



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

*POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS*

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR UNAM

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FOSFATASA DE LÍPIDOS FOSFATADOS-3 (LPP3) EN EL
DESARROLLO NEURAL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ROBERTO SÁNCHEZ SÁNCHEZ.

TUTORA: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE.

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de CONACyT-39995 y PAPIIT-IN215605. Roberto Sánchez Sánchez recibió una beca por parte de CONACyT para la obtención del grado de Doctor del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM, además de una beca de RedFarmed como apoyo de titulación.

DEDICATORIA.

Es para mí un honor poder agradecer y dedicar este trabajo a mis padres por haberme dado la mejor de las herencias en la vida, me refiero a la educación, gracias a ellos por enseñarme con el ejemplo porque siempre han sido trabajadores y dedicados en todo lo que hacen, definitivamente si no hubiera sido por ellos hoy no sería quien soy. Agradezco a mis hermanos porque también han sido un ejemplo a seguir y me han ayudado a lo largo de mi vida.

También agradezco a la Dra. Escalante por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, además porque desde la licenciatura se encargó de mi formación en el campo de la ciencia y en especial en el área de la biología del desarrollo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio que siempre hicieron el trabajo mucho más divertido. Gracias a mis amigos y a todas las personas especiales que me acompañaron a lo largo del doctorado, brindándome su apoyo, amistad y paciencia aún en los momentos difíciles.

Agradezco a todos mis profesores que me instruyeron en distintas disciplinas de la ciencia y que siempre encontré en ellos un buen consejo para poder desarrollar mi trabajo con éxito.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
El desarrollo del sistema nervioso	9
Sonic hedgehog	11
Ácido retinoico	13
El Ácido lisofosfatídico (LPA) en el sistema nervioso	16
La Esfingosina-1-fosfato (S1P) en el sistema nervioso	19
El Ácido Fosfatídico (AP) en sistema nervioso	22
La Ceramida-1-fosfato (C1P) y la Ceramida (Cer) en el sistema nervioso	22
La fosfatasa de lípidos fosfatados-3 (LPP3)	23
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Estrategia experimental	30
Cultivo y diferenciación de las células troncales embrionarias	30
Inmunofluorescencias	33
Ensayos de diferenciación en cultivo de explantes de embriones	33
Análisis de los datos	34
Ensayos de western blot	34
Cuantificación de Glicero- y Esfingo-fosfolípidos por Cromatografía	

líquida de alta presión y espectrometría de masas en tandem.....	35
RESULTADOS	36
La ausencia de LPP3 reduce la diferenciación a precursores neurales y neuronas espinales a partir de ES	36
La ausencia de Lpp3 también produce una reducción en la cantidad de neuronas diferenciadas en la formación de teratomas.....	40
La deficiencia de LPP3 afecta la proliferación celular	42
Los EBs formados a partir de células carentes de LPP3 disminuyen su crecimiento debido a un aumento de muerte celular por apoptosis.	43
El inhibidor de caspasas aumenta la proporción de neuronas diferenciadas de ES LPP3 ^{-/-}	46
El aumento de muerte celular en los EBs LPP3 ^{-/-} no se debe a la susceptibilidad de estas células al Ácido retinoico	46
Las vías de ROCK y PI3K no son responsables de la reducción en el crecimiento de los EBs deficientes en LPP3	47
La mutación en LPP3 induce la diferenciación espontánea de ES a células positivas a actina de músculo liso	48
La DHS1P fenocopia el fenotipo de la mutación de LPP3 en células silvestres.	51
La ausencia de LPP3 afecta el crecimiento de neuritas pero no afecta el establecimiento de motoneuronas.....	53
El tratamiento con inhibidores de ROCK y PI3K rescatan parcialmente la neuritogénesis en las neuronas carentes en LPP3	54
Las neuronas carentes de LPP3 diferenciadas en explantes de tubo neural	

silvestres son incapaces de extender neuritas apropiadamente	56
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	66

ABREVIATURAS.

AP	Ácido fosfatídico
AR	Ácido retinoico
Cer	Ceramida
C1P	Ceramida-1-fosfato
DAG	Diacilglicerol
DHS1P	Dihidro-esfingosina-1-fosfato
DMS	Dimetilesfingosina
EBs	Cuerpos embrionarios o embrioides (del inglés embryoid bodies)
ES	Células troncales embrionarias (del inglés embryonic stem)
Isl	Islet
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPP	Fosfatasa de lípidos fosfatados.
LPP3	Proteína Fosfatasa de lípidos fosfatados-3
MAG	Monoacilglicerol
MN	Motoneurona
<i>Ppap2b</i>	Gen que codifica para la LPP3
<i>o Lpp3</i>	
Shh	Sonic hedgehog
Sph	Esfingosina
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SphK	Cinasa de esfingocina
WT	Silvestre

RESUMEN.

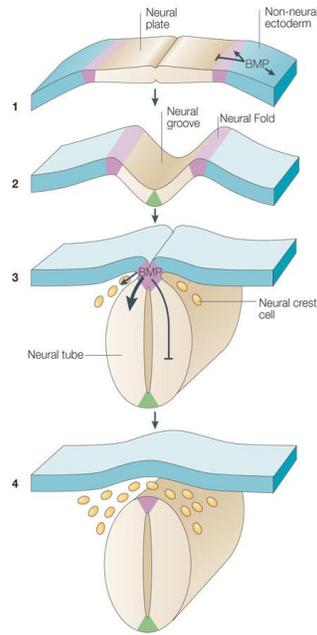
Lípidos bioactivos como el ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) son reguladores importantes de pluripotencia, diferenciación de las células troncales embrionarias (ES) y de células progenitoras neurales. En este trabajo se muestra como la fosfatasa de lípidos fosfatados-3 (LPP3) juega un papel importante en la diferenciación de las ES a células neurales espinales y en la neuritogénesis de las mismas. Nuestros resultados muestran que células troncales embrionarias deficientes en LPP3 diferenciadas a neuronas caudales presentan una menor capacidad de diferenciación a progenitores neurales y neuronas jóvenes, además, estas neuronas presentan una reducción en el crecimiento de sus neuritas. Cuando las ES *Lpp3*^{-/-} se diferencian con un protocolo para generar neuronas caudales, inesperadamente una gran proporción de estas células se diferencian a células que expresan un marcador de células de músculo liso. Dicho fenotipo es en parte prevenido por inhibidores de la cinasas de esfingosina y parcialmente fenocopiado por la adición de DHS1P a cultivos silvestres. Nuestros datos sugieren fuertemente que la LPP3 juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso espinal en etapas tempranas, además de en el crecimiento de neuritas en estas neuronas.

INTRODUCCIÓN.

El desarrollo del sistema nervioso.

Durante el desarrollo embrionario se generan las tres capas germinales (Endodermo, mesodermo y ectodermo) que darán origen a todos los órganos de un individuo. El ectodermo es la capa germinal encargada de formar al sistema nervioso, pero además genera la epidermis y las células de la cresta neural.

Para que el ectodermo de origen al sistema nervioso se requieren de dos procesos fundamentales: la neurulación primaria (Figura 1) y la neurulación secundaria. La neurulación primaria se caracteriza porque un grupo de células del ectodermo deja de expresar E-cadherina y comienza a expresar N-cadherina, este cambio en la expresión de moléculas adherentes junto con la señalización de BMPs, Shh, AR, entre otras, permite que ocurra el plegamiento de esta región del ectodermo (Plegamiento). Después ocurre la elevación de la parte del ectodermo que dará origen a la cresta neural y a la piel (Elevación), para que estas estructuras puedan convergir provocando que la parte del ectodermo que dará origen al tubo neural tome la forma de una "U" (Convergencia), finalmente las células que desarrollaran la piel se unirán mediante las E-cadherinas y el tubo neural se cerrará mediante las N-cadherinas (Cierre) separándose en tejidos de: piel, cresta neural y sistema nervioso.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Neuroscience

Figura1. Formación del tubo neural. En 1 se muestra como parte del ectodermo neural (café) comienza a diferenciarse y a hundirse mediante la inhibición que ejerce BMP sobre esta región (plegamiento). En 2 ocurre el proceso de elevación, donde el tejido que dará origen a la piel (azul) y a la cresta neural (morado) se alza. En 3 vemos el proceso de convergencia donde los tejidos que darán origen a células de la cresta neural se unen y en 4 se observa el cierre del tubo neural el cual se separa al tubo neural de las células de la cresta neural y la epidermis, tomado de (Liu and Niswander, 2005).

La neurulación secundaria involucra la condensación de células mesenquimáticas para formar un cordón medular por debajo del ectodermo superficial y el posterior ahuecamiento (cavitación) de este cordón formando el tubo neural. El tubo neural completo se forma por la unión de estos dos tubos formados separadamente. En aves, todo el tubo neural anterior hasta el par de somitas 28 es producido por la neurulación primaria (Catala et al., 1996), en mamíferos, la neurulación secundaria comienza a nivel de las vértebras sacras (Nieuwestein et al., 1993) mientras que en anfibios como *Xenopus*, solo el tubo neural de la cola es derivado a partir de la neurulación secundaria (Gont et al., 1993).

La diferenciación del tubo neural en varias regiones del sistema nervioso central se produce simultáneamente de tres maneras diferentes. A nivel anatómico, el tubo neural y su cavidad sobresalen y se ensanchan formando las cavidades del cerebro y la médula espinal. A nivel tisular las poblaciones celulares

dentro de la pared del tubo neural se reorganizan para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y de la médula espinal. Por último, a nivel celular, las células neuroepiteliales se diferencian a numerosos tipos de células nerviosas y de sostén presentes en el cuerpo.

En la parte anterior del tubo neural se forman tres vesículas primarias: el cerebro anterior (procencéfalo), el cerebro medio (mesencéfalo) y el cerebro posterior (procencefalo). Dentro del tubo neural que dará origen a la médula espinal, donde también ocurre una diferenciación en el eje dorso-ventral que involucra procesos muy complejos que requieren de una gran cantidad de moléculas inductoras del establecimiento de distintos patrones corporales. En el caso del desarrollo de la parte caudal del tubo neural existen dos moléculas sumamente importantes para el establecimiento de las neuronas que ahí se desarrollan. Una de estas moléculas es el morfógeno Sonic hedgehog y la otra es el ácido retinoico. De ambas moléculas se hablará más en detalle acerca de su participación en estos procesos debido a la importancia que jugaron en el protocolo de este trabajo.

Sonic hedgehog (Shh).

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso muy dinámico y complejo, actualmente se conocen algunos de los factores que afectan y definen la diferenciación de distintos tipos celulares neuronales tales como lo son las motoneuronas (MN). Para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación neuronal se requiere de gradientes de morfógenos a lo largo del eje dorso-ventral y antero-posterior del tubo neural. Uno de los morfógenos más estudiados es Sonic hedgehog (Shh), el cual es producido por la notocorda y por la placa del piso. Esto da como resultado que en la parte ventral del tubo neural exista una mayor concentración de Sonic y que en la parte dorsal sea menor. Sonic hedgehog a altas concentraciones es capaz de reprimir homeoproteínas de clase I como: Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3, y Pax6 y favorecer la expresión de homeoproteínas

de clase II como: Nkx6.1 y Nkx2.2. La expresión de distintos factores de transcripción activados por varias concentraciones de Shh ayudará a diferenciar linajes neurales específicos a lo largo del tubo neural (Fig. 2 y 3). En el caso de los progenitores de neuronas motoras la activación de factores de transcripción como Nkx6.1 y Pax6 son esenciales para su establecimiento (Briscoe et al., 2000; Tanabe et al., 1998). En este sentido, Shh es un factor muy importante para la especificación de las neuronas que se formarán en el tubo neural mediante un gradiente en el eje dorso-ventral.

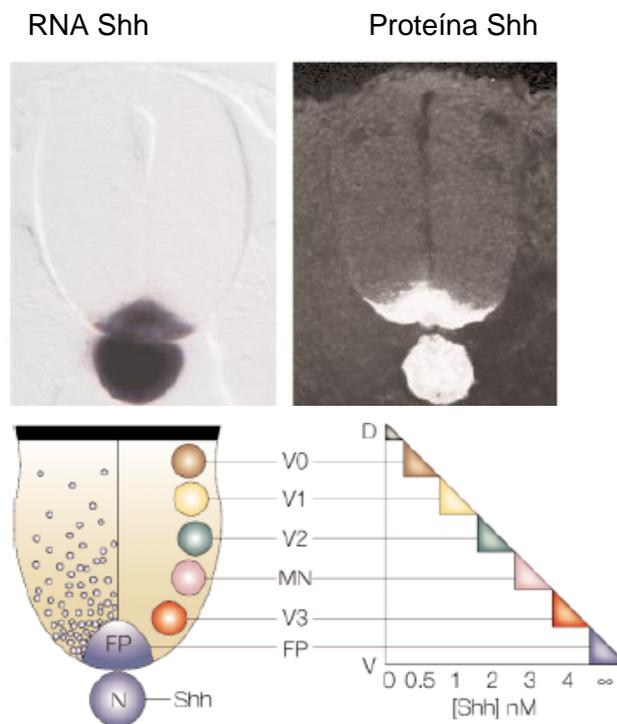


Figura 2. Patrón de expresión de Sonic hedgehog en el tubo neural. Arriba a la izquierda se muestra una hibridación *in situ* para observar el RNA mensajero de Shh en el tubo neural y la placa del piso, mientras que arriba a la derecha se observa una inmunofluorescencia donde vemos a la proteína Shh, El esquema de abajo representa como el gradiente formado por Shh da origen a diferentes interneuronas y a las motoneuronas. FP, placa del piso; N, notocorda; D, dorsal; V, ventral; VO, V1, V2, V3, interneuronas; MN, neuronas motoras (tomado de Jessell 2000).

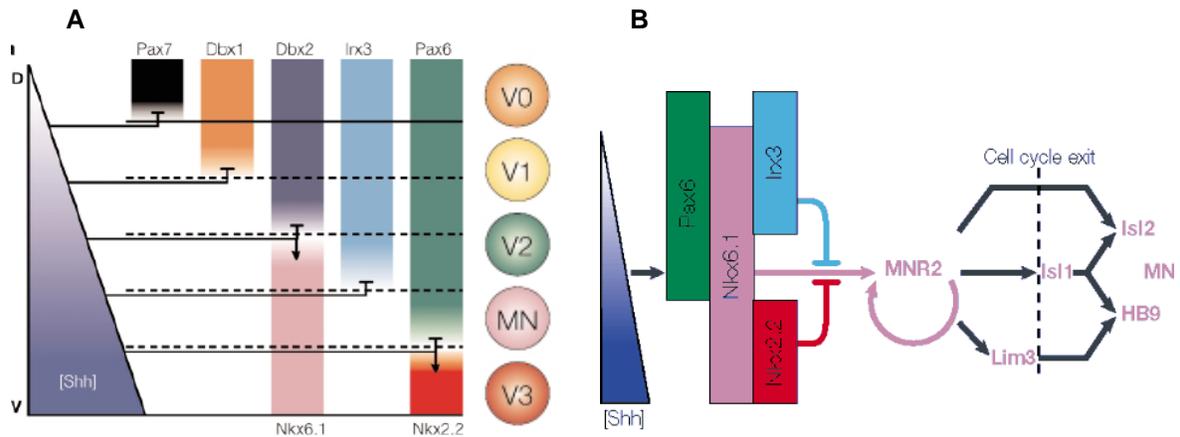


Figura 3. Especificación dorso-ventral del tubo neural por el gradiente de Sonic Hedgehog. En **A** se observa como el gradiente de Shh reprime la expresión de las homeoproteínas de clase I y favorece la expresión de la clase II, esta combinación de factores da como resultado la diferenciación de distintos linajes neurales. **B** muestra como la combinación de activación y represión de factores de transcripción definen los distintos linajes que se han de diferenciar en el tubo neural como las neuronas motoras, quienes expresan *Islet 1* en un inicio y *Islet 2* y *HB9* en estadios más tardíos en el modelo de *Gallus gallus* mientras que en *Mus musculus* inicialmente se expresa HB9 y después *Islet 1* y 2 (tomado de Jessell 2000).

Ácido retinoico.

