488. Goat anti-rabbit (A11034, Life Technologies)

Alexa Fluor 488. Chicken anti-mouse (A21200, Invitrogen)

Anti-mouse Fluorescein (Kit 1129673001, Roche). Dilución 1:20-1:40

7. RESULTADOS

7.1 La ausencia de LPP3 provoca deficiencias en la capacidad de formación de neuroesferas

Mediante los ensayos de crecimiento celular y de formación de neuroesferas se buscó evaluar indirectamente la capacidad proliferativa de los precursores neurales derivados del hipocampo adulto. Para ello, en ambos casos fueron cultivadas células obtenidas a partir de ratones carentes de LPP3 (FF Cre; $\Delta f/\Delta f$ en SNC) y silvestres (FF, controles), en condiciones mitogénicas y a una densidad celular semiclinal que favoreciera la formación de neuroesferas sobre la coalescencia celular.

Para los ensayos de formación de neuroesferas, las células permanecieron 8 días en cultivo y las esferas resultantes fueron contadas y medidas. Desde el inicio de estos ensayos, fueron evidentes diferencias en la morfología de las neuroesferas en formación: la ausencia de LPP3 parecía provocar la formación de esferas más pequeñas, con bordes irregulares y menos numerosas (**Figura 11**).

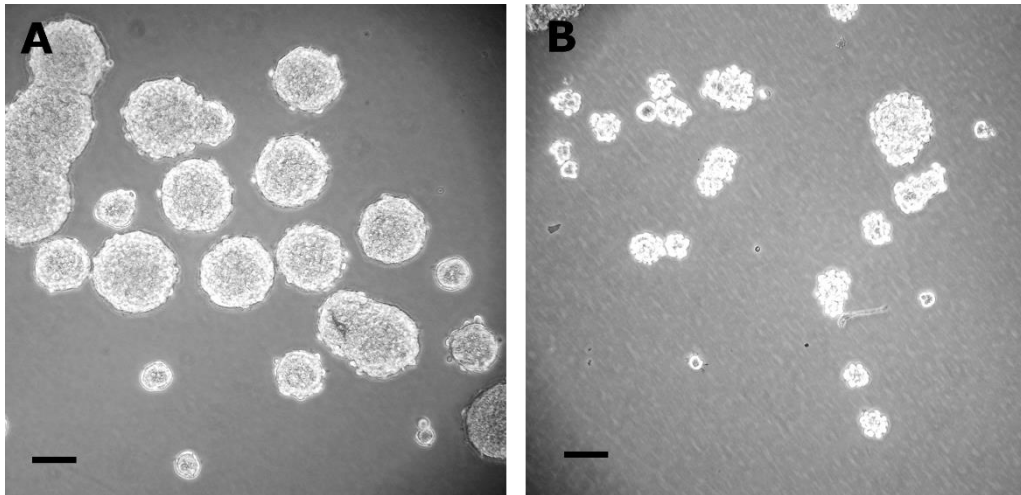


Figura 11. Las neuroesferas de ratones FF Cre son menos y de menor tamaño.

Imagen representativa de neuroesferas derivadas de ratones FF **(A)** y FF Cre **(B)** después de 8 días en cultivo, con visibles diferencias en el tamaño y morfología. Barra de escala = 100 μ m.

Terminado el tiempo de crecimiento en cultivo las neuroesferas fueron contadas en su totalidad. Fue observada una importante diferencia en el número total de neuroesferas formadas, siendo éste significativamente menor en aquellas derivadas de ratones FF Cre – alrededor de un 30% con respecto a sus contrapartes FF. Además de producir una menor cantidad de neuroesferas, en los ratones FF Cre éstas fueron considerablemente más pequeñas que sus contrapartes silvestres – cerca de un 50% de reducción en el diámetro promedio, de más de 100 μ m en FF contra cerca de 50 μ m en FF Cre **(Figura 12)**.

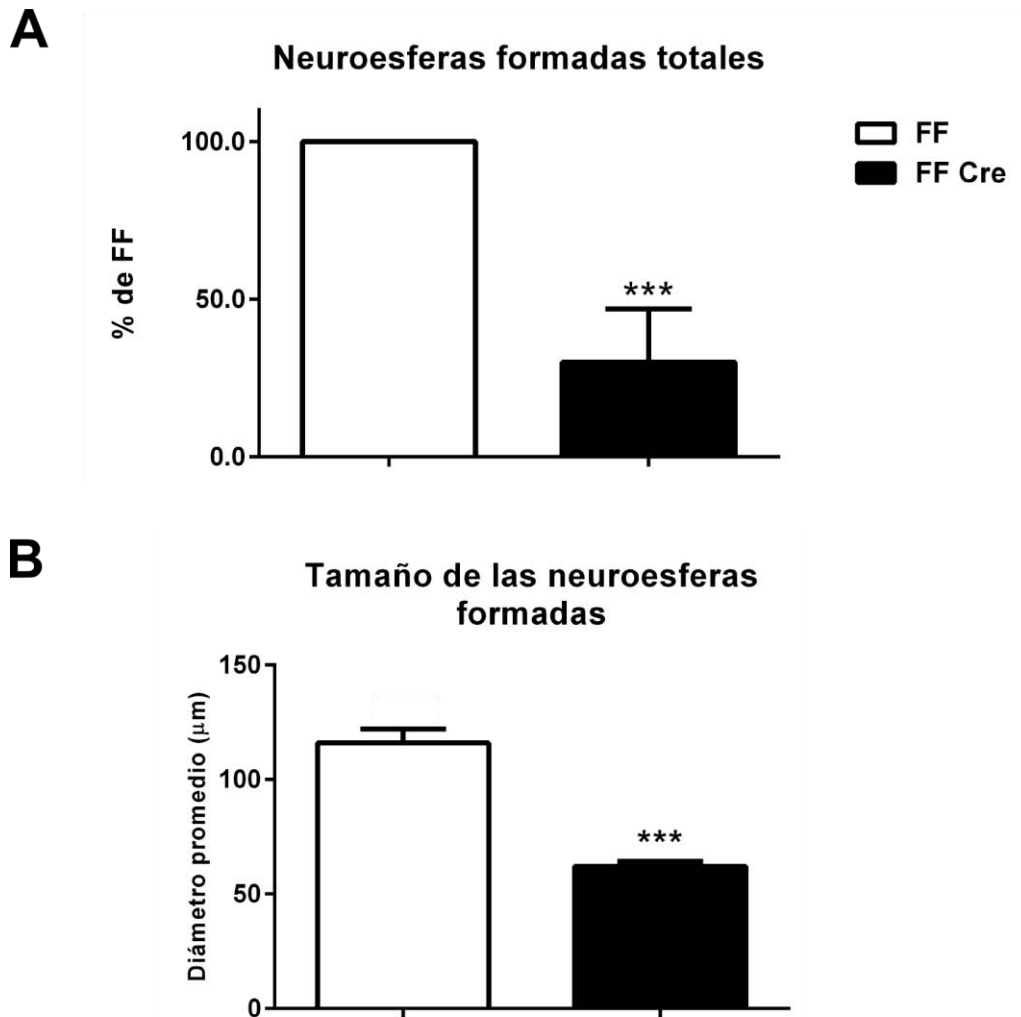


Figura 12. Existe una disminución significativa en el número total y el tamaño de neuroesferas formadas en células sin LPP3.

(A) Porcentaje con respecto al FF de neuroesferas formadas a partir de un cultivo de 10,000 células a densidad semiclinal después de 8 días. **(B)** Tamaño promedio de las neuroesferas con diámetro mayor a 30 μm en las mismas condiciones de cultivo. Graficado: media + SEM; *** = $P < 0.001$. $n = 5$ para A; $n = 3$ para B.

Los experimentos anteriores muestran una significativa disminución en la capacidad de formación de neuroesferas, tanto en el número como en el tamaño de las mismas, como consecuencia de la ausencia de LPP3.

Generalmente el ensayo de formación de neuroesferas se utiliza como una medida de la capacidad proliferativa de una población de precursores neurales, así como de la composición de éstos, pero esta relación no es necesariamente directa y puede estar afectada por otros factores como la densidad y supervivencia celular.