El ácido retinoico (AR) es un producto derivado de la vitamina A (retinol), la cual se ha visto involucrada en la diferenciación neuronal y en el crecimiento axonal. Para ejercer su función, el retinol viaja por la sangre unido a la proteína 4 de unión al retinol (RBP4), después el retinol entra a las células gracias a la interacción con el receptor de RBP4. Una vez en el citoplasma el retinol se une a la proteína 1 de unión al retinol (RBP1) y subsecuentemente es convertido a retinaldéhido por la retinaldéhido deshidrogenasa 10 (RDH10). El retinaldéhido finalmente es convertido a AR por las retinaldéhido deshidrogenasas (RALDHs). El AR es capaz de entrar al núcleo celular al unirse a la proteína 2 de unión al ácido retinoico celular (CRABP2). En el núcleo el ácido retinoico se une a los receptores; de unión al ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoides X (RXRs), los cuales forman heterodímeros que se unen a secuencias de DNA conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE). Esta unión activa la

transcripción de genes específicos como BRN2, el factor nuclear κ B (NF κ B), SOX1, SOX6 y neurogenina, entre otros (Maden, 2007).

Durante el desarrollo del tubo neural, el ácido retinoico es liberado por las somitas ya que estas expresan altos niveles de la Retinaldehído deshidrogenasa 2. El Ácido retinoico junto con Shh (que se expresa ventralmente), las proteínas morfogénicas de hueso (BMP, que se expresan dorsalmente) y el Factor de crecimiento Fibroblástico (FGF que se expresa en la región posterior del tubo neural), determinan la especialización de neuronas sensoriales, interneuronas y moto neuronas a lo largo del tubo neural (Figura 4) (Budhu and Noy, 2002; Díez del Corral and Storey, 2004; Kawaguchi et al., 2007; Novitch et al., 2003; Wilson and Maden, 2005).

Ya que las somitas son las responsables de liberar el AR, una manera de saber el papel del ácido retinoico en la especificación de los linajes neuronales fue mediante el cambio de las somitas branquiales hacia el nivel torácico. El tipo de MNs que se generan cambian de tipo torácico a tipo branquial (Ensini et al., 1998). Además, se ha observado que en ausencia de AR la producción de MN y otras neuronas se disminuye, los axones de estas neuronas no logran salir del tubo neural y las que proyectan al interior de este son anormales.

A nivel lumbar, la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa 2/RALDH2 es muy importante para especificar a un grupo de MN, ya que a través de estas, neuronas de la columna lateral (LMC) migran de la región subventricular a la orilla externa del tubo neural. De manera que el gradiente de AR también participa en procesos de migración neuronal (Figura 5) (Sockanathan and Jessell, 1998).

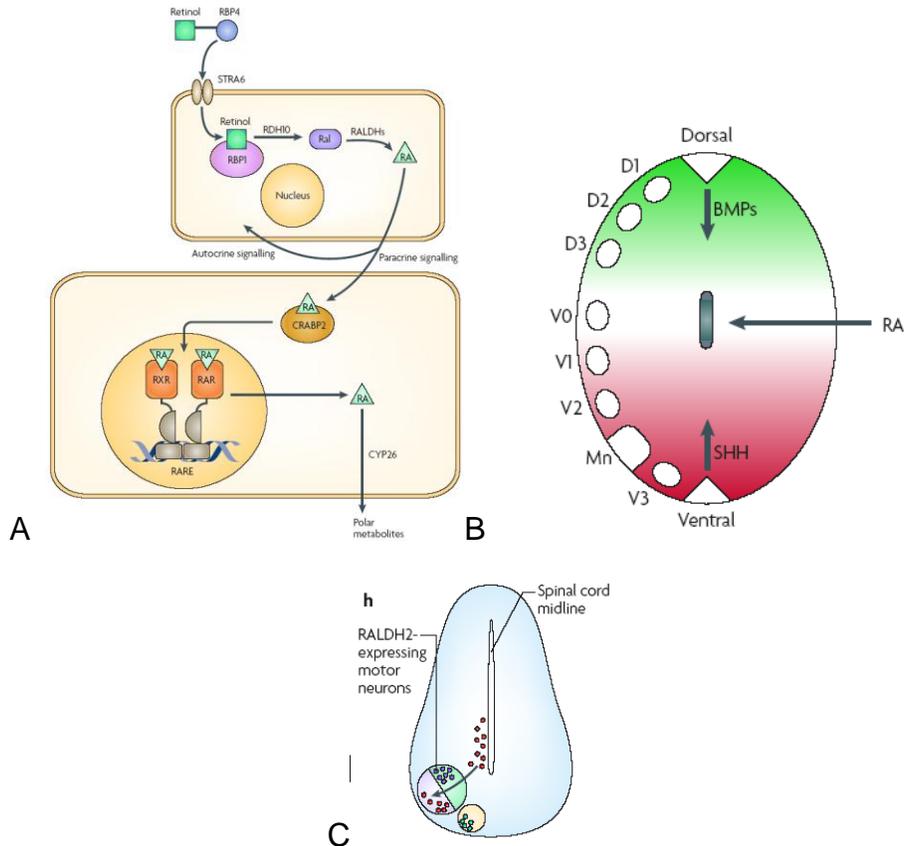


Figura 5. Mecanismo de acción del Ácido retinoico sobre la diferenciación neuronal. **A** muestra la vía de síntesis del ácido retinoico a partir de retinol, así como la unión a sus receptores nucleares y las secuencias de DNA que reconocen estos. En **B** se observa como la señalización entre BMP, Shh y AR son capaces de dar identidad a las neuronas del tubo neural. En **C** se ejemplifica una de las funciones del AR en especificar a las neuronas de la LMC cuando migrar del centro del cordón espinal hacia la periferia del mismo al atravesar las motoneuronas que expresan RALDH2 (tomado de Maden 2007).

Hasta el momento el estudio del desarrollo del sistema nervioso se ha centrado en moléculas como: Sonic hedgehog, Ácido retinoico, Proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), el Factor de crecimiento fibroblástico entre otras. Sin embargo, existen distintas moléculas de las cuales se sabe muy poco o se desconoce la función de su expresión en el sistema nervioso en desarrollo, dentro de estas encontramos a lípidos bioactivos y sus enzimas reguladoras como: El Ácido lisofosfatidico, la Esfingosina-1-fosfato, la Ceramida-1-fosfato, la Ceramida, la Autotaxina, las Esfingosin cinasas y las Fosfatasas de lípidos fosfatados. A continuación se muestra un panorama general de los estudios que involucran algunos de estos lípidos y enzimas en el sistema nervioso.

El Ácido Lisofosfatídico (LPA) en el sistema nervioso.

El ácido lisofosfatídico (LPA), es un glicerofosfolípido que puede ser formado a través de distintas vías de síntesis, sin embargo su principal generación es mediante la conversión de Lisofosfatidilcolina a LPA mediante la Autotaxina (Atx). Este lípido tiene gran importancia biológica gracias a su capacidad de activar distintas vías de señalización mediante receptores acoplados a proteínas G. Hasta el momento se han descrito 6 receptores para LPA (LPA₁₋₆) y otros 3 con poca afinidad o no confirmados (Choi et al., 2010; Yanagida et al., 2009), cada uno de los cuales es capaz de acoplarse a diferentes proteínas G (G_i, G_q, G_{12/13}) (Fukushima and Chun, 2001; Tigyi et al., 2000; Ye et al., 2002).

El ácido lisofosfatídico se comenzó a relacionar con el sistema nervioso ya que muchos de sus receptores se expresan en una gran cantidad de células nerviosas, por ejemplo LPA₁ se expresa abundantemente en la zona subventricular del tubo neural, en la corteza cerebral y en los oligodendrocitos maduros durante la mielinización post-natal en ratón (Hecht et al., 1996; Weiner et al., 1998), la expresión de este, así como de otros receptores en células neurales nos indica que estas células son aptas para recibir estímulos por LPA, de tal manera que a partir de estas observaciones se han descrito diferentes papeles de este lípido en células neurales.

Las células troncales embrionarias (ES) también expresan los receptores LPA_{1,3,5}, por lo que también estas células que se caracterizan por poseer una capacidad pluripotencial de diferenciación, son capaces de responder al Ácido lisofosfatídico, en este sentido, el LPA disminuye la capacidad de las ES para formar neuronas e incrementa la diferenciación de células gliales (Dottori et al., 2008).

La activación de uno u otro receptor del LPA así como la concentración del LPA puede desencadenar distintas respuestas celulares, las cuales dependiendo del contexto celular pueden llegar a ser totalmente opuestas, por lo que el LPA puede inducir tanto proliferación como muerte celular. Por ejemplo, los ratones nulos para el receptor 1 de LPA muestran un incremento en la apoptosis en las

células de Schwann en el nervio ciático. De igual manera neuronas de hipocampo y células de feocromocitoma PC12 muestran apoptosis (10 μ M) y necrosis (50 μ M) a altas concentraciones de este lípido (Harrison et al., 2003; Steiner et al., 2000). Las neuroesferas tratadas con LPA durante tres días también presentan apoptosis, mientras que un tratamiento más prolongado (5 días de cultivo) favorece la diferenciación de neuronas e inhibe la diferenciación de células gliales (Fukushima et al., 2007).

Además se sabe que el LPA utilizado a altas concentraciones (10 μ M) en las primeras etapas de diferenciación disminuye la formación de neuroesferas diferenciadas a partir de ES, sin embargo, cuando el LPA fue agregado en etapas tardías se logra la formación de neuroesfera pero no la extensión de neuritas de las neuronas que fueron diferenciadas. Al utilizar inhibidores contra posibles blancos río abajo de las cascadas de señalización activadas por el LPA se observó que la inhibición de ROCK y de PI3K era fundamental para recobrar el fenotipo silvestre (Dottori et al., 2008).

Estos efectos adversos en proliferación causados por el desbalance de la señalización de LPA también se han observado en modelos *in vivo*, los ratones nulos para LPA₁ mostraron que las neuronas del hipocampo presentaron una reducción en la proliferación con respecto a los ratones silvestres, pero al mismo tiempo presentaron una reducción en el número de dendritas de estas neuronas (Castilla-Ortega et al., 2011).

A pesar de esto ninguna mutación de alguno de los receptores de LPA muestra defectos muy severos en el desarrollo temprano del sistema nervioso *in vivo* (probablemente por la redundancia en sus funciones), sin embargo, la mutación de Autotaxina ha demostrado que su expresión es de suma importancia para el desarrollo correcto del diencefalo así como la comisura entre el diencefalo y el mesencefalo, ya que la ausencia de esta enzima altera los patrones de expresión de genes importantes para el establecimiento de estas regiones, además de alterar la proliferación de las células que ahí residen (Ohuchi et al., 2010). Otra evidencia de la participación de este lípido en el desarrollo del sistema nervioso es el trabajo de Chun y colaboradores quienes muestran que al someter

hemisferios de embriones a hipoxia se observa una migración aberrante de los progenitores neurales, así como una desestabilización en las uniones celulares, fenómenos que requieren de la expresión de LPA₁. En ausencia de este receptor no se observa este fenotipo, por lo cual sabemos que LPA₁ juega un papel fundamental en el correcto posicionamiento de los progenitores neurales de la corteza cerebral (Herr et al., 2011).

Uno de los efectos constantes del LPA sobre diferentes linajes neurales es la retracción de las neuritas y el colapso del cono de crecimiento, lo que promueve el redondeo de las células nerviosas (Campbell and Holt, 2001; Fukushima and Chun, 2001; Fukushima et al., 2000; Jalink et al., 1994; Ramakers and Moolenaar, 1998; Tigyi and Miledi, 1992; Yuan et al., 2003). Aunque no existe actualmente algún reporte que indique que el LPA pueda dirigir la orientación de los axones de las neuronas en desarrollo *in vivo*, un reporte muestra como bajas concentraciones de LPA no inducen la retracción de las neuritas sino el cambio de dirección de estas, además de determinar la polaridad de las neuronas evitando que las neuritas crezcan en la zona donde se encuentra el estímulo de LPA (Yamane et al., 2010).

Estos reportes contrastan con otros casos donde el LPA también ha sido implicado en el mantenimiento de la proliferación de las células troncales embrionarias al activar la vía de fosfolipasa C y la liberación de calcio, dando como resultado la transcripción de c-Myc, pero además de esta vía, el LPA puede inducir la proliferación mediante la activación de la vía de ERK1/2 (Schuck et al., 2003; Todorova et al., 2009). En células de Schwann el LPA promueve la sobrevivencia así como la adhesión célula-célula (Weiner and Chun, 1999; Weiner et al., 2001). También se ha encontrado que el tratamiento *in vitro* con LPA de hemisferios corticales de embriones de ratón produce pliegues en la estructura de los mismos, semejando a los cerebros de primates, aunque este resultado se debe a una reducción en la apoptosis y no a un aumento en la proliferación celular (Kingsbury et al., 2003).

En cultivos *in vitro*, el LPA induce la generación de neuroesferas en medio sin suero, actuando como un mitógeno sustituto del suero, el efecto del LPA es

abatido si se inhibe la vía de señalización mediada por LPA₁ y LPA₃ pero no por LPA₂ (Svetlov et al., 2004).

Los datos anteriores nos muestran que el LPA es un lípido con diversos efectos en el sistema nervioso y el estudio de este así como de sus receptores y las moléculas que lo regulan es de gran importancia para comprender mejor los mecanismos que forman parte del desarrollo neural

La Esfingosina-1-fosfato (S1P) en el sistema nervioso.

La Esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido que también es capaz de desencadenar distintas vías de señalización mediante receptores acoplados a proteínas G. Se han descrito 5 receptores acoplados a proteínas G para la Esfingosina-1-fosfato (S1P₁₋₅), de estos, el cerebro humano expresa altos niveles de S1P_{1-2,5}, los cuales son regulados diferencialmente a lo largo del desarrollo por diferentes moléculas señalizadoras como el factor de crecimiento nervioso (NGF). En células PC12, el NGF es capaz de inducir la diferenciación celular provocando al mismo tiempo la reducción de la expresión de S1P₂ y S1P₅ pero no del S1P₁ (Glickman et al., 1999; Lado et al., 1994; Liu and Hla, 1997; MacLennan et al., 1994).

Al igual que el LPA, la Esfingosina-1-fosfato produce efectos opuestos dependiendo del tipo celular, los receptores y las concentraciones de las que hablemos, sin embargo, la S1P ha sido descrita como un mitógeno que es parte importante del suero. El balance de este lípido y de su precursor ceramida, tiene efectos en la sobrevivencia y apoptosis de células neurales como lo son: las neuronas mesencefálicas, células PC12, neuronas de hipocampo y células cerebelares granulares. Sin embargo, la S1P es capaz de promover la sobrevivencia de oligodendrocitos maduros pero no de pre-oligodendrocitos lo que nos indica que distintos linajes celulares responderán de manera diferente al mismo estímulo dependiendo de los receptores que estas células expresen (Edsall et al., 1997; Hartfield et al., 1997; Shinpo et al., 1999). En estos ejemplos, S1P

siempre se describe como un lípido promotor de sobrevivencia y a ceramida como un lípido inductor de la muerte celular, sin embargo, los efectos de estos lípidos no son los mismos en todos los casos.

La S1P además de promover la sobrevivencia mediante sus receptores acoplados a proteínas G, también parece actuar de una manera intracelular. En células PC12 la S1P evita la muerte celular ocasionada por ceramida, sin embargo, la Dihidro-S1P quien puede unirse y activar a los receptores de S1P, no es capaz de evitar la apoptosis celular causada por su lípido predecesor. Este ejemplo nos muestra que además de la concentración de S1P también es importante su localización para determinar el mecanismo de acción que tenga este lípido sobre una respuesta celular dada. En este sentido, cuando se sobreexpresa la cinasa de esfingosina 1/SphK1 (Una de las enzimas responsables de generar S1P a partir de Esfingosina) en células PC12, se esperaría una producción intracelular de S1P, sin embargo, la S1P producida no parece tener un efecto autocrino ya que no se observa la activación de Erk1/2 ni Akt, los cuales son blancos de los receptores de S1P. Tampoco se han detectado altos niveles de S1P extracelular en cultivos de estas células PC12, por lo que la producción de S1P mediante esta cinasa no necesariamente debe de ser liberada al espacio extracelular (Edsall et al., 2001; Edsall and Spiegel, 1999; Jaillard et al., 2005; Spiegel and Milstien, 2000; Van Brocklyn et al., 1998; Van Brocklyn et al., 1999).

Otra de las propiedades recurrentes con las que se ha asociado a la S1P es su capacidad de regular la extensión de las neuritas y conos de crecimiento en distintas células neurales. Un estudio señala que el receptor 1 de S1P preferencialmente activa Rac, lo cual favorece la extensión de las neuritas, mientras que los S1P₂₋₅ estimulan a Rho y reprimen la actividad de Rac, evitando el crecimiento de las neuritas (Okamoto et al., 2000; Rosenfeldt et al., 2001). También se ha descrito que la S1P inhibe la extensión de las neuritas de cultivos primarios de ganglios de la raíz dorsal, los cuales en un principio expresan S1P₁₋₂. Sin embargo, cuando el NGF promueve el crecimiento neurítico, la S1P favorece este crecimiento mediante su receptor 1, al mismo tiempo que disminuyen la expresión de los receptores S1P₂₋₅, lo que sugiere que la expresión de uno u otro

receptor puede inducir el crecimiento de neuritas o bien su retracción (Glickman et al., 1999; MacLennan et al., 1994). En este sentido el receptor 5 de S1P es el responsable de inducir la retracción de las neuritas en pre-oligodendrocitos mediante la vía de Rho (Jaillard et al., 2005).

Ensayos *in vivo* muestran que los embriones que carecen al mismo tiempo de SphK1 y SphK2 presentan defectos en el cierre del tubo neural, además de un aumento en la apoptosis del neuroepitelio y un decremento en la mitosis, dado que estas enzimas son las responsables de generar S1P, estos ensayos sugieren indirectamente la importancia de mantener una adecuada concentración de este lípido para el desarrollo del sistema nervioso en un modelo murino (Mizugishi et al., 2005).

Resultados novedosos sugieren que S1P pudiera estar dirigiendo el crecimiento de los axones *in vivo*. En embriones de *Xenopus* se observó que la migración de los axones del quiasma óptico está delimitada por la expresión de SphK1 y que al agregar S1P exógenamente estos axones migran de manera errónea, al igual que cuando se agregan inhibidores de las enzimas responsables de la síntesis de este lípido (Strochlic et al., 2008). Esta evidencia demostró, por primera vez, que un lípido podría tener la capacidad de dirigir el crecimiento axonal *in vivo*.

Al igual que el LPA, la S1P se ha visto involucrada en la proliferación de las células troncales embrionarias, pero además en su diferenciación. Tal es el caso donde la S1P favorece la diferenciación de estas células a cardiomiocitos, por lo que este lípido puede activar vías de señalización específicas para lograr diferenciar las células a un linaje celular en particular (Rodgers et al., 2009; Sachinidis et al., 2003b).

En los ejemplos anteriores se ha mostrado como S1P es un lípido con una gran importancia en el desarrollo del sistema nervioso, sin embargo, hacen falta más estudios para poder comprender mejor los distintos mecanismos por los que es capaz de regular procesos tan complejos como es el crecimiento axonal o el cierre del tubo neural.

El Ácido Fosfatídico (AP) en sistema nervioso.

Si bien no se ha documentado del todo el papel del ácido fosfatídico (AP) en el desarrollo del sistema nervioso, este lípido se ha visto implicado en funciones celulares como la exocitosis y la endocitosis. El AP y el PIP₂ promueven la unión del complejo AP2 a la membrana citoplasmática, el cual a su vez recluta clatrininas, toda esta maquinaria es indispensable para la formación de vesículas, por lo que el Ácido fosfatídico estaría formando parte importante en la regulación del tráfico vesicular (Jones and Wessling-Resnick, 1998; West et al., 1997). El AP además está involucrado en la señalización de receptores cinasas de tirocina como el EGF, reclutando Sos a la membrana, el cual a su vez puede activar a Ras, desencadenando distintas vías de señalización (Zhao et al., 2007).

La Ceramida-1-fosfato (C1P) y la Ceramida (Cer) en el sistema nervioso.

Tanto la ceramida-1-fosfato como la ceramida son lípidos que han sido ampliamente estudiados en la muerte y sobrevivencia celular. Por lo general se ha catalogado a la ceramida-1-fosfato como un factor que promueve la sobrevivencia y proliferación celular, mientras que a la ceramida se le considera como un inductor de la muerte celular. Las células de linaje neuronal no son la excepción de los efectos adjudicados a estos dos lípidos. Sin embargo, existen algunos casos distintos a estos efectos descritos. Tanto en neuronas de Purkinje como en neuronas del hipocampo, la ceramida, a bajas concentraciones (3 μ M) es capaz de mantener la sobrevivencia celular y promover el crecimiento dendrítico, sin embargo, a dosis altas (10 μ M) el efecto es el contrario, ocasionando la muerte celular (Furuya et al., 1998; Mitoma et al., 1998). En neuronas motoras, la ceramida también promueve la sobrevivencia mediante el decremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), en estos estudios tras inhibir la glutatión sintasa (mediante BSO) se genera estrés en las células, pero al agregar ceramida a los cultivos, ésta previene la apoptosis de las neuronas (Irie and Hirabayashi, 1998, 1999).

La C1P favorece la sobrevivencia celular e incrementa la proliferación en células de retina, pero también se ha descrito que los mecanismos por los que favorece la proliferación es mediante la activación de PI3K y la transcripción de NF-kappaB (Gomez-Munoz et al., 2005; Miranda et al., 2011). Los ejemplos anteriores revelan que los efectos de C1P como de ceramida dependen de sus concentraciones en las células y pueden ser totalmente opuestos según el contexto en el que se encuentren.

Aunque en la última década se ha puesto mayor interés en la función que algunos de los lípidos durante el desarrollo neural, muy poco se han estudiado las enzimas que regulan el metabolismo de estos lípidos. En este sentido la fosfatasa de lípidos fosfatados-3 es una enzima interesante de estudiar ya que es capaz de regular el balance de LPA, S1P, C1P y AP, además por su expresión en el sistema nervioso en formación, por lo cual a continuación se describen algunas características de esta enzima.

La fosfatasa de lípidos fosfatados-3 (LPP3).

Las fosfatasas de lípidos fosfatados (LPPs), son una familia de enzimas que tienen la capacidad de establecer un balance entre las formas fosforiladas y no fosforiladas de lípidos bioactivos (mediante la defosforilación de los mismos). Los substratos que estas enzimas son capaces de defosforilar son: ácido fosfatídico (AP), ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida-1-fosfato (C1P) y esfingosina-1-fosfato (S1P), mientras que sus productos son: diacil-glicerol (DAG), monoacil-glicerol (MAG), ceramida (Cer) y esfingosina (Sph) respectivamente (Kai et al., 1997; Roberts et al., 1998). Estos lípidos pueden mediar distintas respuestas celulares como: la migración celular, la proliferación, la diferenciación celular, la apoptosis, adhesión célula-célula, célula-matriz, quimiotaxis y la secreción celular (Moolenaar, 1995, 1999; Panetti et al., 2001).

En mamíferos se han identificados tres genes que codifican para LPPs (*LPP1*, *LPP2* Y *LPP3*) (Sciorra and Morris, 2002). *LPP3* se localiza tanto en la membrana plasmática como en las membranas de organelos intracelulares como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Kai et al., 1997; Sciorra and Morris, 1999). Es una proteína integral de membrana que posee seis dominios transmembranales, consta de 311 aminoácidos con un peso aproximado de 35.1 kDa. Su extremo amino y carboxilo se localizan en el espacio citoplasmático. Su sitio catalítico está formado por tres dominios conservados en toda la familia, los cuales se encuentran en la segunda y tercera asas extracelulares o luminales dependiendo de su localización subcelular. Estas enzimas presentan además un sitio de N-glucosilación en la segunda asa extracelular (Figura 6).

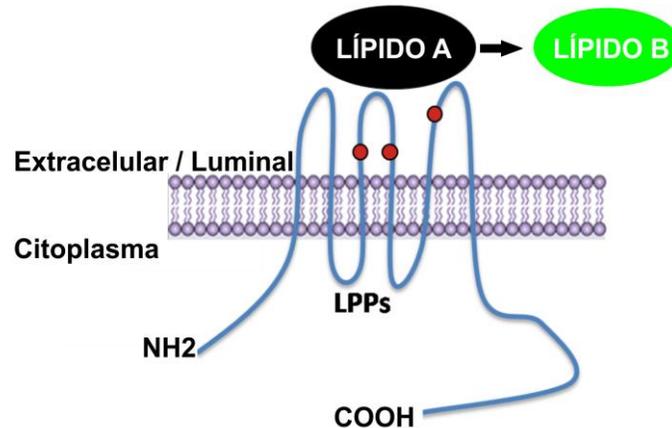


Figura 6. Estructura de las Fosfatasa de Lípidos Fosfatados (LPPs). En rojo se indica la posición de los aminoácidos fundamentales para la actividad catalítica los cuales al desfosforilar un lípido (negro) lo convierte en otro (verde) con distintas propiedades. En azul se representa la cadena de aminoácidos así como la propiedad de ser una proteína transmembranal donde su sitio catalítico siempre está expuesto al espacio extracelular o luminal en retículo endoplasmico y aparato de golgi (Sigal et al., 2005).

Existen diferentes estudios que sugieren que la función de los tres miembros de esta familia de fosfatasa no es redundante. En este sentido la expresión espacial y temporal de *LPP1*, *LPP2* y *LPP3* sugiere funciones específicas, sin embargo, las pruebas con mayor contundencia son los fenotipos obtenidos de los ratones “knockout” para cada una de las enzimas. La inactivación de *Lpp1* y *Lpp2* no afecta la viabilidad de los individuos, mientras que la mutación dirigida de *Lpp3* es letal en etapas embrionarias entre los 8.5-10.5 días de

gestación. Los embriones que carecen de LPP3 presentan dos fenotipos, siendo el más penetrante el deficiente desarrollo del sistema vascular de tejidos extraembrionarios y con menor frecuencia (30%) se presenta un fenotipo más grave caracterizado por defectos en gastrulación, estos embriones muestran duplicación de eje (fenotipo similar observado cuando se altera la vía de Wnt), lo cual sugirió junto con ensayos de luciferasa (tanto en ES como en células HEK293) que LPP3 antagoniza la vía de señalización *Wnt/β-catenina*, además, experimentos donde el RNAm de LPP3 fue inyectado ventralmente en embriones de *Xenopus* junto con *Wnt3a* o *Wnt8*, se corroboró que LPP3 juega un papel antagónico en esa vía ya que evitó la duplicación de eje o la dorsalización de los embriones (Escalante-Alcalde et al., 2003; Tomsig et al., 2009; Zhang et al., 2000). La expresión de esta enzima es dinámica a lo largo del desarrollo embrionario, de tal manera que podemos observarla en: ectodermo extraembrionario (E6.5), endodermo visceral y corion (E7.5), alantoides (E8.5), las somitas y placenta (E9.5), la cresta ectodérmica apical de la extremidades; también se encuentra en los axones de las neuronas que forman los ganglios craneales, los ganglios de la raíz dorsal, las neuronas motoras (MN) y sensoriales de la médula espinal y en el nervio trigémino (E12.5) (Figura 7) (Escalante-Alcalde et al., 2009). Por su parte el mensajero de LPP1 se expresa ubicuamente en embriones de 9.5 días de gestación mientras que el de LPP2 es menos abundante pero también tiene una distribución extensa.

Otro estudio que sugiere que las LPPs realizan distintas funciones es un trabajo donde observan que LPP1 y LPP3 presentan una distribución subcelular distinta en células polarizadas MDCK, mientras que la expresión de LPP3 es basolateral, LPP1 se localiza apicalmente (Jia et al., 2003). En este mismo sentido se ha encontrado que LPP1 y LPP3 se localizan en distintas balsas lipídicas (Kai et al., 1997) lo que también sugiere una especialización de las funciones de cada enzima en distintos micro dominios de membrana.

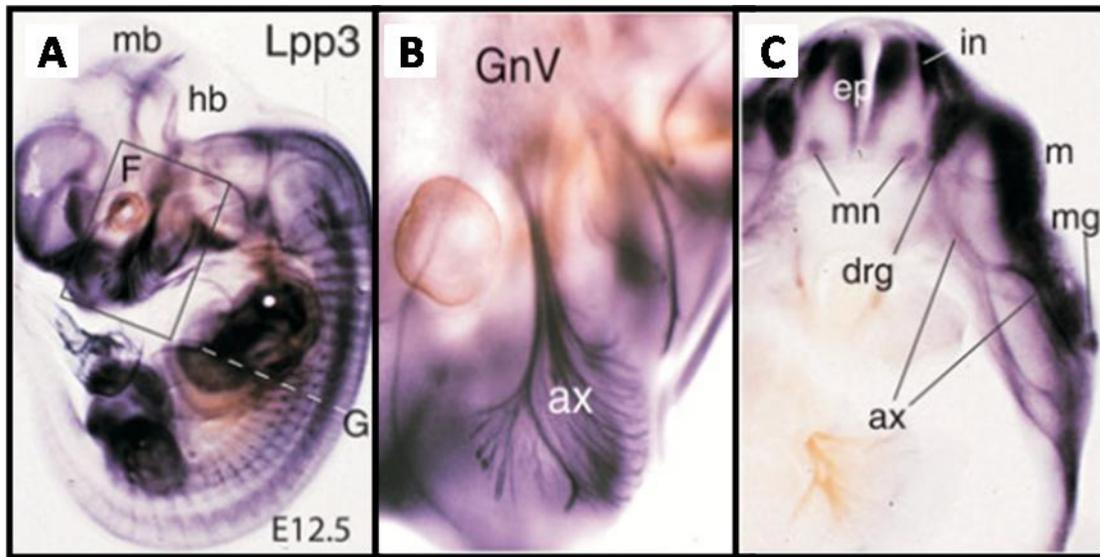


Figura 7. Inmunohistoquímica contra LPP3 en embriones de ratón de 12.5 días de gestación. **A.** Expresión de la proteína en el embrión completo. mb, cerebro medio; hb, cerebro posterior; F, aumento representado en B; G, sección transversal representada en C. **B.** Acercamiento de la región facial que muestra la expresión de LPP3 en el nervio trigémino. GnV, ganglio trigémino, ax, axones. **C.** Corte transversal de un embrión a nivel espinal donde se muestra la expresión de LPP3 en los ganglios de la raíz dorsal (drg), dominios donde se encuentran las neuronas motoras (mn) y en sus axones (ax), además de una fuerte expresión en la zona subventricular que bordea al epéndima (ep). In, interneuronas dorsales; m, miotomo; mg, glándula mamaria (Escalante-Alcalde et al., 2009).

Además de la función de LPP3 como fosfatasa, algunos trabajos demuestran que también tiene una función en las uniones célula-célula. La LPP3 de humanos tiene un sitio RGD el cual es capaz de unirse a integrinas $\alpha_5\beta_3$, mientras que la LPP3 de ratón presenta una variación en este motivo al cambiar el último aminoácido (ácido aspártico) por un ácido glutámico (RGE). En este sentido la secuencia RGD en humanos promueve las interacciones célula-célula en células vasculares. En ese mismo reporte se describió como la colágena I, el VEGF, el bFGF, el PMA y el EGF inducen la expresión de LPP3 (Humtsoe et al., 2003; Humtsoe et al., 2010).

Otra de las funciones que se le han atribuido a la LPP3, es un efecto antitumoral al disminuir el crecimiento y la sobrevivencia de líneas celulares derivadas de tumores de ovario, aumentando la apoptosis celular y la hidrólisis del LPA (Tanyi et al., 2003).

La inactivación de *Lpp3* específicamente en el sistema nervioso, usando el sistema Cre/loxP [*Ppap2b*^{flox/flox}; *Tg(Nes-cre)1Kln*] (Escalante-Alcalde et al, 2007) produce anomalías en el desarrollo del cerebelo ya que presenta folias extra y desarreglos en la citoarquitectura de la glía de Bergman. Además, produce un decremento en la expresión del receptor 1 de esfingosina-1-fosfato lo que sugiere que el metabolismo de S1P por medio de LPP3 es muy importante para la formación adecuada del cerebelo y la coordinación motora (Lopez-Juarez et al., 2011).