Para los ensayos de crecimiento, al separar las células en categorías – células Individuales y Neuroesferas en Suspensión – y contar cada población, se buscó determinar si la ausencia de LPP3 en los precursores neurales en cultivo afecta su capacidad de formar neuroesferas y si ésta se modifica con el paso del tiempo (**Figura 13**).

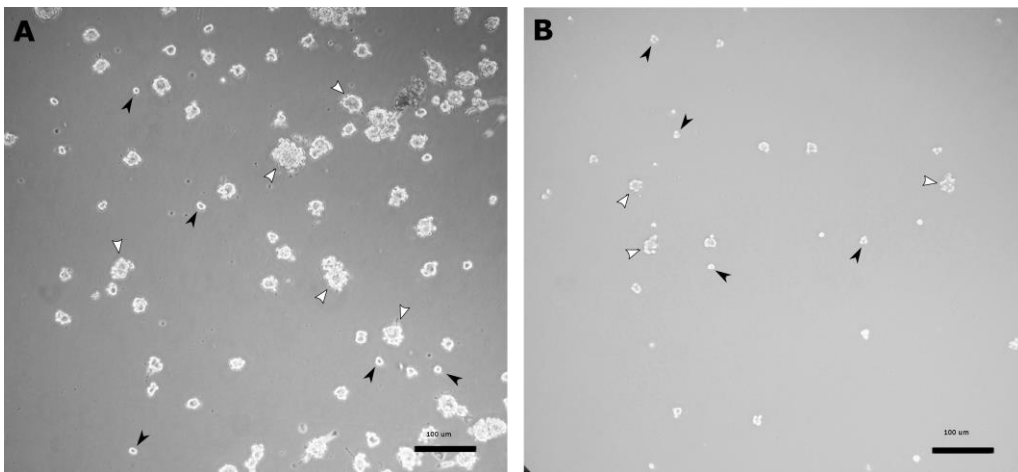


Figura 13. Cultivos de neuroesferas en crecimiento.

Cultivos de neuroesferas en el día 4. Imágenes representativas de cultivos derivados de un ratón FF (**A**) y FF Cre (**B**) donde se muestran las categorías usadas: células Individuales (flechas negras) y Neuroesferas en Suspensión (flechas blancas). Barra de escala = 100 µm.

Durante los días observados, las células derivadas de ratones FF Cre tendían a permanecer como células individuales durante un tiempo más prolongado que aquellas provenientes de ratones FF. Lo anterior parece mantenerse hasta el día 8 en cultivo (cuando las neuroesferas se encuentran totalmente formadas), sugiriendo una subpoblación de células que no responden al estímulo de los mitógenos y que, por lo tanto, son incapaces de formar neuroesferas aún con tiempos más extensos en cultivo (**Figura 14**).

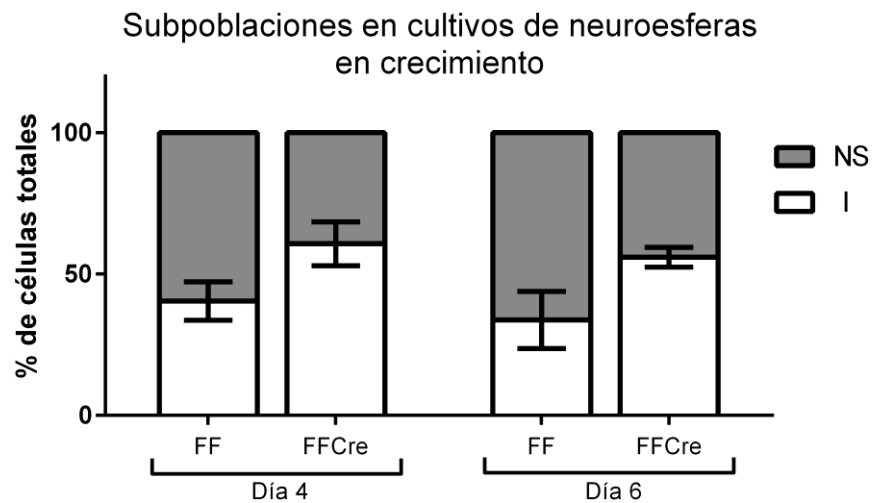


Figura 14. Las células mutantes en crecimiento permanecen individuales
Una mayor proporción de células se mantienen individuales (I), es decir, sin formar neuroesferas (NS), en los días 4 y 6 de cultivo. Graficado: media \pm SEM. n=5.

Tomando en cuenta todo lo anterior, es posible afirmar que la ausencia de LPP3 en células derivadas de hipocampo adulto tiene un efecto sobre su capacidad de formación de neuroesferas, resultando en la formación de menos neuroesferas y de menor tamaño. Esto puede estar causado por una subpoblación menos numerosa de células responsivas a EGF y/o FGF2, las cuales permanecen sin actividad proliferativa a pesar de la señalización de los mitógenos y que, por lo

tanto, son incapaces de formar esferas. Por otro lado, una disminuida capacidad proliferativa de los precursores neurales así como una incrementada muerte celular de los mismos, podría estar contribuyendo a los efectos de la mutación observados.

7.2 Sin LPP3 los cultivos de neuroesferas tienen una menor proliferación celular

Para saber si la disminución en la capacidad de formación de neuroesferas es consecuencia de una alteración en la proliferación celular fue necesario utilizar un método directo de marcaje de células con actividad mitótica. Con este objetivo en mente, se utilizó un protocolo de marcaje de BrdU en el cual se marca durante un periodo corto (2 horas) a la población de células mitóticamente activas durante el periodo de mayor crecimiento de neuroesferas (día 4 de cultivo). La población de células positivas para la marca de BrdU correspondería a progenitores neurales amplificativos putativos, con una alta tasa proliferativa (**Figura 15**).

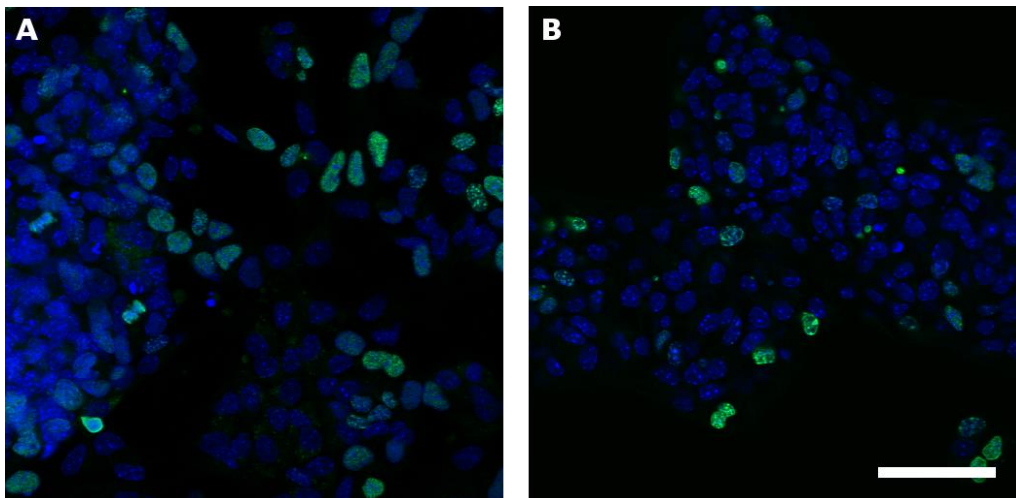


Figura 15. Células con marcaje positivo de BrdU en el día 4.

Células BrdU⁺ en los cultivos de neuroesferas marcados durante 2 horas en el cuarto día de cultivo. Comparación de células FF (**A**) y FF Cre (**B**). Barra de escala =: 50µm.

Al cuantificar las células positivas con este protocolo de marcaje de BrdU, se observó un porcentaje alrededor de 34% de células BrdU⁺ en neuroesferas FF, contra cerca de un 23% en el caso de neuroesferas FF Cre – una disminución de cerca del 35% en el número de células mitóticamente activas (**Figura 16**). Este resultado es consistente con los datos obtenidos de los ensayos de formación de neuroesferas, apoyando la idea de que la reducción en el número y tamaño de la neuroesferas en cultivos FF Cre es provocada al menos parcialmente por una disminución en la proliferación celular.