JUSTIFICACIÓN.

Dado que se conoce poco del papel que juegan los lípidos así como sus enzimas reguladoras en el sistema nervioso, es de gran importancia generar estudios enfocados en estas áreas de investigación. El patrón de expresión de la LPP3 en el sistema nervioso así como los efectos de sus substratos en diferentes células neurales, sugiere que esta enzima podría ser muy relevante para el desarrollo del sistema nervioso al regular el balance de lípidos implicados en la diferenciación neural y el crecimiento axonal.

Como se mencionó anteriormente, la mutación nula de LPP3 es letal en etapas tempranas del desarrollo, mientras que la mutación tejido-específica en sistema nervioso (empleando al transgénico *Nestina::Cre*) no proporcionó información de la función de LPP3 en el desarrollo temprano del sistema nervioso ya que la inactivación del gen ocurre relativamente tarde (a los 11 días de gestación) (Chen et al., 2006; Tronche et al., 1999). Lo anterior dificulta el estudio de diversos aspectos del desarrollo de las células nerviosas bajo la ausencia de LPP3 *in vivo*. Por estos motivos, en el presente trabajo decidimos emplear células troncales embrionarias deficientes en LPP3 para conocer el efecto de esta mutación en la diferenciación *in vitro* de estas células hacia linajes neuronales caudales y ventrales, en específico hacia neuronas motoras.

HIPÓTESIS.

La ausencia de LPP3 en ES reducirá la capacidad de estas células de diferenciarse a neuronas caudales-ventrales así como la facultad de extender las neuritas de este tipo de neuronas, posiblemente debido a un incremento en la concentración de LPA y/o S1P.

OBJETIVOS

Estudiar el papel que desempeña LPP3 en el desarrollo de neuronas caudales tal como son las neuronas motoras en un modelo de diferenciación de células troncales embrionarias *in vitro* y *ex vivo*.

Determinar si la deficiencia de LPP3 en células troncales embrionarias generará una proporción distinta de poblaciones neurales diferenciadas.

Conocer si las neuronas diferenciadas de ES $LPP3^{-/-}$ presentarán problemas para lograr el crecimiento de sus neuritas.

Analizar si existen diferencias en los niveles de LPA y S1P de cultivos celulares deficientes de LPP3.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Estrategia experimental.

Dado que los embriones deficientes en LPP3 mueren en etapas tempranas del desarrollo embrionario (E8.5) no es posible determinar el efecto de la mutación de esta enzima en el desarrollo del sistema nervioso. En este trabajo utilizamos la diferenciación de células troncales embrionarias como un modelo de diferenciación al linaje neural, mediante un protocolo de diferenciación bien definido (Wichterle et al., 2002), el cual nos permitió estudiar el efecto de la mutación de LPP3 en la generación de estas neuronas caudales-ventrales.

Cultivo y diferenciación de las células troncales embrionarias.

La línea de células troncales embrionarias que se utilizó en este trabajo como control (Wt) fue la línea W9.5, mientras que la línea de ES deficientes en LPP3 fue establecida por la Dra. Diana Escalante Alcalde a partir de blastocistos *Lpp3*^{-/-} (Escalante-Alcalde et al., 2003). Ambas líneas celulares fueron electroporadas con un vector que expresa la proteína verde fluorescente bajo el control transcripcional del promotor del gen *HB9* (*HB9::EGFP*), con la finalidad de tener un sistema reportero de la diferenciación a neuronas motoras (Wichterle et al., 2002). Las células fueron además electroporadas con un vector que confiere resistencia a Higromicina (*PGK-hygromycin*), por lo que se seleccionaron primero las células por su resistencia a Higromicina B, y después se buscaron clonas con la integración del gen *EGFP* mediante PCR de ADN genómico. La funcionalidad de la construcción reportera en las clonas seleccionadas se analizó al someterlas al protocolo de diferenciación que se describe a continuación, el cual promueve la diferenciación de MN a partir de ES. Solo se trabajó con líneas que expresaron la EGFP de manera robusta.

Las células troncales embrionarias fueron expandidas sobre fibroblastos embrionarios murinos inactivados mitóticamente con mitomicina-C, en medio de cultivo DMEM con alta glucosa suplementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 2mM de GlutaMax, 1mM de piruvato de sodio, 50 Unidades/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomina, 0.1mM de 2-mercaptoethanol y 15% de suero fetal bovino (SFB) probado para el cultivo de ES.

Para la diferenciación de las ES, estas fueron crecidas hasta el 80% de confluencia, una vez en este punto las células fueron tripsinizadas y cultivadas en suspensión en cajas bacteriológicas con la finalidad de inducir la formación de cuerpos embrionarios (EBs). Éstos fueron cultivados en medio de diferenciación DNFK, el cual está constituido por: medio de cultivo DMEM:F12 y medio neurobasal (1:1), suplementado con 0.1 mM de 2-mercaptoethanol, 2mM de GlutaMax, 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y 10 % de remplazo de suero knockout. Después de 2 días de cultivo, el medio DNFK fue suplementado con 2 µM de ácido retinoico y los EBs fueron crecidos en estas condiciones durante 4 días más para inducir la diferenciación neural caudal. Para inducir la diferenciación eficiente hacia MN, además del AR, se agregó al medio de cultivo 100 ng/mL de SHH humano recombinante.

Una vez que los EBs fueron diferenciados según el estadio deseado, estos se tripsinizaron y las células se cultivaron por 24 hrs en cajas de 4 pozos (500,000 células/pozo), las cuales fueron previamente tratadas con 1 µg/mL de laminina, 5 µg/mL de fibronectina y 15 µg/mL de poli-L-ornitina. La cuantificación del número de progenitores neurales se evaluó al día 4 de diferenciación (2 días de tratamiento con AR) y el análisis de neuronas jóvenes así como de MN se realizó al día 6 de diferenciación (4 días de tratamiento con AR, Figura 8).

En algunos ensayos se emplearon los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas: 1 µM de N,N-Dimetilesefingosina, 2 µM de Q-VD-OPH y 0.1-10 µM de D-eritro-dihidro-esfingosina-1-fosfato. En todos estos casos las drogas fueron adicionadas al medio desde el inicio de la formación de los cuerpos embrionarios. Mientras que en los siguientes casos, 50 µM de Y27632 o 10 µM de

LY294002 fueron agregados durante 24 hrs, después de la disociación de los cuerpos embrionarios.

Para la formación de cuerpos embrionarios por gota colgante, las ES fueron disociadas y sembradas durante una hora en cajas tratadas con 0.1% de gelatina, con la finalidad de separar los fibroblastos de las ES. Una vez que los fibroblastos se adherieron a la caja, las células troncales en suspensión fueron recolectadas y diluidas a una concentración de 20,000 células/mL en medio DNFK. A partir de esta suspensión, se depositaron gotas de 20 μ L en la tapa de una caja bacteriológica de 10 mm, la cual fue volteada cuidadosamente con la finalidad de que las células en las gotas formen los EBs por medio de la gravedad, finalmente se agregaron 5 mL de medio DNFK a la base de la caja para evitar la evaporación de las gotas. Este método permite formar EBs de tamaño homogéneo, con el cual pudimos hacer comparaciones de la cinética de crecimiento de los EBs de ambos genotipos en las diferentes condiciones estudiadas. Después de dos días en cultivo en gota colgante, los EBs fueron colectados y cultivados en suspensión de la manera que se describió anteriormente.

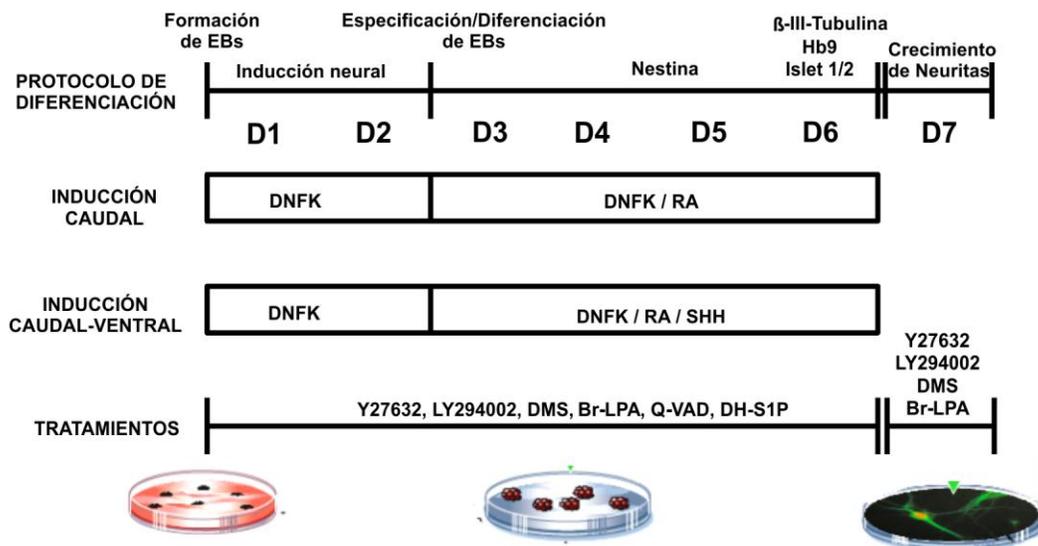


Figura 8. Protocolo de diferenciación de ES a neuronas caudales-ventrales. Una vez que las ES son diferenciadas a cuerpos embrionarios (EBs) durante los distintos días de cultivo (D) se representan los medios así como los fármacos usados y marcadores analizados en cada una de las etapas experimentales. Al día 2 se analizó la población de progenitores neurales, al día 6 la población de neuronas jóvenes y motoneuronas, mientras que al día 7 se estudió el crecimiento de neuritas.

Inmunofluorescencias.

Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, después fueron fijadas con paraformaldéhidro al 4% durante 5 minutos, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1X y subsecuentemente se incubaron con solución de bloqueo (0.1% de tritón X-100 y 1% de SFB diluidos en PBS 1X) por 20 min. Las células fueron incubadas durante toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo a 4°C. Una vez más se realizaron 3 lavados con PBS 1X y después se incubaron las células 1 hora con el anticuerpo secundario (1:500, Alexa-fluor, Invitrogen) diluido en solución de bloqueo. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se tiñeron los núcleos con una solución 1 µg/mL de DAPI por 10 minutos, después de lo cual se realizaron los últimos lavados para la visualización en un microscopio de epifluorescencia. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron: anti-nestina (1:100; ratón; Chemicon), anti-fosfo-histona H3 (1:100; conejo; Cell Signaling), anti-β-III-tubulina (1:500; Sigma), Islet 1/2 (Sobrenadantes 39.4D5 y 40.2D6 1:1, ratón; Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-α-actina de músculo liso (1:200; ratón; Oncogene).

Ensayos de diferenciación en cultivo de explantes de embriones.

Los cuerpos embrionarios se prepararon como se describió previamente, y después del segundo día de diferenciación, fueron incubados con tripsina al 0.25% a 37°C durante 10 min, se agregó medio DMEM con 10% de SFB y las células fueron disociadas de una manera suave hasta lograr una suspensión homogénea. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 min y se resuspendieron en 20 µL de medio DNFK. Esta suspensión se aplicó sobre el tubo neural abierto a nivel de las extremidades anteriores de un embrión de ratón de estadio 10.5. Los explantes de tubo neural fueron cultivados sobre membranas semi-permeables de policarbonato que se mantenían flotando sobre medio DNFK. Se permitió la adhesión de las células a los explantes durante 12 hrs, después de lo cual los explantes junto con las células implantadas se embebieron en una matriz de

colágena I (Colágena I de rata 100 μ L, 10 μ L de NaCl 1.5M, 10 μ L de NaHCO₃ 7.5% y 300 μ L de medio de explante). El gel formado se cubrió con medio de explante el cual está constituido por: medio Optimem (72% v/v), medio DMEM:F12 (25% v/v), Glucosa 2M (2% v/v), GlutaMax 2 mM, 50 Unidades/mL de penicilina y 50 μ g/mL de streptomycin.

Análisis de los datos.

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de manera independiente. En los análisis donde se compararon más de 2 poblaciones se empleó ANOVA junto con Tukey como prueba *pos hoc*, mientras que cuando se compararon solo 2 grupos en el estudio se realizó una *t* de student. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 y los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como diferencias significativas entre las muestras. El porcentaje de área positiva a β -III-tubulina así como los cálculos del área de los EBs fueron realizados con el programa Image J. Por su parte, el cálculo del porcentaje del número de células positivas para cada marcador se realizó mediante el conteo de al menos 5 campos por cada experimento.

Ensayos de western blot.

Los cuerpos embrionarios fueron homogenizados con buffer de lisis (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 150mM de NaCl, 1% de NP40) suplementado con inhibidor de proteasas (1mM de NaVO₄) e inhibidor de fosfatasa (10mM de NaF). 80 μ g de proteína se corrieron en un gel de poli-acrilamida al 10% (SDS-PAGE) y subsecuentemente transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas e incubadas con los anticuerpos primarios y secundarios adecuados, para revelar las membranas con el sistema ECL. Los análisis de densitometría se llevaron a cabo mediante el software Image J. Los datos fueron normalizados contra GAPDH.

Cuantificación de Glicero- y Esfingo-fosfolípidos por Cromatografía líquida de alta presión y Espectrometría de masas en Tandem.

Los lípidos fueron extraídos del medio condicionado donde se cultivaron los EBs al segundo día de cultivo con AR. Se adicionaron 50 pmol de LPA C17 como un estándar y control de recuperación de los lípidos a cada una de las muestras. Las muestras (100 μ L de cada grupo experimental) se disolvieron en MeOH:CHCl₃ (2:1), después se agregaron 500 μ L de HCL 0.1 M, la mezcla final se agitó en el vórtex durante 5 minutos. Las mezclas se centrifugaron por 10 minutos a 3000 x g, se recuperó la fase inferior evitando tomar la proteína que se acumula en la interfase. Las muestras fueron evaporadas hasta secarse con un flujo de nitrógeno gaseoso, para después ser analizadas por HPLC y espectrometría de masas en tándem para estudiar los niveles de AP, LPA y S1P, los cuales fueron normalizados respecto a la cantidad de LPA C17 recuperado, mientras que las concentraciones y su detección se obtuvieron mediante el uso de estándares sintéticos para cada lípido, estos ensayos se realizaron en 5 muestras independientes. La cuantificación se realizó en el laboratorio del Dr. Andrew J. Morris, en la Universidad de Kentucky, USA.

RESULTADOS.

La ausencia de LPP3 reduce la diferenciación a precursores neurales y neuronas espinales a partir de ES.

Como se mencionó anteriormente, LPP3 se expresa en zonas ventrales del tubo neural entre E8.5-12.5. En particular en E12.5 la enzima se expresa en los dominios de las neuronas motoras además de en la zona subventricular del tubo neural, lugar donde proliferan los precursores neurales. La inactivación tejida específica de *Lpp3* en el sistema nervioso, mediante la cruce de un alelo condicional de este gen con el ratón transgénico *Nestina-Cre* (Escalante-Alcalde et al., 2007; Lopez-Juarez et al., 2011), no mostró defecto alguno en la formación temprana del sistema nervioso. Este resultado se debió presumiblemente a la activación tardía del promotor de *Nestina* en dicha línea transgénica (E11) (Chen et al., 2006). Por tal motivo resulto interesante estudiar el efecto de la inactivación del gen que codifica para la LPP3 (*Ppap2b/Lpp3*) en precursores neurales empleando otras estrategias experimentales.

En el presente trabajo analizamos el papel de LPP3 en el desarrollo temprano del sistema nervioso, usando como modelo de estudio la diferenciación de células troncales embrionarias deficientes en LPP3 (*Lpp3^{-/-}*). Estas, al igual que las ES silvestres, fueron diferenciadas a neuronas espinales empleando un protocolo muy bien establecido que consiste en la formación de cuerpos embrionarios en un medio de diferenciación neural y la adición de AR y SHH (Wichterle et al., 2002) (Figura 8).