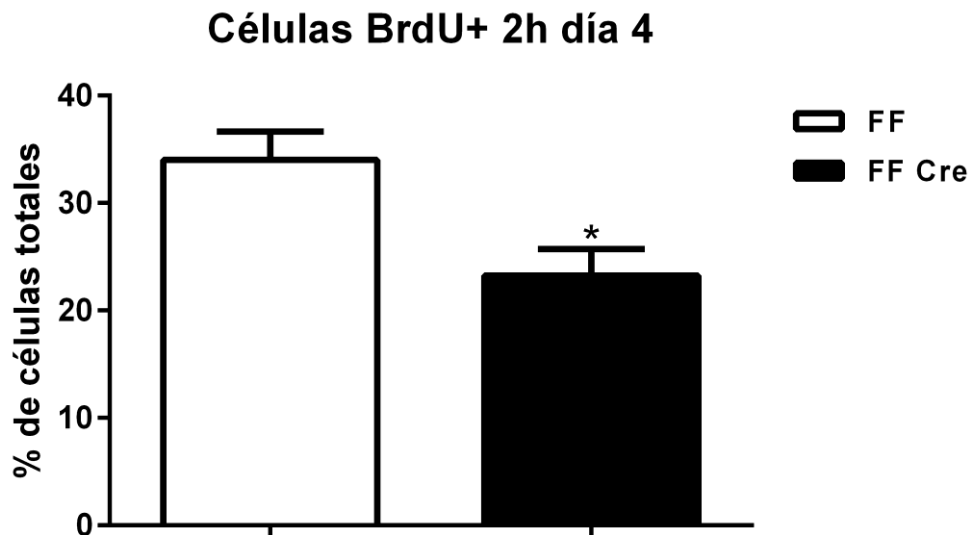


Figura 16. La ausencia de LPP3 disminuye el número de células en proliferación.

Porcentaje de células positivas para el marcaje de BrdU durante el día 4 en cultivo, indicativo de una menor proliferación celular en este periodo. Graficado: media + SEM. * P<0.05. n=4 para FF; n=3 para FF Cre.

Aunque el efecto es significativo, es menos dramático que la diferencia observada en la capacidad de formación de neuroesferas, lo cual apunta a la existencia de otros procesos celulares que pueden estar afectándola.

7.3 Las células carentes de LPP3 tienen una mayor retención del marcaje de BrdU

Para saber qué sucede con las células que se encuentran mitóticamente activas durante los primeros días en cultivo, se utilizó otro protocolo de marcaje de BrdU, esta vez las células fueron marcadas durante 24 horas en el primer día de cultivo, seguido de 7 días de cultivo en los cuales las células continuaban proliferando y la marca existente diluyéndose con cada división celular. Este tipo de ensayos de pulso-persecución pueden darnos información acerca de cómo y cuánto se están dividiendo las células capaces de proliferar al comienzo del cultivo en condiciones de proliferación.

Es bien conocido que el marcaje con BrdU produce alteraciones en la capacidad de proliferación y diferenciación en células en cultivo, de una forma dosis-dependiente. Para evitar que esos efectos secundarios del marcaje afectaran la proliferación de las neuroesferas en crecimiento se utilizó una concentración menor (de 1 μM) que la usada en los ensayos de marcaje corto y sin persecución. De esta forma, pasados los 7 días de persecución, aún es posible observar una proporción considerable de células que siguen siendo positivas para el marcaje de BrdU (cerca del 5% del total de células; **Figura 17**). Esta población no parece ser significativamente diferente entre células derivadas de ratones FF y FF Cre (**Figura 18A**).

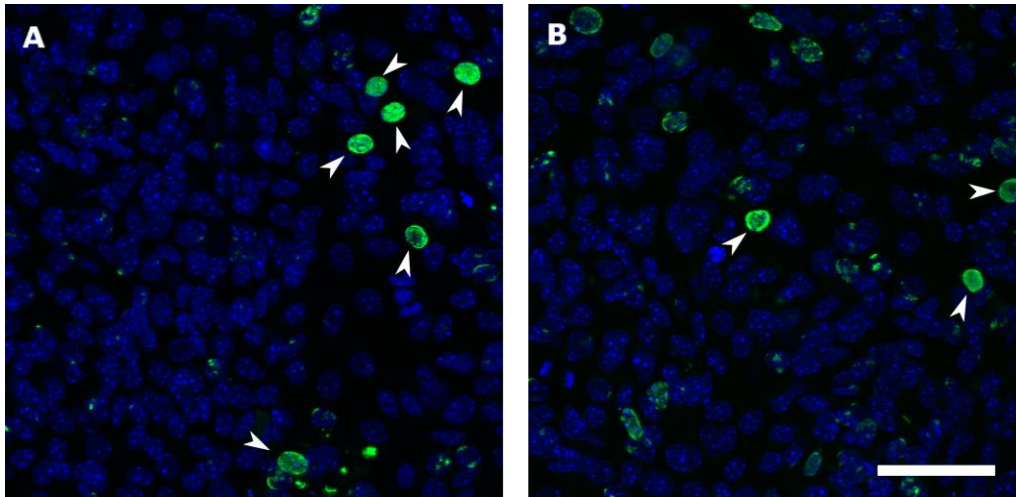


Figura 17. Células positivas para BrdU y células retenedoras de marca.

Tras el marcaje de 24 horas y el periodo de persecución de 7 días, una población pequeña de células conserva algo de la marca de BrdU. Comparación entre células derivadas de un ratón FF **(A)** y FF Cre **(B)** mostrando las células BrdU⁺ y las LRCs (flechas blancas). Barra de escala =: 50µm.

Aunque aparentemente no existe diferencia significativa entre ratones FF y FF Cre en los números de las células BrdU⁺ totales, esta población es heterogénea en la intensidad de su marcaje, lo cual indica distintos comportamientos proliferativos posteriores al periodo de marcaje – si una célula pasa por muchos ciclos de división su marca se diluye, si la célula abandona el ciclo ésta permanecerá prácticamente intacta. Basado en lo anterior, fueron contadas las células que retuvieron intacto su marcaje (células retenedoras de marca, LRCs) de BrdU pasados los 7 días de persecución (flechas en **Figura 17**) y contrastado con el número total de células BrdU⁺.

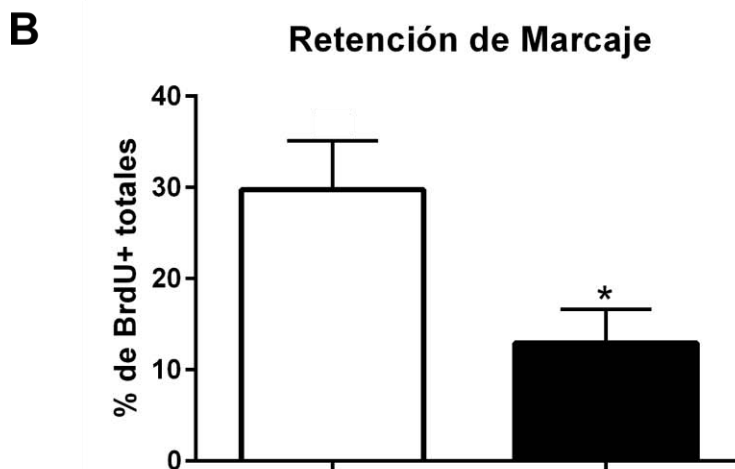
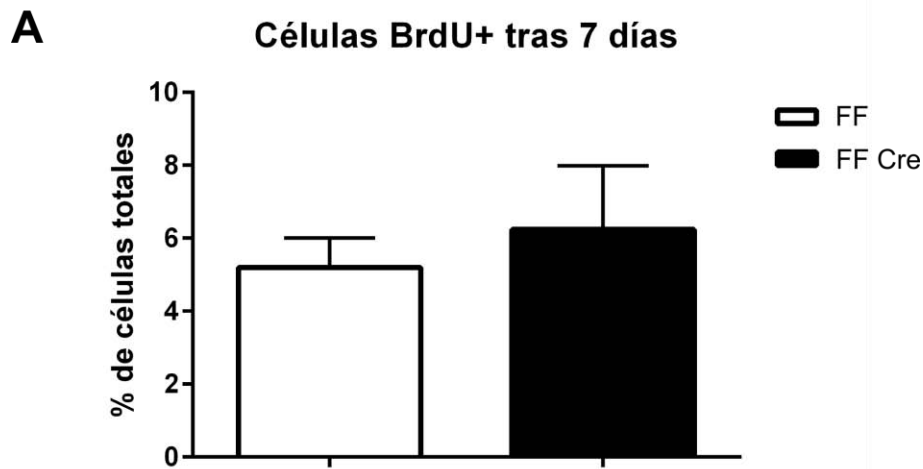


Figura 18. Las células FF Cre retienen menos el marcaje de BrdU.

A pesar de que no existe diferencia significativa en el número de células BrdU+ tras 7 días (A), la proporción de células retenedoras de marcaje disminuye como consecuencia de la ausencia de LPP3 (B). Graficado: media + SEM. * = $P < 0.05$. n=3.

En células derivadas de cerebros FF Cre se observó una proporción significativamente menor de LRCs que en las de FF, con casi el doble de células en esta categoría (**Figura 18B**). Lo anterior puede ser consecuencia de un cambio en el comportamiento proliferativo de los precursores neurales como consecuencia de la ausencia de LPP3, que provoca que algunas células se mantengan dentro

de ciclo celular después de un número mayor de divisiones reduciendo la cantidad de células que salen de ciclo – la retención de marca es indicativa de la salida del ciclo celular inmediatamente posterior al periodo de marca.

Aunque sabemos que la proliferación en general se ve disminuida durante el periodo de crecimiento de neuroesferas, la menor retención de marcaje de BrdU en células FF Cre podría apuntar a una mayor actividad mitótica en una subpoblación específica de células, aún no identificada.

7.4 La diferenciación al linaje neuronal se ve favorecida en ausencia de LPP3.

Otro de los procesos celulares que es altamente regulado mediante la señalización por lípidos es la diferenciación celular. Se sabe que alteraciones en los niveles de lípidos bioactivos tienen efectos sobre la decisión de linaje y la

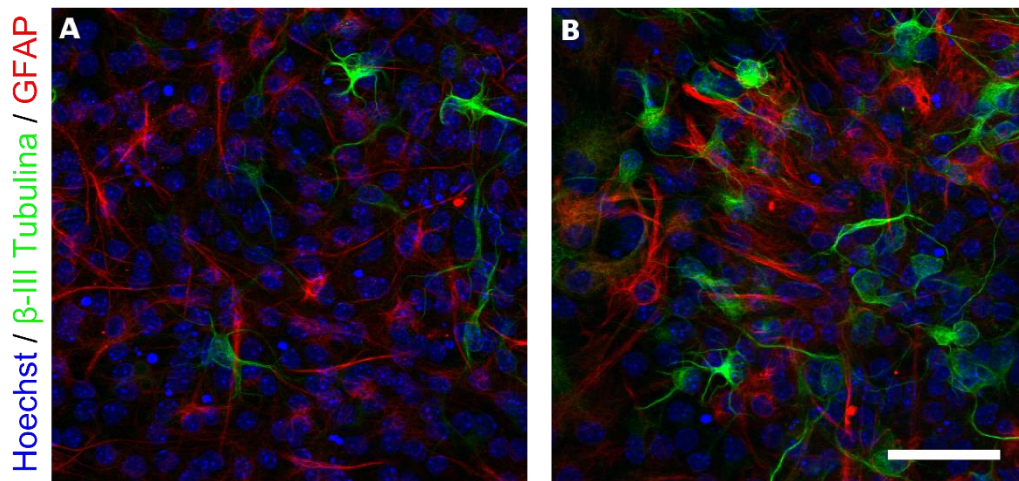


Figura 19. Diferenciación hacia linajes neuronal y glial.

Imagen representativa de los ensayos de diferenciación, mostrando una menor proporción de células β -III Tubulina⁺ en células FF (A) con respecto a FF Cre (B). Barra de escala = 50 μ m.

proliferación o supervivencia de precursores multipotentes específicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tomando en cuenta lo anterior, se llevaron a cabo ensayos de diferenciación con el fin de determinar si la falta de LPP3 tiene algún efecto sobre los tipos celulares generados a partir de precursores neurales – especialmente neuronas.

Para reducir el porcentaje de células que morían durante los cultivos de diferenciación se redujo el tiempo en cultivo a 2 días, suficientes para observar el número de células que se diferenciaron a linaje neuronal (mediante el marcador de neuronas jóvenes β -III Tubulina) y aquellas pertenecientes al linaje astrogial o células troncales (con el marcador de astroglia GFAP; **Figura 19**).

Aunque la ausencia de mitógenos y la presencia de una matriz adherente (laminina/fibronectina) son suficientes para promover la diferenciación celular en cultivos de neuroesferas, se utilizó suero de caballo para favorecer el proceso en

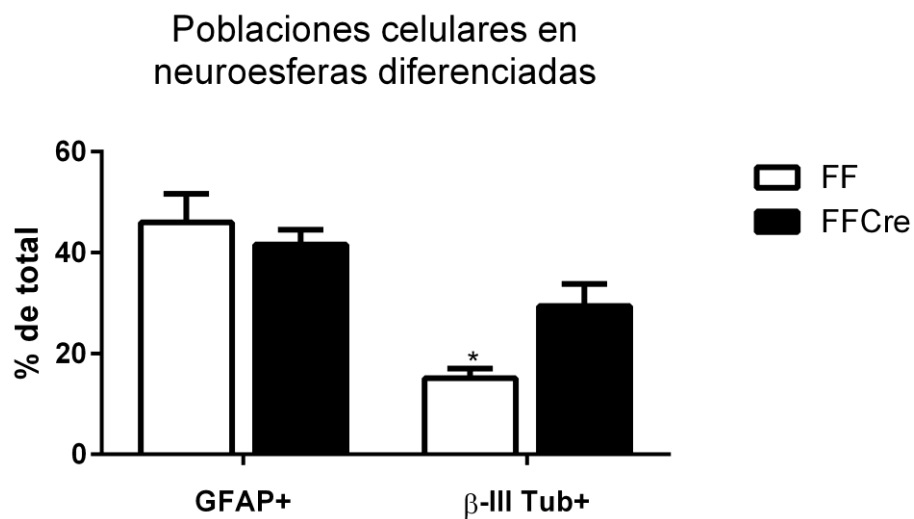


Figura 20. La falta de LPP3 favorece la diferenciación hacia el linaje neuronal

Aunque no hay una diferencia significativa en la proporción de células GFAP⁺, la ausencia de LPP3 provocó un aumento en el número de células β -III Tubulina⁺ de linaje neuronal. Graficado: media + SEM. * =P<0.05. n=3 para FF; n=4 para FF Cre.

un tiempo más corto. Las neuroesferas completas fueron diferenciadas sin disociar para conservar los contactos intercelulares y favorecer la supervivencia de las células en diferenciación.

Al contar la población de células β -III Tubulina⁺ se observó un aumento en la proporción de células de linaje neuronal en neuroesferas carentes de LPP3,