Con la única finalidad de corroborar que las células mutantes en LPP3 con las que trabajamos no presentaran expresión de esta proteína, se realizaron WB contra LPP3 de los extractos proteicos obtenidos de nuestros cultivos, lo que demostró que la enzima LPP3 está ausente en estos cultivos (Figura 9).

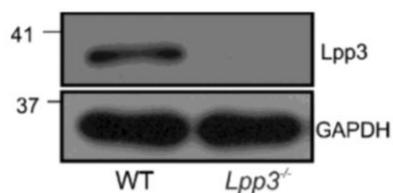


Figura 9. Las células troncales embrionarias LPP3^{-/-} usadas en este trabajo no expresan esta proteína Western blot donde se observa la ausencia de la proteína LPP3 en cuerpos embrionarios diferenciados a partir de ES *Lpp3^{-/-}*, GAPDH fue utilizado como control de carga.

Para conocer si la mutación de LPP3 tenía un efecto sobre la diferenciación de las ES hacia el linaje neural, nos dimos a la tarea de analizar la formación de precursores neurales identificados por la expresión de nestina, ya que esta población es el primer grupo de células que aparecen durante el desarrollo neural. Para tal propósito, los EBs silvestres y mutantes cultivados durante 2 días con AR, fueron disociados y las células fueron sembradas en cajas de 4 pozos para realizar inmunofluorescencias contra nestina. Como se puede observar en la figura 10A los cultivos de células LPP3^{-/-} mostraron menor presencia de células nestina positivas, lo cual fue cuantificado mediante conteos celulares y se representa en la figura 10B. Con la finalidad de utilizar diferentes metodologías que validaran nuestros hallazgos, obtuvimos extractos proteicos de nuestros cultivos y realizamos Western blot para detectar Sox1 y N-cadherina, ya que estos son marcadores de neuroectodermo (Kamiya et al., 2011). En la Figura 10C se muestra como la población deficiente en LPP3 tiene una menor expresión de ambos marcadores, lo cual se cuantificó mediante densitometría (Figura 10D). Dado que esta reducción en el número de progenitores neurales podría deberse a una reducción en la proliferación celular, se hicieron dobles inmunotinciones para conocer qué proporción de las células nestina positivas eran positivas a un marcador de proliferación (Fosfo-Histona-H3). Se encontró que la proliferación de los progenitores neurales LPP3^{-/-} es reducida con respecto al grupo control, lo cual se observa en la figura 10A y se grafica en 10E.

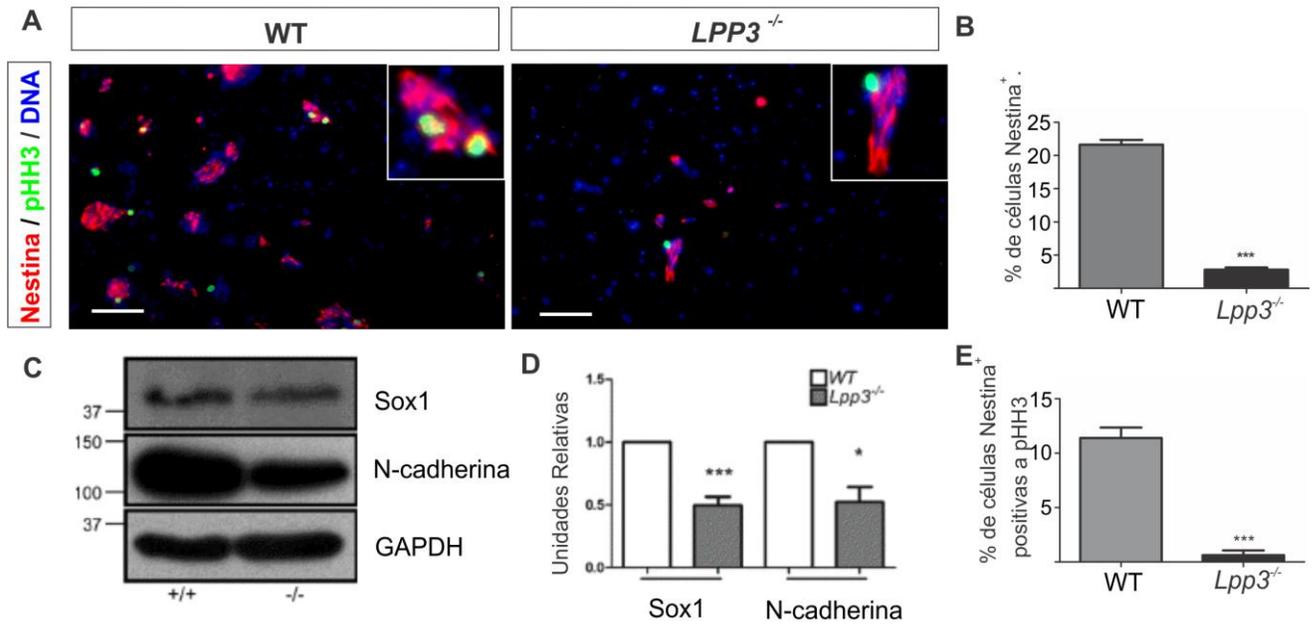


Figura 10. La deficiencia en *Lpp3* ocasiona una reducción en la formación de progenitores neurales. **A.** Inmunofluorescencias contra nestina (rojo) y fosfo-histona-H3 (verde) en donde se puede apreciar la menor cantidad de progenitores neurales en los cultivos deficientes de *LPP3*, los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI (azul) **B.** En esta gráfica se muestra la cuantificación de células positivas para nestina en los cultivos celulares. **C.** Muestra los Western blots para marcadores de neuroectodermo Sox1 y N-cadherina, GAPDH fue usado como control de carga. **D.** Cuantificación por densitometría de los marcadores mencionados en C. **E.** Porcentaje de células positivas a nestina que co-localizaron con fosfo-histona-H3. Las barras de escala corresponden a 100 μ m. * $p=0.02$, *** $p=0.0004$.

Dado este decremento en la cantidad de progenitores neurales, fue importante estudiar si la mutación nula de *Lpp3* también afectaba el número de neuronas jóvenes diferenciadas bajo el protocolo mencionado anteriormente. Para determinar lo anterior, se realizaron inmunofluorescencias contra β -III-tubulina. En la figura 11A se observa como las ES *Lpp3*^{-/-} se diferenciaron en una proporción menor de neuronas jóvenes, las cuales además no mostraban el crecimiento adecuado de sus neuritas. El porcentaje de neuronas jóvenes fue obtenido mediante la cuantificación de células en diferentes campos (Figura 11B). Los resultados obtenidos demuestran que la ausencia de LPP3 en ES reduce la diferenciación tanto de progenitores neurales como de neuronas jóvenes.

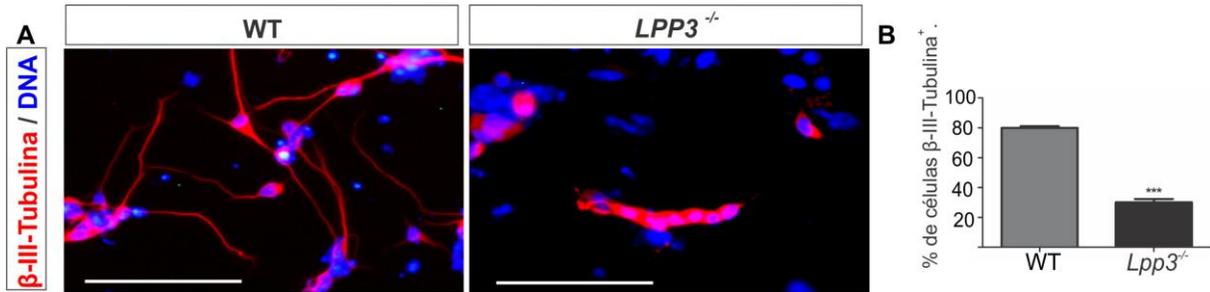


Figura 11. La ausencia de LPP3 disminuye el potencial de ES para diferenciar neuronas jóvenes. **A.** Se observan inmunofluorescencias contra β -III-tubulina donde las células mutantes en LPP3 presentaron menos células positivas a este marcador. **B.** En la gráfica se muestra la cuantificación de células β -III-tubulina positivas en los cultivos celulares. ***p=0.0005.

La ausencia de Lpp3 también produce una reducción en la cantidad de neuronas diferenciadas en la formación de teratomas.

Con la finalidad de evaluar nuestros resultados empleando otro sistema de diferenciación, se indujo la formación de teratomas al inyectar ES silvestres o mutantes en ratones atímicos. Los análisis histopatológicos (Laboratorio de Patología e Histotecnología, NCI-Frederick, MD, USA) reportaron que los teratomas formados por las células *Lpp3*^{-/-} eran significativamente más pequeños con respecto a los silvestres, además de presentar una reducción importante en la cantidad de tejido neural diferenciado. Para conocer la proporción de tejido neural formada en estos teratomas se realizó la inmunodetección de tejido positivo a β -III-tubulina. Las figuras 12A y B muestran cortes representativos de estos teratomas y la cuantificación del porcentaje de tejido positivo a β -III-tubulina, el cual demostró una reducción del 75% de tejido neuronal en los teratomas deficientes en LPP3 con respecto a los silvestres. Este resultado concuerda con los anteriores en donde se mostró que la ausencia de LPP3 disminuye la capacidad de las ES de formar tejido nervioso *in vitro*. Es importante mencionar que la diferenciación de las células troncales en los ratones atímicos se da de manera espontánea y sin agregar factores que promuevan la diferenciación, por lo tanto podemos decir que las células LPP3^{-/-} tienen afectada su capacidad de diferenciación a tejido neural.

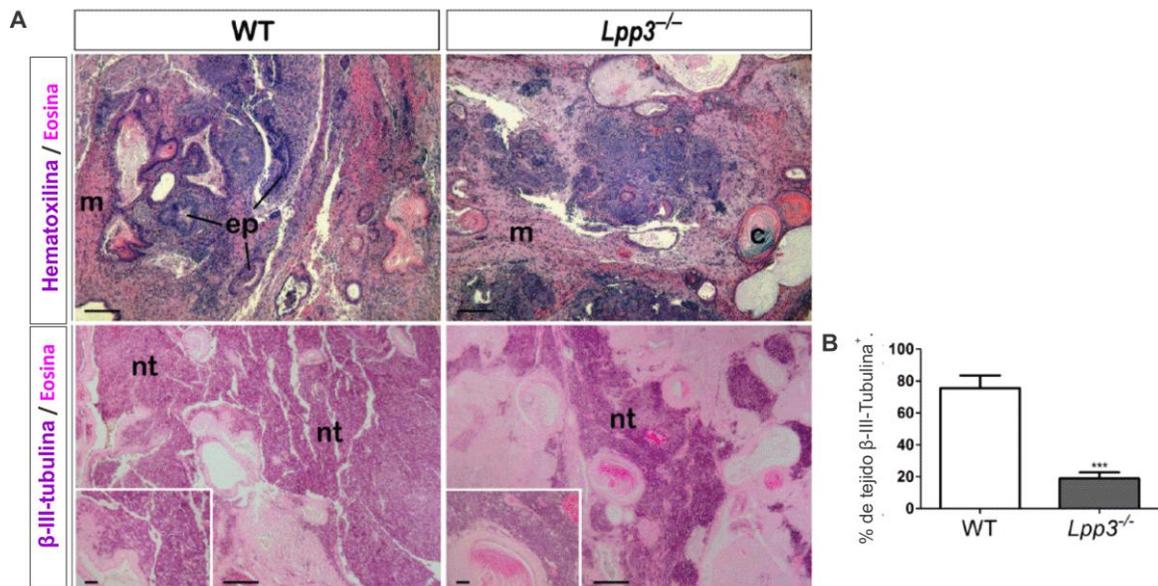


Figura 12. Los teratomas formados por ES *Lpp3*^{-/-} diferencian una menor proporción de tejido neuronal. **A.** En la parte superior se representan cortes histológicos de los teratomas silvestres y mutantes teñidos con hematoxilina y eosina; en la parte inferior se muestran inmunohistoquímicas contra β-III-tubulina contrateñidas con eosina, donde se nota que la proporción purpura (tejido neuronal) es menor en los teratomas sin LPP3. c. cartílago; ep. epitelio; m. músculo; nt. tejido neuronal. **B.** Gráfica que muestra el porcentaje de tejido neuronal encontrado en los teratomas. Cuantificación de la superficie del corte positivo al marcador neuronal, mediante el programa Image J. *** p=0.0001. Las barras de escala en los paneles principales corresponden a 200 μm y en los recuadros a 20 μm.

La reducción en la proporción de progenitores neurales en las células deficientes en LPP3 podría estar ocasionada por distintas razones tales como: una reducción en la tasa de proliferación de los precursores neurales, un incremento en la muerte celular de este linaje en particular, la diferenciación prematura de estos precursores o la diferenciación preferencial a otros linajes celulares distintos al neural. Por tal motivo nos dimos a la tarea de evaluar si alguna de las posibilidades anteriores estaba implicada en causar el fenotipo observado en las células deficientes en esta enzima.

La deficiencia de LPP3 afecta la proliferación celular.

Como ya se menciona anteriormente, para estudiar si la mutación afecta la proliferación celular en la población neural, se realizaron marcajes contra nestina y fosfo-histona-H3. Los progenitores neurales carentes de LPP3 mostraron una reducción en la proporción de células positivas al marcador de proliferación (Figura 10A y E). Este efecto no fue exclusivo de los progenitores neurales ya que al cuantificar el número de células totales (no solo células positivas a nestina) positivas para la fosfo-histona-H3 también se observó una reducción en la tasa de proliferación de células *Lpp3*^{-/-} (Figura 13A). Este último resultado fue corroborado mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada, observándose una reducción en la incorporación de timidina de alrededor del 50% en las células deficientes en LPP3 (Figura 13B). Estos datos demuestran que la ausencia de LPP3 afecta de manera importante la proliferación de linajes neurales pero también otra proporción de células cuya identidad celular se desconoce.

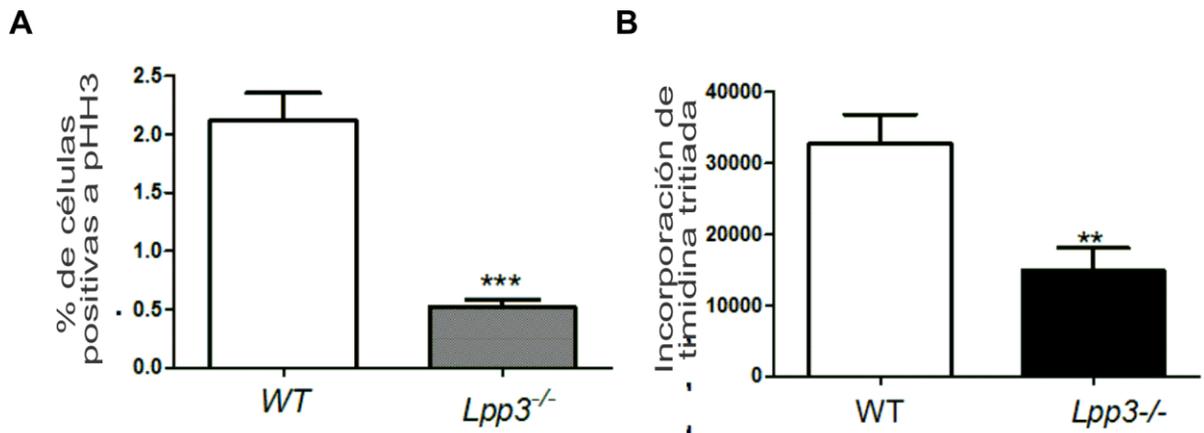


Figura 13. La ausencia de LPP3 disminuye la proliferación celular de ES diferenciadas a los 2 días con AR. **A.** Porcentaje de células positivas a fosfo-histona-H3 a los dos días de tratamiento con AR, lo que demuestra que la pérdida de LPP3 en las ES diferenciadas repercute en este proceso celular. **B.** Gráfica que muestra la incorporación de timidina tritiada en EBs silvestres y mutantes a los 2 días de tratamiento con AR, lo que apoya nuestros resultados obtenidos mediante inmunohistoquímicas. ** p=0.001, ***p=0.0001

Los EBs formados a partir de células carentes de LPP3 disminuyen su crecimiento debido a un aumento de muerte celular por apoptosis.