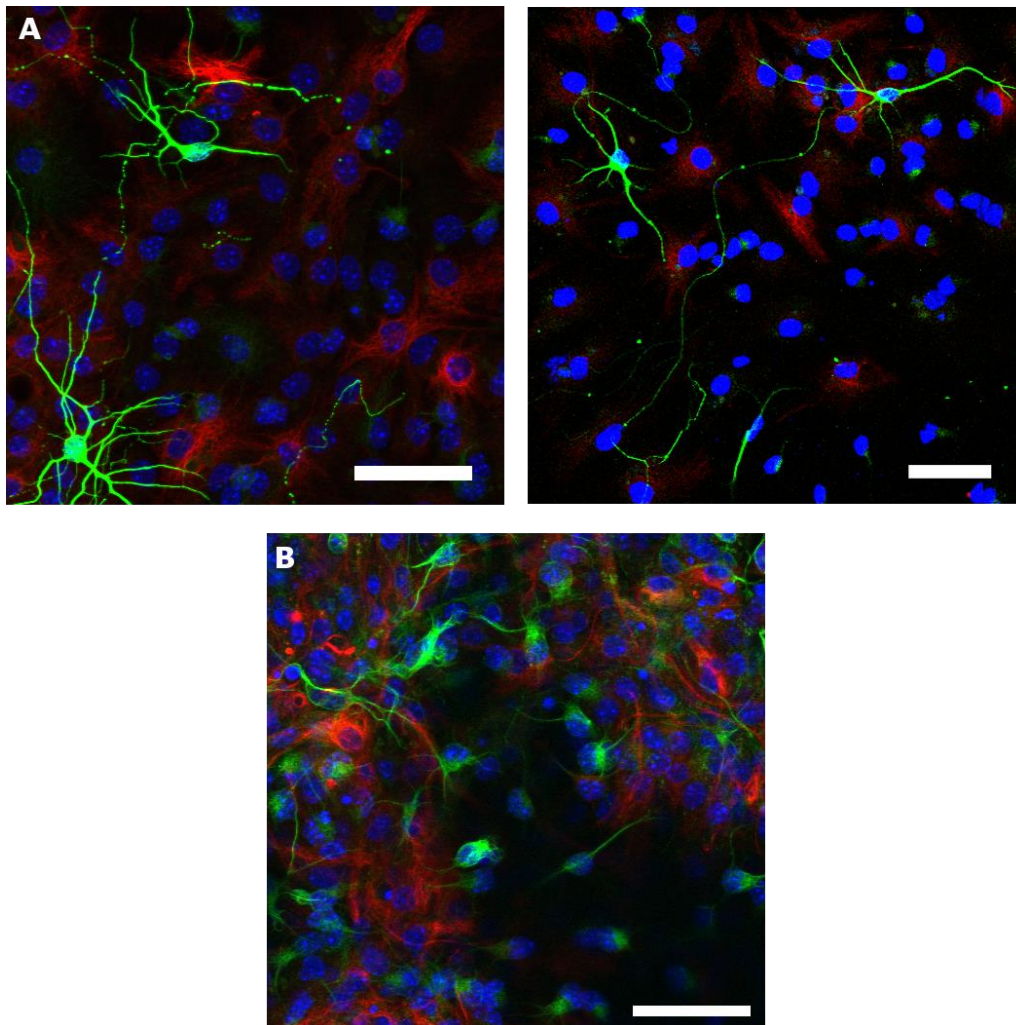


Figura 21. Morfología granular de algunas neuronas FF.

Una fracción de las neuronas diferenciadas a partir de neuroesferas FF (A) adquiere morfología similar a la de células granulares en cultivo, con un gran número de proyecciones de mayor longitud, algo no observado en cultivos FF Cre (B). Mismos marcadores que en **Figura 19**; barra de escala = 50 μ m.

mientras que las células GFAP⁺ no mostraron diferencias significativas con respecto a las obtenidas de ratones FF (**Figura 20**). Lo anterior puede ser indicador de un cambio en la señalización de determinación de linaje, o de una alteración en la actividad y capacidad proliferativas de una población de progenitores neuronales en ausencia de LPP3.

También, se observaron alteraciones morfológicas en algunas neuronas generadas a partir de neuroesferas FF Cre, particularmente en el número y longitud de las proyecciones extendidas (**Figura 21**). Mientras que varias de las neuronas diferenciadas en neuroesferas FF adoptaron una morfología similar a la de una neurona granular con largas y numerosas proyecciones, muchas de las neuronas FF Cre mostraron extensiones más cortas y, en general, menos numerosas.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó el cultivo de neuroesferas para evaluar *in vitro* los efectos que la ausencia de la LPP3 – un importante modulador de la señalización por lípidos – tiene sobre procesos celulares clave, como la proliferación y diferenciación. A pesar de su versatilidad, el cultivo de neuroesferas tiene limitaciones y, como es el caso con todo tipo de cultivo *in vitro*, los resultados no necesariamente reflejan lo que ocurre *in vivo*.

Los resultados de este trabajo nos llevan a creer que LPP3 desempeña una función relevante durante el proceso de neurogénesis en el hipocampo adulto, con repercusiones en la proliferación y diferenciación de precursores neurales, sin estar limitado necesariamente a estos procesos.

Aquí se describe un efecto significativo sobre la capacidad de formación de neuroesferas, en cuanto al número y tamaño de éstas, cuando LPP3 no está presente. A partir de este resultado, se puede suponer que la falta de LPP3 en las células mutantes disminuye la capacidad de proliferar de las células troncales neurales y progenitores presentes en el hipocampo adulto, lo cual está respaldado por los experimentos de incorporación de BrdU empleando un pulso corto.

Aunque generalmente el ensayo de formación de neuroesferas se considera un indicador de la capacidad proliferativa de una población de precursores neurales responsivos a EGF, existe debate acerca de la veracidad de la información que estos ensayos proporcionan (Bull & Bartlett 2005; Singec et al. 2006). Factores como el enriquecimiento de NSCs en la población original pueden tener efectos sobre el número y tamaño de las neuroesferas generadas – las NSCs se consideran células con un mayor potencial proliferativo y son capaces de formar neuroesferas de mayor tamaño sin agotar su capacidad proliferativa (Ahmed 2009).

Dado que el efecto sobre la proliferación no es tan grande como lo haría pensar la diferencia en capacidad de formación de neuroesferas, tiene sentido pensar que hay otros factores afectándola. La presencia de una mayor proporción de precursores responsivos a EGF en la población original aislada del hipocampo podría acentuar la diferencia observada en proliferación. Esta posibilidad podría estar respaldada por lo observado en los ensayos de crecimiento celular, donde en cultivos de células carentes de LPP3 se observó una proporción menor de células formadoras de neuroesferas.

Otro de los procesos que se ha visto afectado por la mutación de LPP3 en distintos contextos celulares es la supervivencia celular. Existe evidencia de la participación de la LPP3 en la regulación de la supervivencia celular y se ha descrito que su ausencia causa un aumento en la muerte celular por apoptosis, algo observado tanto *in vivo* como *in vitro*, en el SNC y estados embrionarios (López-Juárez 2011; Sánchez-Sánchez et al. 2012).

Es posible que algunos de los efectos observados en este trabajo estén influenciados por alteraciones en la supervivencia de subpoblaciones en cultivo, como la disminución en la capacidad de formación de neuroesferas y la diferencia en retención de marcaje de BrdU. Este aspecto es clave para completar el panorama de regulación de LPP3 en la neurogénesis hipocampal y su evaluación en este contexto debe ser el siguiente paso a tomar dentro del proyecto.

Además de los ensayos de incorporación de BrdU para medir proliferación celular, se utilizó un protocolo de marcaje de pulso-persecución para analizar la población de células que retienen la marca de BrdU. Usando un periodo más largo de marcaje (24 horas) se logra un marcaje intenso de todas las células mitóticamente activas durante este periodo – que en este tipo de cultivos debe ser la gran mayoría. Al dar un periodo de persecución de 7 días, las células que continúen en proliferación, con una alta tasa mitótica, comenzarán a diluir su marca con cada ciclo de división. Por lo tanto, sólo aquellas células que salgan de ciclo celular inmediatamente después del periodo de marcaje conservarán su marca intacta.

La disminución en la proporción de LRCs en las células carentes de LPP3 es un indicio de la existencia de una población de células que continúa con actividad mitótica (al punto de diluir su marca) mientras que las células silvestres salen de ciclo celular. Esto puede estar reflejando un defecto en la capacidad de autorrenovación de NSCs o de progenitores neurales, pero para poder explorar esta posibilidad será necesario el uso de marcadores moleculares específicos para identificar el tipo celular de las LRCs.

Por otro lado, el favorecimiento de la diferenciación hacia linaje neural como consecuencia de la mutación de LPP3 fue un resultado inesperado, cuyo origen es difícil de determinar. Existe la posibilidad de que LPP3 esté regulando la determinación de linaje neuronal y su ausencia provoque el favorecimiento de la diferenciación hacia neuronas.

Otra posibilidad es la existencia de una población de progenitores neuronales que en ausencia de la regulación dependiente de LPP3 aumente su actividad proliferativa o que aumente preferencialmente la sobrevivencia de neuronas, dando lugar a un mayor número de neuronas. Lo anterior podría estar respaldado por la existencia de un menor número de LRCs en cultivos de células mutantes.

Todos los posibles mecanismos mencionados podrían ser dependientes de su actividad catalítica, debido a las funciones altamente pleiotrópicas de sus moléculas blanco, principalmente S1P y LPA. Dada la alta variabilidad de las

respuestas que inician dependiendo del contexto celular específico en el que se encuentren, determinar el mecanismo exacto de acción representa un reto.

Conociendo su patrón de expresión en células troncales neurales y progenitores, así como la evidencia *in vivo* de sus papeles, la señalización por medio de los receptores S1P₁, LPA₁ o LPA₂ parecen ser los principales candidatos para explicar las vías intermediarias en la señalización dependiente de LPP3 en la neurogénesis hipocampal adulta (Fukushima et al. 2007; Svetlov & Ignatova 2004).

Además de la actividad catalítica de LPP3, los efectos independientes de su actividad de fosfatasa agregan un grado más de complejidad a la generación de un modelo que explique lo observado. Se sabe que la ausencia de LPP3 aumenta significativamente la señalización de Wnt por medio de su vía canónica, posiblemente debido a la estabilización de β -catenina tras la unión de LPP3 (Humtsoe et al. 2010; Escalante-Alcalde et al. 2003). Esto resulta interesante dado que Wnt es uno de las vías de señalización más importantes en la regulación del proceso de neurogénesis adulta en la SGZ y SVZ; la señalización por medio de Wnt ha sido relacionada con la diferenciación hacia linaje neuronal, proliferación de precursores neurales y proliferación y autorrenovación de NSCs (Varela-Nallar & Inestrosa 2013).

Específicamente, la activación de la vía canónica de Wnt por medio de Wnt3 ha sido descrita como un importante regulador de la neurogénesis hipocampal, provocando un aumento selectivo en la proliferación de progenitores neuronales y neuroblastos, sin tener un efecto global sobre la proliferación (Lie et al. 2005).

Aunque se observaron diferencias morfológicas entre algunas de las neuronas provenientes de neuroesferas silvestres y mutantes, particularmente en el número y longitud de sus extensiones, la evidencia no es completamente clara. Pero la observación es interesante, ya que se ha asociado al LPA y a las S1P con la retracción axonal y formación de proyecciones en algunos tipos de neuronas, debido a su actividad como quimiorrepulsor (Yamane et al. 2010; Herr & Chun 2007; Spohr et al. 2012; Spohr et al. 2008). Además, la mutación nula del receptor

LPA₁ provoca defectos en la morfología de las neuronas generadas en el hipocampo adulto (Matas-Rico et al. 2008).

También, paralelamente a este proyecto, se buscó evaluar los mismos procesos desde un enfoque *in vivo* y los resultados que ambos han arrojado nos han acercado más a entender el papel de la LPP3 en la neurogénesis adulta en el hipocampo.

Estos estudios *in vivo* han mostrado una disminución en la proliferación de progenitores neurales, similar a la observada *in vitro*. También, se ha podido identificar a una población de posibles NSCs y astrocitos en la SGZ que expresan intensamente LPP3. En contraste con lo observado *in vitro*, la mutación de LPP3 parece afectar la neurogénesis en el DG, como lo ha evidenciado la disminución en el número de neuroblastos generados.

Aunque los trabajos desde ambos enfoques nos han ayudado a entender el papel que la LPP3 juega durante el proceso neurogénico en el hipocampo adulto, lo que ocurre *in vivo* no es necesariamente un reflejo de lo que sucede *in vivo*. Particularmente en el proceso neurogénico, donde la arquitectura y organización del nicho tienen una gran participación en su regulación, los experimentos realizados sobre modelos *in vivo* ofrecen una aproximación que nos permita analizar procesos específicos, pero la participación del ambiente celular puede arrojar resultados distintos.

9. CONCLUSIONES

- La ausencia de LPP3 en el tejido neural provoca una deficiencia en la capacidad de generación de neuroesferas en células derivadas del hipocampo adulto. Las neuroesferas resultantes de ratones mutantes son menos numerosas y de un tamaño menor.

- Lo anterior está causado en parte por una disminución en la capacidad proliferativa de los precursores neurales formadores de neuroesferas, medida por la incorporación de BrdU. Es posible también que haya una menor cantidad de progenitores proliferativos en el hipocampo mutante.
- Existe una población menor de células retenedoras de marcaje en cultivos carentes de LPP3 durante los ensayos de retención de BrdU con un periodo de dilución. Esto es un indicador de actividad mitótica durante un número mayor de ciclos en células mutantes.
- La falta de LPP3 favorece la diferenciación de progenitores neurales hacia el linaje neuronal, por medio de un mecanismo aún desconocido. Algunas de las neuronas generadas presentan también alteraciones morfológicas.

10. PERSPECTIVAS

Este trabajo forma parte de un proyecto más grande que busca entender el papel de la LPP3 en la neurogénesis adulta. Para tener un panorama amplio y más completo acerca de lo que esta enzima realiza en este complejo proceso, es necesario abordar el proyecto desde varios enfoques.

Para llevar a término el resto de esta sección del proyecto es necesario abordar los procesos que se cree pueden estar regulados por la actividad de la LPP3. En este caso, el de mayor importancia es la supervivencia celular. Realizar ensayos de muerte celular sobre las células silvestres y mutantes en cultivo de neuroesferas nos dará una buena idea de la contribución de este proceso en la deficiencia en la generación de neuroesferas.

La capacidad de autorrenovación es un aspecto clave en todas las células con potencial proliferativo. La dificultad para mantener cultivos a largo plazo y la disminución en el número de neuroesferas formadas por cultivo apuntan a una capacidad de autorrenovación disminuida como consecuencia de la mutación de LPP3. Ensayos de pasajes continuos bajo condiciones de proliferación son necesarios para determinar si los cultivos carentes de LPP3 pueden conservar esta capacidad. También será necesaria la evaluación, por medio de marcadores específicos de células troncales, del porcentaje de NSCs presentes en los cultivos y su actividad mitótica en cultivos de formación de neuroesferas.

Otro punto importante para tener un mejor entendimiento del rol de LPP3 será analizar la población de precursores neurales presentes en el hipocampo al momento de extraerlo para determinar si ocurre una reducción en el número de células formadoras de neuroesferas como consecuencia de defectos en la capacidad de autorrenovación. Con este fin, también sería de utilidad analizar *in vivo* e *in vitro* la capacidad proliferativa de ratones de mayor edad, la cual naturalmente tiende a disminuir.

Será importante también encontrar las moléculas río debajo de la actividad de LPP3 que median los efectos observados sobre la proliferación y diferenciación, con un especial interés en los receptores de S1P (principalmente el 1) y LPA (1-2), así como la señalización de Wnt. Dependiendo de la vía de señalización que muestre más promesa como la responsable de los efectos descritos, será necesario realizar experimentos *in vivo* e *in vitro* que logren fenocopiar lo observado y rescatar las alteraciones producto de la mutación.

Por último, tenemos indicios que nos hacen pensar que la LPP3 también regula la neurogénesis en la SVZ. El próximo paso será determinar si los efectos observados sobre el nicho neurogénico del hipocampo se conservan en el de los ventrículos laterales y cuáles son las vías que participan en la regulación de la neurogénesis adulta dependiente de lípidos.

11. REFERENCIAS

- Abrous, D., Koehl, M. & Moal, M. Le, 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews*, (322), pp.523–569.
- Ahmed, S., 2009. The culture of neural stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 106(1), pp.1–6.
- Altman, J., 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*.
- Altman, J. & Das, G., 1965. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*.
- Altman, J. & Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, 124(3), pp.319–35.
- Altmann, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. *J. Comp. Neur.*, 126, pp.337–390.
- Anderson, G. & Maes, M., 2014. Reconceptualizing adult neurogenesis: role for sphingosine-1-phosphate and fibroblast growth factor-1 in co-ordinating astrocyte-neuronal precursor interactions. *CNS & neurological disorders drug targets*, 13(1), pp.126–36.
- Andreyev, A.Y. et al., 2010. Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *Journal of lipid research*, 51(9), pp.2785–97.
- Belzung, C. & Wigmore, P., 2013. *Neurogenesis and Neural Plasticity*,
- Berridge, M.J., 1984. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *The Biochemical journal*, 220(2), pp.345–60.
- Bréart, B. et al., 2011. Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), pp.1267–78.
- Brindley, D.N., 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 92(5), pp.900–12.
- Brindley, D.N. et al., 2009. Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(9), pp.956–61.
- Brindley, D.N. & Pilquill, C., 2009. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, pp.S225–30.
- Brindley, D.N. & Waggoner, D.W., 1998. Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *The Journal of biological chemistry*, 273(38), pp.24281–4.