Durante el proceso de diferenciación se observó que los cuerpos embrionarios deficientes en LPP3 eran de menor tamaño. Para controlar de mejor manera la formación de los EBs y estudiar su cinética de crecimiento, estos fueron preparados por el método de la gota colgante con la finalidad de generar cuerpos embrionarios de tamaño homogéneo y así poder comparar su crecimiento (ver material y métodos). Empleando esta estrategia experimental se observó una reducción evidente en el crecimiento de los EBs *Lpp3^{-/-}* a partir del tercer día de diferenciación. Este efecto se vio más acentuado para el sexto día, donde los EBs mutantes mostraron una reducción del 60% con respecto al tamaño de los EBs silvestres. Adicionalmente cuando los cuerpos embrionarios fueron teñidos con azul tripán, se observó que una gran parte de las células en su superficie se encontraban muertas. Estas observaciones pusieron de manifiesto que la reducción en el tamaño de los EBs deficientes en LPP3 no solo se debía a la reducción en la proliferación detectada sino a un incremento en la muerte celular por apoptosis, ya que cuando se agrega un inhibidor general de caspasas, se recupera parcialmente el crecimiento de estos cuerpos embrionarios (Figura 14A y B).

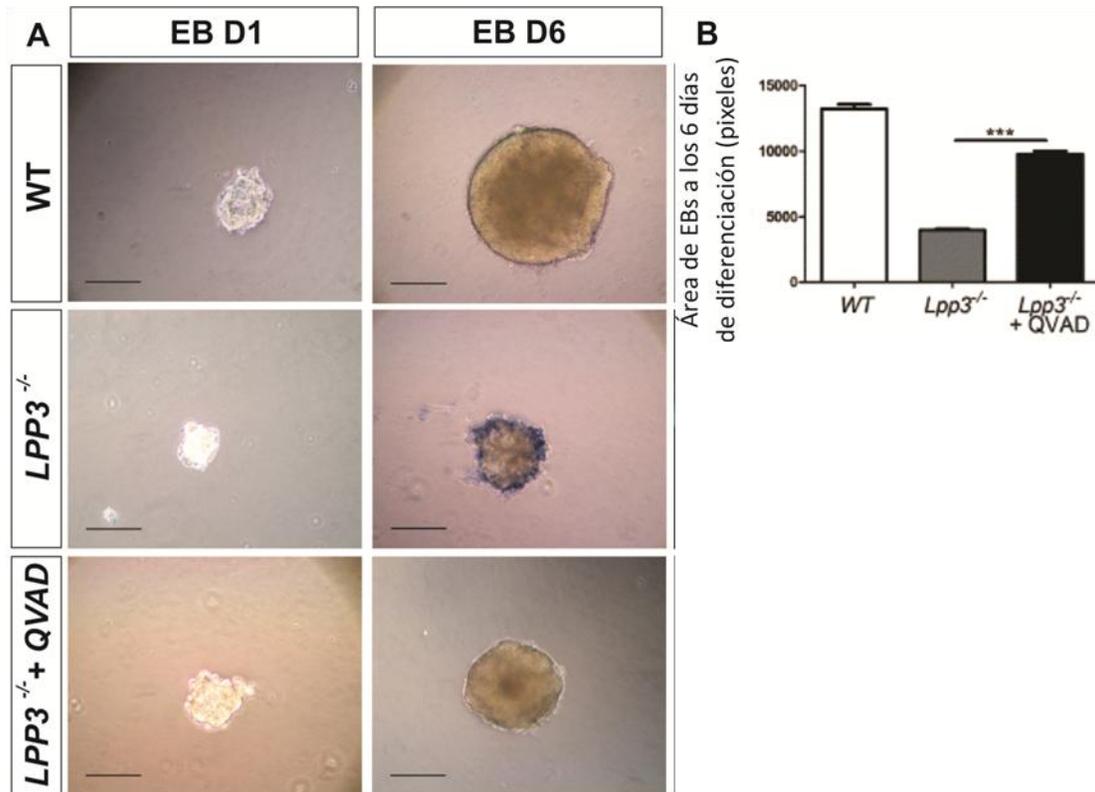


Figura 14. Los EBs LPP3^{-/-} no muestran crecimiento debido a un aumento de apoptosis. **A.** De derecha a izquierda aparecen EBs en el día 1 de diferenciación por gota colgante, en la segunda columna se presentan EBs de 6 días de diferenciación teñidos con azul de tripán. **B.** Cuantificación del área de los EBs formados por gota colgante en el diámetro máximo alcanzado. Las barras de escala corresponde a 500 μ m.

Además de las tinciones con azul tripán realizamos ensayos de TUNEL para observar si la muerte por apoptosis era parte del fenotipo causado por la mutación en LPP3. Los resultados mostraron que las células sin LPP3 presentaron mayor cantidad de tejido positivo a TUNEL, la cuantificación de este tejido en este ensayo (mediante el programa "Image J") confirma que el tratamiento con el inhibidor de caspasas (QVAD) disminuye la proporción de células TUNEL positivas (Figura 15A y B). Este resultado fue apoyado por el incremento de caspasa-3 activa, observada en extractos de proteínas de los EBs deficientes en LPP3 (Figura 15C).

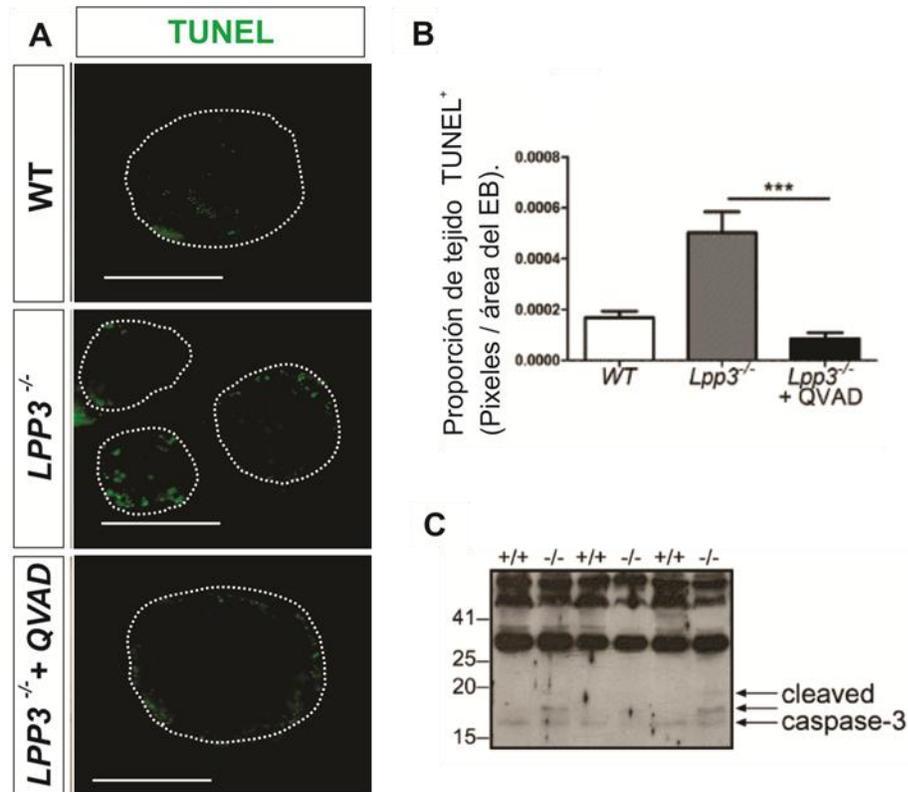


Figura 15. Los EBs *LPP3*^{-/-} exhiben un incremento de apoptosis. **A.** Ensayos de TUNEL en los EBs, las células positivas se muestran en verde, las líneas punteadas reflejan el contorno de los cuerpos embrionarios. **B.** La gráfica muestra la proporción de tejido positivo a TUNEL en cada condición. **C.** Western blot donde se observa el corte de caspasa 3 para iniciar la apoptosis en células silvestres y deficientes de *LPP3*. Las barras de escala corresponde a 500 μ m.

El Inhibidor de caspasas aumenta la proporción de neuronas diferenciadas de ES *LPP3*^{-/-}.

Para determinar si la reducción de neuronas diferenciadas en nuestros cultivos deficientes en *LPP3* se debía a un aumento en la apoptosis de estas células, se agregó a los cultivos de células mutantes el inhibidor general de caspasas desde el primer día de diferenciación. Se observó que el tratamiento con QVAD recuperó modestamente la proporción de neuronas jóvenes *LPP3*^{-/-}, el porcentaje de células β -III-tubulina positivas se obtuvo mediante el conteo de células positivas a este marcador en distintos campos de ensayos independientes (Figuras 16A y B).

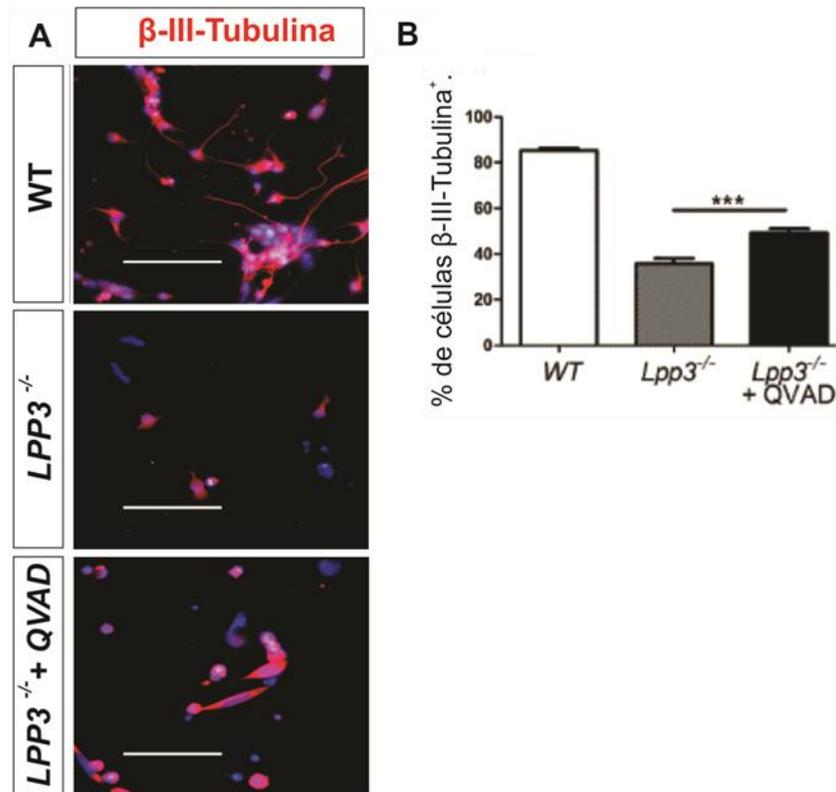


Figura 16. Las reducción de neuronas LPP3^{-/-} se debe parcialmente al incremento en la muerte celular. A. Se muestran inmunofluorescencias para βIII-tubulina en distintas condiciones. **B.** La gráfica muestra el porcentaje de neuronas diferenciadas. Las barras de escala corresponde a 100 μm.

En conjunto los resultados anteriores muestran que la ausencia de LPP3 en nuestros cultivos reduce el crecimiento de EBs mediante y la formación de neuronas jóvenes mediante un aumento en la apoptosis celular.

El aumento de muerte celular en los EBs LPP3^{-/-} no se debe a la susceptibilidad de estas células al Ácido retinoico.

El Ácido retinoico es importante para inducir la diferenciación de las ES a linaje neural-caudal, sin embargo también se ha descrito que altas concentraciones de este morfógeno puede inducir la muerte celular. Para asegurarnos que las células deficientes en LPP3 no fueran sensibles al tratamiento por AR y el fenotipo observado se debiera a una menor resistencia de

las células al AR, se realizó un control de diferenciación de las células LPP3^{-/-} sin agregar AR pero utilizando los mismos medios y metodologías de diferenciación. Este incremento en la muerte celular y reducción en el crecimiento de los EBs mutantes no se debió a la combinación de la adición de AR en el medio ya que aún sin este compuesto, los EBs mostraron las mismas características por lo que este fenotipo es únicamente causado por la mutación (Figura 17).



Figura 17. El incremento en la muerte celular y la reducción en el crecimiento de los cuerpos embrionarios deficientes en LPP3 no se debe al tratamiento con AR. Cuerpos embrionarios formados por gota colgante fueron cultivados con o sin tratamiento de AR y teñidos con azul tripán al sexto día de cultivo, no se observó una mejora en el crecimiento de los EBs mutantes en LPP3 sin el tratamiento con AR. Barra de escala 500µm.

Las vías de ROCK y PI3K no son responsables de la reducción en el crecimiento de los EBs deficientes en LPP3.

Dado que en trabajos previos los inhibidores de PI3K (LY294002) y de ROCK (Y27632) han demostrado un rescate en el crecimiento de neuroesferas causado por altas dosis de LPA, investigamos si estas vías activadas tanto por LPA como por S1P podrían ser las responsables de la reducción en el crecimiento de los EBs. Por tal motivo, probamos si alguno de estos fármacos pudiera tener efectos similares en nuestro sistema de diferenciación. Las figuras 18A y 18B muestran las diferencias de crecimiento de los EBs a los días 1 y 6 de diferenciación, ninguno de los fármacos por separado o en combinación tuvo efecto en el rescate del crecimiento de los EBs (Figura 18).

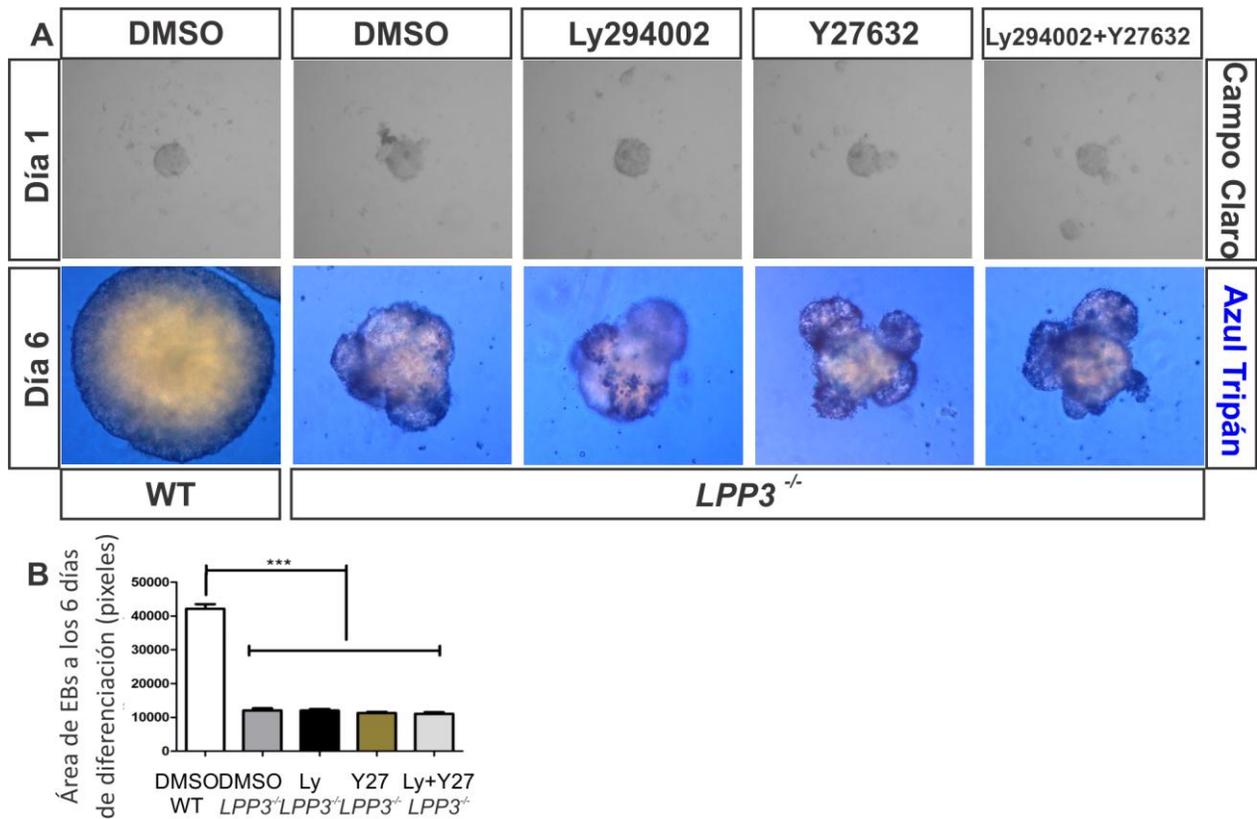


Figura 18. El tratamiento con inhibidores de PI3K y ROCK no mejora el crecimiento de los EBs *Lpp3*^{-/-}. **A.** Los EBs fueron diferenciados en gotas colgantes en presencia o ausencia de los inhibidores, en la parte superior se muestran los EBs en el primer día de diferenciación, mientras que en la parte inferior se representan al sexto día del mismo protocolo. **B.** Cuantificación del área promedio de los EBs al sexto día de diferenciación. ***p=0.0001.