- Bruntz, R.C., Lindsley, C.W. & Brown, H.A., 2014. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacological reviews*, 66(4), pp.1033–79.
- Bull, N.D. & Bartlett, P.F., 2005. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(47), pp.10815–21.
- Castilla-Ortega, E. et al., 2011. Aggravation of chronic stress effects on hippocampal neurogenesis and spatial memory in LPA₁ receptor knockout mice. *PloS one*, 6(9), p.e25522.
- Castilla-Ortega, E. et al., 2013. Reduced wheel running and blunted effects of voluntary exercise in LPA1-null mice: the importance of assessing the amount of running in transgenic mice studies. *Neuroscience research*, 77(3), pp.170–9.
- Castro, B.M., Prieto, M. & Silva, L.C., 2014. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Progress in lipid research*, 54, pp.53–67.
- Celio, M.R. et al., 1990. Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k. *Cell calcium*, 11(9), pp.599–602.
- Chae, S.-S., Paik, J.-H., et al., 2004. Regulation of limb development by the sphingosine 1-phosphate receptor S1p1/EDG-1 occurs via the hypoxia/VEGF axis. *Developmental Biology*, 268(2), pp.441–447.
- Chae, S.-S., Proia, R.L. & Hla, T., 2004. Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 73(1-2), pp.141–50.
- Chatterjee, I. et al., 2011. Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via β -catenin and CYCLIN-D1 signaling. *Molecular cancer*, 10(1), p.51.
- Choi, J.W. et al., 2010. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, pp.157–86.
- Choi, J.W., Lee, C.-W. & Chun, J., 2008. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochimica et biophysica acta*, 1781(9), pp.531–9.
- Christoffersen, C. et al., 2011. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), pp.9613–8.
- Chun, J. et al., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological reviews*, 62(4), pp.579–87.
- Chun, J., 2013. *Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry*, John Wiley & Sons.

- Clark, P.J. et al., 2009. Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain. *Hippocampus*, 19(10), pp.937–50.
- Codega, P. et al., 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, 82(3), pp.545–59.
- Contos, J.J., Ishii, I. & Chun, J., 2000. Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology*, 58(6), pp.1188–96.
- Contos, J.J.A. et al., 2002. Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Molecular and cellular biology*, 22(19), pp.6921–9.
- Coskun, V. et al., 2008. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), pp.1026–31.
- Costa, M.R. et al., 2011. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 138(6), pp.1057–1068.
- Cremesti, A. et al., 2001. Ceramide enables fas to cap and kill. *The Journal of biological chemistry*, 276(26), pp.23954–61.
- Cyster, J.G. & Schwab, S.R., 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology*, 30, pp.69–94.
- Deamer, D. et al., 2002. The first cell membranes. *Astrobiology*, 2(4), pp.371–81.
- Deleyrolle, L.P. & Reynolds, B.A., 2009. Neural Cell Transplantation D. Gordon & N. J. Scolding, eds. , 549, pp.91–101.
- Delon, C. et al., 2004. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), pp.44763–74.
- Dittel, B., 2008. CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. *Brain, behavior, and immunity*, 22(4), pp.421–430.
- Doetsch, F. et al., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), pp.703–16.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, a, 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), pp.5046–5061.

- Escalante-Alcalde, D., 2007. Generation of a conditional Ppap2b/Lpp3 null allele. *genesis*, 469(45), pp.465–469.
- Escalante-Alcalde, D. & Hernandez, L., 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development*, 130, pp.4623–4637.
- Escalante-Alcalde, D., Morales, S.L. & Stewart, C.L., 2009. Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3 and its expression during embryogenesis. *The International journal of developmental biology*, 53(1), pp.139–47.
- Francis, F. et al., 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), pp.247–56.
- Frisca, F. et al., 2013. Rho/ROCK pathway is essential to the expansion, differentiation, and morphological rearrangements of human neural stem/progenitor cells induced by lysophosphatidic acid. *Journal of lipid research*, 54(5), pp.1192–206.
- Fukuhara, S. et al., 2012. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), pp.1416–26.
- Fukushima, N. et al., 2007. Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA1-G(i/o) pathway. *Neurochemistry international*, 50(2), pp.302–7.
- Gajera, C.R. et al., 2010. LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *Journal of cell science*, 123(Pt 11), pp.1922–30.
- Galea, L. a M. et al., 2006. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus*, 16, pp.225–232.
- Gomez-Muñoz, A. et al., 1995. Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Molecular pharmacology*, 47(5), pp.833–9.
- Gómez-Muñoz, A. et al., 2004. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *Journal of lipid research*, 45(1), pp.99–105.
- Gutiérrez-Martínez, E. et al., 2013. Lipid phosphate phosphatase 3 participates in transport carrier formation and protein trafficking in the early secretory pathway. *Journal of cell science*, 126, pp.2641–55.
- Hack, M.A. et al., 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature neuroscience*, 8(7), pp.865–72.
- Hannun, Y.A. & Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), pp.139–50.

- Hansen, K.B. et al., 2011. 2-Oleoyl Glycerol Is a GPR119 Agonist and Signals GLP-1 Release in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.
- Harada, J. et al., 2004. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *Journal of neurochemistry*, 88(4), pp.1026–39.
- Hartfuss, E. et al., 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental biology*, 229(1), pp.15–30.
- Hecht, J.H. et al., 1996. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of cell biology*, 135(4), pp.1071–83.
- Herr, D. & Chun, J., 2007. Effects of LPA and S1P on the nervous system and implications for their involvement in disease. *Current drug targets*, pp.155–167.
- Hoeflerlin, L.A., Wijesinghe, D.S. & Chalfant, C.E., 2013. The role of ceramide-1-phosphate in biological functions. *Handbook of experimental pharmacology*, (215), pp.153–66.
- Hooks, S.B., Ragan, S.P. & Lynch, K.R., 1998. Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform. *FEBS Letters*, 427(2), pp.188–192.
- Humtsoe, J.O. et al., 2010. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Molecular and cellular biology*, 30(7), pp.1593–606.
- Humtsoe, J.O. et al., 2005. Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), pp.906–919.
- Ihrie, R. a & Alvarez-Buylla, A., 2011. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*, 70(4), pp.674–86.
- Imai, A. et al., 2000. A gonadotropin-releasing hormone-responsive phosphatase hydrolyses lysophosphatidic acid within the plasma membrane of ovarian cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(9), pp.3370–5.
- Jessberger, S. & Gage, F.H., 2014. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans. *Trends in cell biology*, pp.1–6.
- Jose Lopez-Andreo, M., Gomez-Fernandez, J.C. & Corbalan-Garcia, S., 2003. The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Molecular biology of the cell*, 14(12), pp.4885–95.
- Kai, M. et al., 1997. Cloning and Characterization of Two Human Isozymes of Mg²⁺-independent Phosphatidic Acid Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), pp.24572–24578.

- Kaneko, N. & Sawamoto, K., 2007. [Neuronal migration in the adult brain]. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi = Japanese journal of psychopharmacology*, 27(5-6), pp.215–8.
- Kankaanpää, P. et al., 2012. BioImageXD: an open, general-purpose and high-throughput image-processing platform. *Nature Methods*, 9(7), pp.683–689.
- Kempermann, G., 2012. New neurons for “survival of the fittest”. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(10), pp.727–36.
- Kingsbury, M. a et al., 2003. Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nature neuroscience*, 6(12), pp.1292–9.
- Klaus, F. & Amrein, I., 2012. Running in laboratory and wild rodents: differences in context sensitivity and plasticity of hippocampal neurogenesis. *Behavioural brain research*, 227(2), pp.363–70.
- Kok, B.P.C. et al., 2012. Unlike two peas in a pod: lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases. *Chemical reviews*, 112(10), pp.5121–46.
- Kotarsky, K. et al., 2006. Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(2), pp.619–28.
- Lajtha, A., Tettamanti, G. & Goracci, G. eds., 2010. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Boston, MA: Springer US.
- Lee, S., Clemenson, G. & Gage, F., 2012. New neurons in an aged brain. *Behavioural brain research*, 227(2), pp.497–507.
- Lein, E.S. et al., 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), pp.168–76.
- Leong, S., Faux, C. & Turbic, A., 2011. The Rho kinase pathway regulates mouse adult neural precursor cell migration. *Stem Cells*, pp.332–343.
- Lie, D.-C. et al., 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437(7063), pp.1370–1375.
- Lledo, P.-M., Merkle, F.T. & Alvarez-Buylla, A., 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends in neurosciences*, 31(8), pp.392–400.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A., 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5162), pp.1145–8.
- Long, J.S. et al., 2006. Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidic acid- and platelet-derived-growth-factor-induced cell migration. *The Biochemical journal*, 394, pp.495–500.