La mutación en LPP3 induce la diferenciación de espontanea de ES a células positivas a actina de músculo liso.

La predisposición de las ES *LPP3*^{-/-} a diferenciarse a un linaje distinto al neural, puede ser otra explicación por la cual estas células no generen la misma proporción de neuronas como lo hacen las células silvestres. Resultados previos en el laboratorio señalaron que las ES mutantes en *Lpp3*, cuando se sometieron a un protocolo de diferenciación a linajes vasculares (células edoteliales y pericitos), presentaron una preferencia por diferenciarse a pericitos (células positivas a actina de músculo liso) aún sin agregar factores de crecimiento que inducen esta

diferenciación (Datos no publicados). Por este motivo exploramos la presencia de este linaje celular en nuestros cultivos mediante inmunofluorescencias contra α -SMA. Se encontró que las células que carecen de LPP3 presentaron un alto porcentaje de células positivas a este marcador (19A, C y E). Previamente se había descrito que la S1P promueve la diferenciación de cardiomiocitos a partir de células troncales embrionarias, los cuales expresan transitoriamente actina de músculo liso (Sachinidis et al., 2003a). Para conocer si S1P era responsable de este fenotipo decidimos inhibir las vías de síntesis de S1P con inhibidores de cinasas de esfingosina y analizar el efecto de estos fármacos en los fenotipos causados por la mutación.

Al agregar el inhibidor de las cinasas de esfingosina N,N-dimetil-esfingosina en bajas concentraciones (1 μ M de DMS) se encontró un aumento significativo en la cantidad de neuronas jóvenes y una disminución de células positivas a α -SMA (Figura 19A-E). Este resultado sugirió que un aumento en la concentración de alguna base esfingoidea fosforilada debido a la ausencia de LPP3, está relacionado con la aparición de células que expresan actina de músculo liso en las ES *Lpp3*^{-/-}, aún cuando estas células se encuentran cultivadas bajo condiciones neuralizantes.

Para determinar si existía una mayor concentración de LPA o S1P liberada al espacio extracelular debido a la mutación en LPP3, tanto el Ácido lisofosfatídico como la Esfingosina-1-fosfato se cuantificaron por espectrometría de masas. Para la medición se utilizó el medio de cultivo de cuerpos embrionarios a los 2 días de tratamiento con AR. De los lípidos analizados no se encontraron diferencias significativas en los niveles de LPA o S1P en medio el condicionado por EBs silvestres y mutantes (datos no mostrados). Sin embargo en los medios de las células *Lpp3*^{-/-} se encontró elevada la dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P, Figura 19F). Probablemente el incremento en concentración de DHS1P pudiera estar afectando la diferenciación de estas células y el crecimiento de los cuerpos embrionarios.

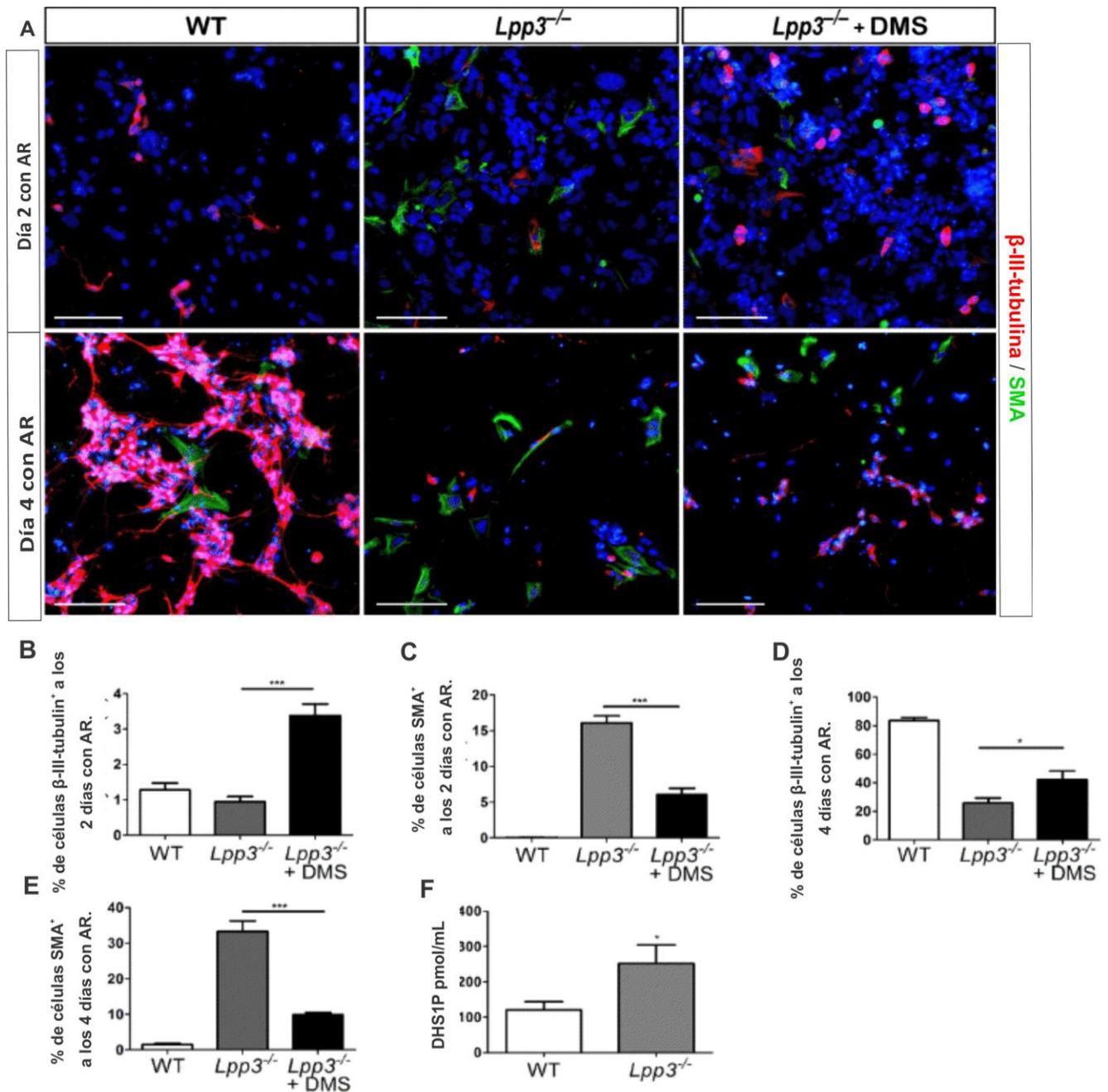


Figura 19. La deficiencia de LPP3 promueve la diferenciación de células positivas a actina de músculo liso, lo cual se revierte parcialmente inhibiendo las cinasas de esfingocina. A. Inmunofluorescencias contra β-III-tubulina o α-SMA a los 2 y 4 días de tratamiento con AR, el tratamiento con DMS incrementa el número de neuronas y disminuye parcialmente el número de células de músculo liso en los cultivos deficientes de LPP3 **B.D.** Cuantificación del porcentaje de células β-III-tubulina positivas a los 2 y 4 días de tratamiento con AR respectivamente. **C. E.** Porcentaje de células positivas a α-SMA a los 2 y 4 días de tratamiento con AR respectivamente. **F.** Análisis de la concentración de DHS1P en el sobrenadante de EBs silvestres y *Lpp3*^{-/-} a los 2 días de tratamiento con AR.

La DHS1P fenocopia el fenotipo de la mutación de LPP3 en células silvestres.

Una vez que se encontró un aumento en DHS1P extracelular, analizamos el efecto que tiene la DHS1P sobre la diferenciación de células troncales embrionarias silvestres, con la finalidad de estudiar si este lípido podía fenocopiar los efectos observados en ausencia de LPP3. La DHS1P a una concentración de 10 μ M afectó el crecimiento de los cuerpos embrionarios y de manera similar a como ocurre en los EBs *Lpp3*^{-/-}, los EBs silvestres presentaron células teñidas con azul tripán en su superficie y tuvieron un modesto pero significativo incremento en el número de células positivas para α -SMA (Figura 20). La fenocopia parcial de los fenotipos mutantes en EBs silvestres por el tratamiento con DHS1P nos sugiere que la acumulación de este lípido debido a la ausencia de actividad de la LPP3 puede ser responsable de los efectos que observamos.

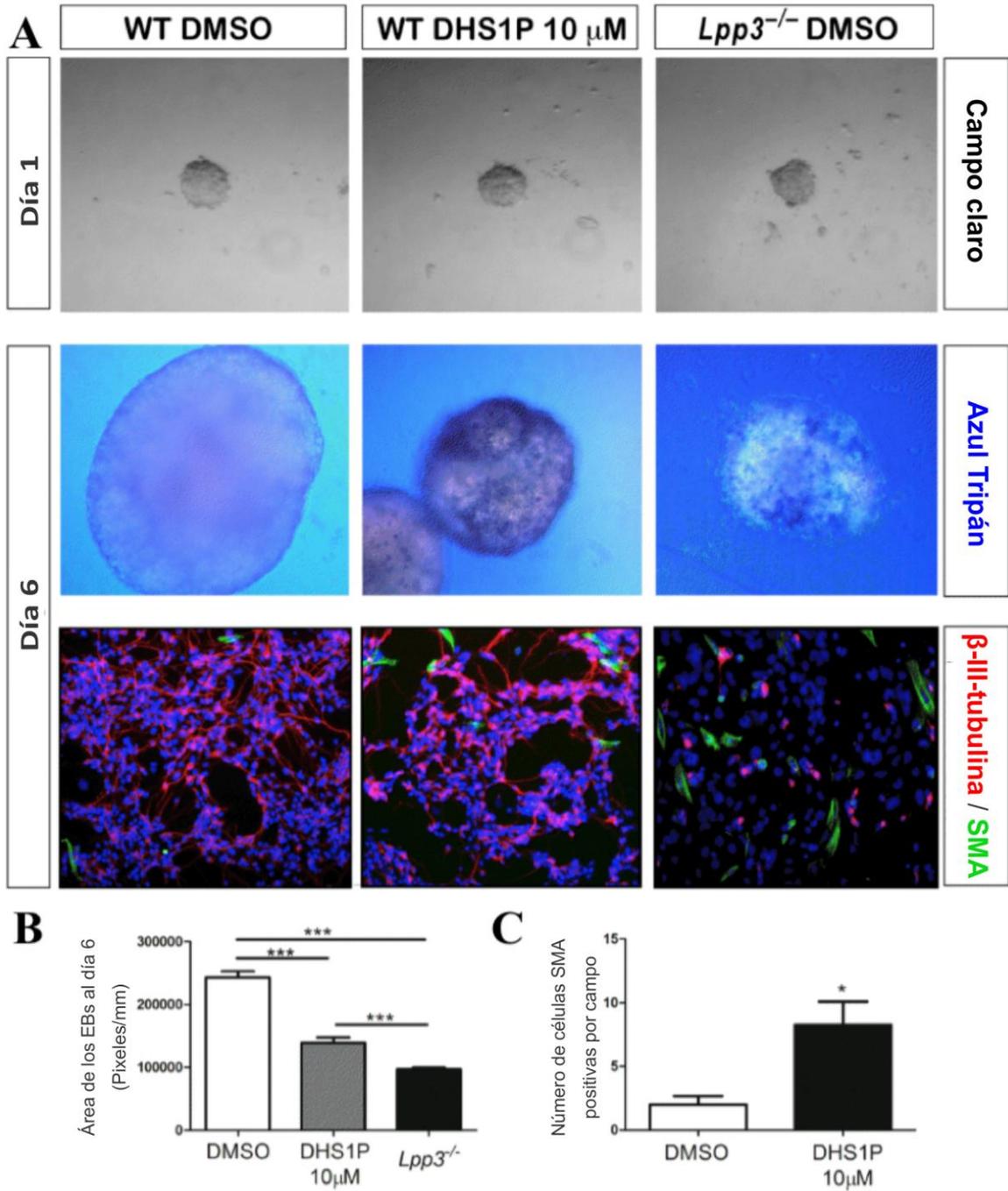


Figura 20. El tratamiento de células silvestres con DHS1P fenocopia parcialmente los defectos causados por la mutación de *Lpp3*. **A.** EBs formados por gota colgante al día 1 (paneles superiores) y 6 de diferenciación fueron teñidos con azul tripán (paneles intermedios) y posteriormente a las células disociadas se les realizó una inmunofluorescencia contra β -III-tubulina y α -SMA (paneles inferiores). Podemos observar como el tratamiento con DHS1P reduce el tamaño de los EBs, además de inducir la diferenciación de células SMA⁺. **B.** Gráfica que muestra el área de los EBs en su diámetro máximo en las diferentes condiciones analizadas. **C.** Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas al marcador actina de músculo liso (SMA).

Los datos presentados anteriormente señalan que en ausencia de LPP3 se eleva la concentración de DHS1P en los sobrenadantes y este lípido es capaz de inducir la diferenciación de las ES a células positivas a actina de músculo liso. En conjunto con los otros resultados se demostró que la reducción en el tamaño de los cuerpos embrionarios y la poca proporción de neuronas que encontramos en células *Lpp3*^{-/-} podría deberse a una combinación de mecanismos como son: la reducción en la proliferación de precursores neurales, un incremento en la muerte celular apoptótica, un incremento en la diferenciación de células que expresan α -SMA y el aumento en la concentración de DHS1P en cultivo.

La ausencia de LPP3 afecta el crecimiento de neuritas pero no afecta el establecimiento de motoneuronas.

Dado que en experimentos previos se observó que la mayoría de las neuronas espinales deficientes en LPP3 diferenciadas no lograron extender sus neuritas o lo hicieron de manera muy limitada (Figura 11A), decidimos estudiar el efecto de la mutación en motoneuronas, ya que la LPP3 se expresa abundantemente en este linaje en particular. Para tal efecto utilizamos ES silvestres y mutantes en LPP3 transfectadas con un vector que expresa a la proteína verde fluorescente bajo el control transcripcional del promotor del factor de transcripción (HB9), el cual está activo en motoneuronas. Para lograr una diferenciación eficiente de motoneuronas se agregó, además del AR, el morfógeno SHH (ver material y métodos). Las motoneuronas diferenciadas se identificaron por la expresión de EGFP y por inmunofluorescencias de otros marcadores de MN como son *Islet 1/2*. Tanto las células silvestres como las mutantes en *Lpp3* lograron diferenciar células que expresaron ambos marcadores de MN, a pesar de esto las células *Lpp3*^{-/-} no lograron extender sus neuritas adecuadamente (Figura 21A).

El tratamiento con inhibidores de ROCK y PI3K rescatan parcialmente la neuritogénesis en las neuronas carentes en LPP3.