- Long, J.S., Pyne, N.J. & Pyne, S., 2008. Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function. *The Biochemical journal*, 411(2), pp.371–7.
- López- Juárez, A., 2011. Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine- 1- phosphate metabolism/signaling and development. *Glia*, 59(4), pp.577–589.
- Luquain, C., Sciorra, V.A. & Morris, A.J., 2003. Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things. *Trends in biochemical sciences*, 28(7), pp.377–83.
- Maceyka, M. & Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 510(7503), pp.58–67.
- Marchesini, N. & Hannun, Y.A., 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 82(1), pp.27–44.
- Masiulis, I., Yun, S. & Eisch, A.J., 2011. The interesting interplay between interneurons and adult hippocampal neurogenesis. *Molecular neurobiology*, 44(3), pp.287–302.
- Matas-Rico, E. et al., 2008. Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Molecular and cellular neurosciences*, 39(3), pp.342–55.
- Mendelson, K., Evans, T. & Hla, T., 2013. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*, 141, pp.5–9.
- Mendelson, K., Evans, T. & Hla, T., 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development (Cambridge, England)*, 141(1), pp.5–9.
- Mercier, F., Kitasako, J.T. & Hatton, G.I., 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *The Journal of comparative neurology*, 451(2), pp.170–88.
- Ming, G.-L. & Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), pp.687–702.
- Mirzadeh, Z. et al., 2010. The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (39).
- Mitsutake, S. et al., 2004. Ceramide Kinase Is a Mediator of Calcium-dependent Degranulation in Mast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), pp.17570–17577.
- Mizugishi, K. et al., 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Molecular and cellular biology*, 25(24), pp.11113–21.

- Morris, K.E., Schang, L.M. & Brindley, D.N., 2006. Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 281(14), pp.9297–306.
- Morshead, C.M., Craig, C.G. & van der Kooy, D., 1998. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development (Cambridge, England)*, 125(12), pp.2251–61.
- Murthy, S.N.P. et al., 2006. Activation of phospholipase Cepsilon by free fatty acids and cross talk with phospholipase D and phospholipase A2. *Biochemistry*, 45(36), pp.10987–97.
- Nakashima, S., 2002. Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. *Journal of biochemistry*, 132(5), pp.669–75.
- O'Sullivan, C. & Dev, K.K., 2013. The structure and function of the S1P1 receptor. *Trends in pharmacological sciences*, 34(7), pp.401–12.
- Oaks, J. & Ogretmen, B., 2014. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Frontiers in oncology*, 4, p.388.
- Obeid, L.M. et al., 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102), pp.1769–71.
- Ortega, F. et al., 2013. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature cell biology*, 15(6), pp.602–13.
- Panchatcharam, M. et al., 2014. Mice with targeted inactivation of ppap2b in endothelial and hematopoietic cells display enhanced vascular inflammation and permeability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(4), pp.837–45.
- Parras, C.M. et al., 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *The EMBO journal*, 23(22), pp.4495–505.
- Pastrana, E., Cheng, L.-C. & Doetsch, F., 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), pp.6387–92.
- Platel, J.-C. et al., 2009. GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia*, 57(1), pp.66–78.
- Pohorille, A. & Deamer, D., 2009. Self-assembly and function of primitive cell membranes. *Research in microbiology*, 160(7), pp.449–56.
- Renault, A.D., Kunwar, P.S. & Lehmann, R., 2010. Lipid phosphate phosphatase activity regulates dispersal and bilateral sorting of embryonic germ cells in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 137(11), pp.1815–23.

- Riccitelli, E. et al., 2013. Extracellular sphingosine-1-phosphate: a novel actor in human glioblastoma stem cell survival. *PloS one*, 8(6), p.e68229.
- Roberts, R. et al., 1998. Human Type 2 Phosphatidic Acid Phosphohydrolases. , 273(34), pp.22059–22067.
- Rolls, E.T., 1996. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, 6(6), pp.601–20.
- Sánchez-Sánchez, R. et al., 2012. Lack of lipid phosphate phosphatase-3 in embryonic stem cells compromises neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 241(5), pp.953–64.
- Sánchez-sánchez, R. et al., 2013. NIH Public Access. , 241(5), pp.953–964.
- Santin, L.J. et al., 2009. Behavioral phenotype of maLPA1-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes, brain, and behavior*, 8(8), pp.772–84.
- Savinainen, J.R. et al., 2001. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *British journal of pharmacology*, 134(3), pp.664–72.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675.
- Seki, T. & Arai, Y., 1993. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neuroscience research*, 17(4), pp.265–90.
- Senda, K. et al., 2009. Inducible capillary formation in lymphatic endothelial cells by blocking lipid phosphate phosphatase-3 activity. *Lymphatic research and biology*, 7(2), pp.69–74.
- Seri, B. et al., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), pp.7153–60.
- Seri, B. et al., 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4), pp.359–378.
- Sheng, X. et al., 2015. Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development*, 142(8), pp.1390–1395.
- Sigal, Y.J., McDermott, M.I. & Morris, A.J., 2005. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *The Biochemical journal*, 387(Pt 2), pp.281–93.

- Singec, I. et al., 2006. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nature ...*, 3(10), pp.801–806.
- Smith, E.R. et al., 2000. Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. *Methods in enzymology*, 312, pp.361–73.
- Smyth, S.S. et al., 2003. Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity. *The Journal of biological chemistry*, 278(44), pp.43214–23.
- Spassky, N. et al., 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), pp.10–8.
- Spohr, T.C.L. de S.E. et al., 2012. Sphingosine 1-phosphate-primed astrocytes enhance differentiation of neuronal progenitor cells. *Journal of neuroscience research*, 90(10), pp.1892–902.
- Spohr, T.C.S. et al., 2008. Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 283(12), pp.7470–9.
- Stancevic, B. & Kolesnick, R., 2010. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS letters*, 584(9), pp.1728–40.
- Su, A.I. et al., 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp.6062–7.
- Svetlov, S. & Ignatova, T., 2004. Lysophosphatidic acid induces clonal generation of mouse neurospheres via proliferation of Sca-1-and AC133-positive neural progenitors. *Stem cells and ...*, 693, pp.685–693.
- Tanyi, J.L. et al., 2003. Role of decreased levels of lipid phosphate phosphatase-1 in accumulation of lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(10 Pt 1), pp.3534–45.
- Temple, S. & Alvarez-Buylla, A., 1999. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 9(1), pp.135–41.
- Tomsig, J.L. et al., 2009. Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *The Biochemical journal*, 419(3), pp.611–8.
- Tropepe, V. et al., 1999. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental biology*, 208(1), pp.166–88.
- Tsujiuchi, T. et al., 2014. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histology and histopathology*, 29(3), pp.313–21.

- Varela-Nallar, L. & Inestrosa, N.C., 2013. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(June), p.100.
- Venable, M.E. et al., 1995. Role of ceramide in cellular senescence. *The Journal of biological chemistry*, 270(51), pp.30701–8.
- Venkataraman, K. et al., 2006. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *The Biochemical journal*, 397(3), pp.461–71.
- Windh, R.T. et al., 1999. Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry*, 274(39), pp.27351–8.
- Woodcock, J., 2006. Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB life*, 58(8), pp.462–6.
- Xiong, F. et al., 2011. Optimal time for passaging neurospheres based on primary neural stem cell cultures. *Cytotechnology*, 63(6), pp.621–31.
- Yamane, M., Furuta, D. & Fukushima, N., 2010. Lysophosphatidic acid influences initial neuronal polarity establishment. *Neuroscience letters*, 480(2), pp.154–7.
- Ye, X. & Chun, J., 2010. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(1), pp.17–24.
- Yue, J., 2004. Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cellular Signalling*, 16(3), pp.385–399.
- Yung, Y.C. et al., 2015. Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron*, 85(4), pp.669–682.
- Zhang, N. et al., 1997. The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature*, 385(6611), pp.64–67.
- Zhang, N., Sundberg, J.P. & Gridley, T., 2000. Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 27(4), pp.137–40.