Como se mencionó en la introducción, tanto LPA como S1P inducen la retracción de las neuritas por medio de la activación de Rho/ROCK (Dottori et al., 2008; Fukushima and Morita, 2006; Postma et al., 1996). Por tal motivo decidimos analizar si la inhibición de ROCK recupera el crecimiento de las neuritas en las neuronas mutantes en *Lpp3*. El inhibidor de ROCK Y27632 (50 μ M) logró rescatar parcialmente el crecimiento de las neuritas tal como se observa en las figuras 21B y 21C. Este resultado indica que la vía de Rho debe estar sobre activada en las células MN carentes de LPP3.

Por su parte, la PI3K puede cooperar con las ROCK para regular la extensión de los axones y la ramificación de los mismos (Leemhuis et al., 2004), por lo cual estudiamos el efecto del inhibidor de PI3K (LY297002) en nuestro sistema, dicho tratamiento produjo el crecimiento de las neuritas en una porción de las neuronas deficientes en LPP3 tal como puede observarse en las figuras 21B y 21D. Esto sugirió que esta vía también está siendo estimulada por la ausencia de la LPP3. Sin embargo, es importante resaltar que ninguno de los dos inhibidores rescata el fenotipo en su totalidad por lo que la alteración simultánea de estas vías o incluso de otras vías pueden estar siendo afectadas por la mutación.

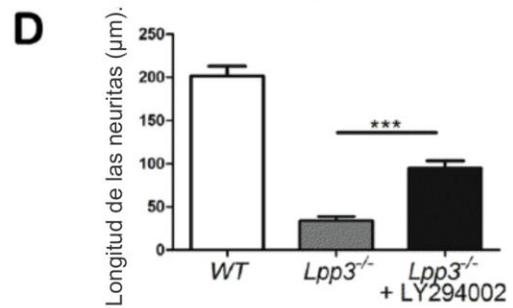
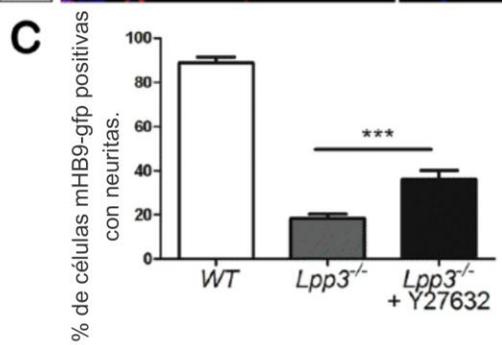
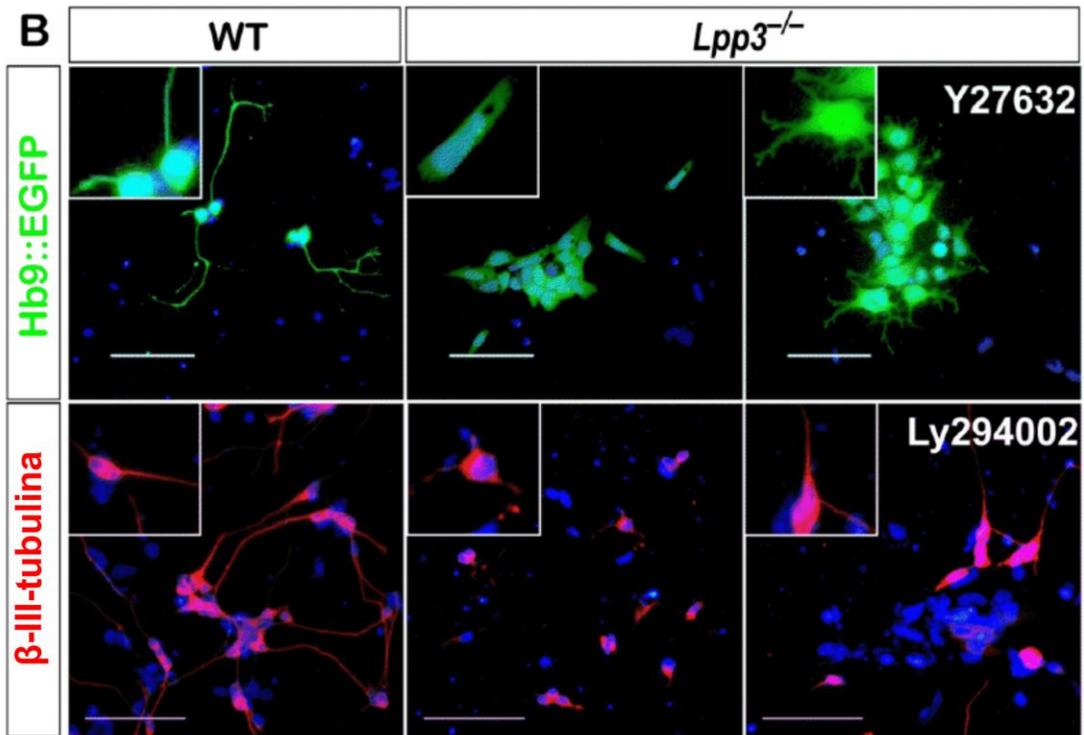
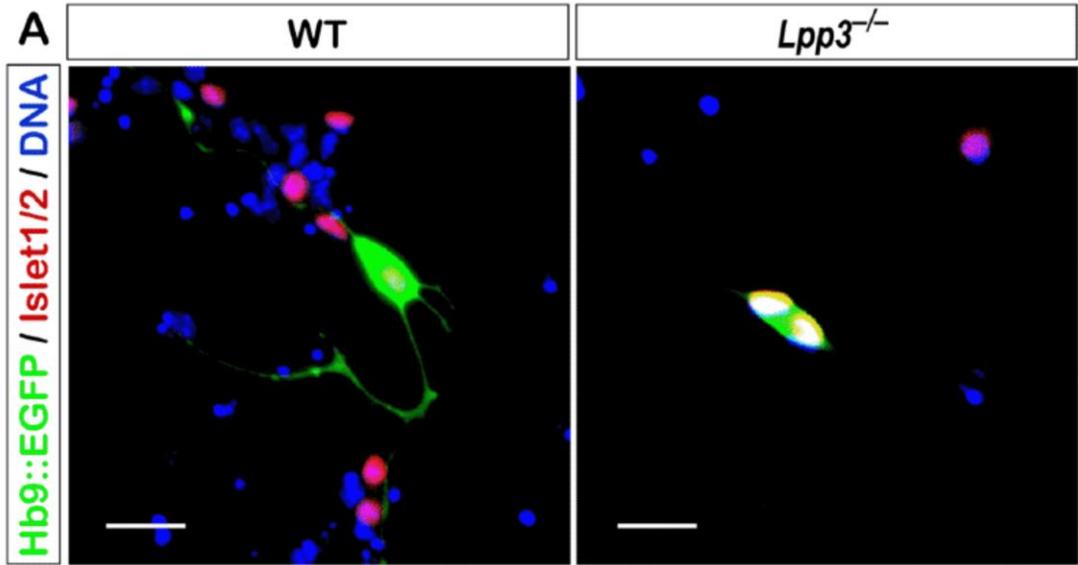


Figura 21. La mutación en LPP3 afecta la elongación de neuritas mediante las vías de Rho y PI3K. **A.** Inmunofluorescencias donde se muestra que tras la diferenciación con AR y Shh, las MN (EGFP, verde) co-expresan Islet 1/2. Se puede observar que la ausencia de LPP3 no evita la expresión de los marcadores de MN, pero sí de la extensión de neuritas. **B.** Neuronas motoras detectadas mediante la expresión de EGFP bajo el promotor de HB9 (verde) y neuronas jóvenes visualizadas por inmunofluorescencias contra β -III-tubulina (rojo) deficientes en *Lpp3* cultivadas con o sin inhibidores de ROCK o de PI3K. **C.** Cuantificación de MN con neuritas. **D.** Cuantificación de la longitud de las neuritas en las neuronas jóvenes diferenciadas. Las barras de escala en A, 20 μ m B, 100 μ m.

Las neuronas carentes de LPP3 diferenciadas en explantes de tubo neural silvestres son incapaces de extender neuritas apropiadamente.

Para tratar de entender si las neuronas deficientes en LPP3 eran capaces de extender sus neuritas en un ambiente que contrarreste la concentración de lípidos extracelulares, diferenciamos los cuerpos embrionarios en explantes de tubo neural (de embriones de ratón silvestres). Tanto las células silvestres como las *Lpp3*^{-/-} lograron diferenciarse a neuronas motoras en el microambiente del tubo neural, sin embargo observamos que la mutación no permitió la apropiada extensión de neuritas aún en este sistema (Figura 22). Esto sugiere que no solo los lípidos extracelulares están participando en la generación del fenotipo de las neuronas deficientes en *Lpp3*, sino que también el balance en la concentración de lípidos intracelulares puede comprometer el crecimiento neurítico.

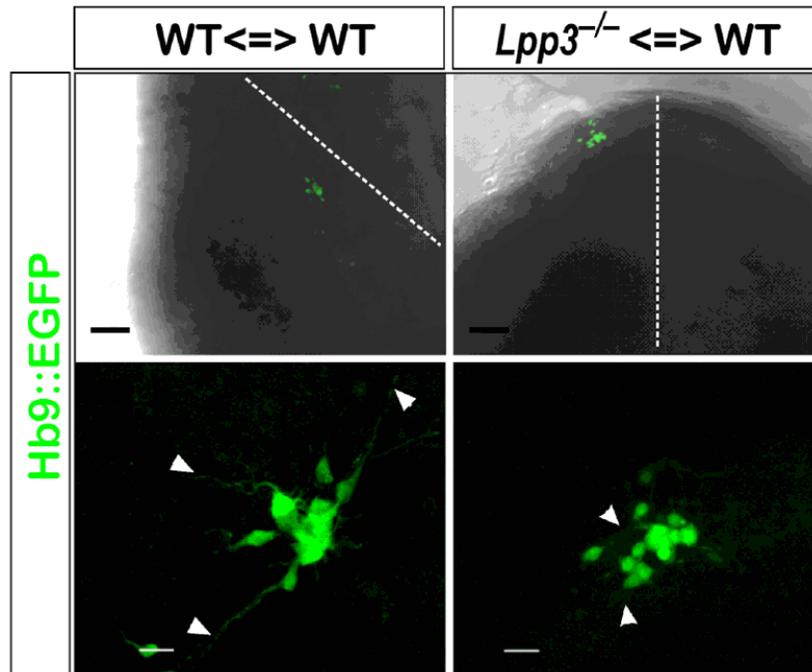


Figura 22. Las ES *Lpp3*^{-/-} logran diferenciar a MN en ensayos *ex vivo*, pero muestran defectos en el crecimiento de sus neuritas. EBs silvestres y mutantes fueron diferenciados en explantes de tubo neural, la línea punteada representa la posición de la línea media del tubo neural. La expresión de EGFP nos indica que estas células tienen activo el promotor de HB9, sin embargo las células *LPP3*^{-/-} no extienden sus neuritas aún en este contexto. Barras de escala de la parte superior 100 μ m, de la parte inferior 20 μ m. Las puntas de flecha muestran las neuritas que proyectan las MN.

DISCUSIÓN.

El patrón de expresión de los receptores de LPA y S1P sugiere que estos lípidos juegan papeles importantes durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario del ratón y el pollo (Meng and Lee, 2009; Ohuchi et al., 2008). Sin embargo, la inactivación independiente de estos receptores no ha tenido efectos importantes en el desarrollo del sistema nervioso, probablemente debido a la redundancia funcional entre estos, de tal manera que si algún receptor es inactivo otro podría suplir su función. A pesar de esto, el papel relevante del LPA en el desarrollo del sistema nervioso se hace evidente al estudiar los efectos de inactivar a la autotaxina (Atx), la principal enzima responsable de su síntesis. La mutagénesis dirigida de esta enzima demostró que su expresión es importante para la morfogénesis del cerebro, en particular en el establecimiento de la comisura del cerebro medio y posterior, además de ser importante para la neurogénesis (Koike et al., 2011; Ohuchi et al., 2010). Otros estudios atribuyen a la ausencia de Atx problemas en el cierre del tubo neural, reducción en la proliferación del neuroepitelio, incremento en la muerte celular y reducción en la cantidad de neuronas jóvenes diferenciadas (Fotopoulou et al., 2010; Tanaka et al., 2006; van Meeteren et al., 2006).

Los pocos estudios relacionados con lípidos y el desarrollo neural han dado mucha información acerca del papel tan importante que juegan en el desarrollo embrionario, por este motivo, la inactivación de LPP3 en el sistema nervioso temprano es importante para conocer el efecto de esta enzima durante este proceso, tal como se ha estudiado con Atx y SphK1/2. En el presente trabajo se observó que la ausencia de LPP3 en ES diferenciadas a linaje neural incrementa la muerte por apoptosis y disminuyen la proliferación celular. En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio indican que los embriones deficientes en LPP3 también presentan aumento de apoptosis en el neuroepitelio, por lo que proponemos que en ausencia de esta enzima la viabilidad celular se ve comprometida (Escalante-Alcalde datos no publicados). Una posible explicación de estos efectos puede ser debido a la señalización de LPA y S1P, dado que

ambos lípidos que señalizan por medio de sus receptores acoplados a proteínas G, pensamos que en ausencia de LPP3 los receptores de estos lípidos podrían estar desensibilizados o bien disminuida su expresión lo que provocaría reducción en la proliferación celular (Castillo-Badillo et al., 2012), tal como ocurre con la glía de Bergmann, donde la inactivación condicional de LPP3 decrementa la expresión de S1P₁ (Lopez-Juarez et al., 2011). Sin embargo, la cuantificación de lípidos extracelulares en los cultivos no mostró aumento en LPA o S1P, pero si en DHS1P, por lo que es necesario estudiar la señalización río debajo de sus receptores. DHS1P además mostró que es capaz de causar un fenotipo semejante al que ocurre cuando LPP3 está ausente en las neuronas, por lo que es importante estudiar los efectos intracelulares que puedan ocasionar la muerte en los EBs, así como diferenciación a células de músculo liso. En este sentido existen reportes que indican que LPA y S1P tienen efecto de apoptótico y necrótico cuando se encuentran en altas concentraciones (Steiner et al., 2000; Zheng et al., 2004). Reportes previos también muestran que LPP3 induce apoptosis mediante la defosforilación de S1P intracelular, donde además se hace evidente la estrecha relación entre la producción de este lípido y su degradación al co-localizar SphK1 con LPP3 (Long et al., 2005). Aunque no se ha descrito mucho acerca de los lípidos y la autofagia, este tipo de muerte celular pudiera estar afectando el crecimiento de nuestras células en cultivo. Tanto la sobre expresión de SphK1 como la inhibición de Fosfohidrolasa de esfingosina-1-fosfato inducen la muerte por autofagia, la cual es el resultado de un incremento en los niveles de S1P, sin embargo este efecto no está asociado a la secreción de S1P ni a la activación de sus receptores lo cual podría ser un efecto intracelular de este lípido para inducir este tipo de muerte (Lavieu et al., 2006; Lepine et al., 2011). Por lo tanto se debe considerar en nuestro trabajo a la autofagia como un probable mecanismo de muerte adicional a la apoptosis ya que cuando esta se inhibe, no se rescata por completo el crecimiento normal de los EBs.

Por otro lado, los ratones dobles “knockout” para las enzimas encargadas de producir la esfingosina-1-fosfato (quinasas de esfingosina 1 y 2) presentan defectos en el cierre del tubo neural, incremento en la muerte celular y reducción

en la proliferación en el neuroepitelio anterior (Mizugishi et al., 2005). De la misma manera la inactivación de *Lpp3*, enzima que es capaz de defosforilar a ambos sustratos, da como resultado defectos en el cierre del tubo neural (Escalante-Alcalde et al., 2007). En base a estos reportes pensamos que el metabolismo de S1P por LPP3 puede estar vinculado a este proceso del cierre del tubo neural, probablemente debido a la muerte de neuronas.

Como ya se menciona, la inactivación génica de *Lpp3* en células troncales embrionarias reduce la cantidad de precursores neurales diferenciados, en parte, a través de disminuir la proliferación celular e incrementar la muerte celular por apoptosis. Estos fenotipos se asemejan mucho a los presentados cuando se inactivan *Atx* y *Sphk1/Sphk2*, de la misma manera en que la alteración de estas enzimas afectan la formación del sistema nervioso en sistemas *in vivo*, LPP3 al ser inactivado en sistema nervioso muestra defectos en la organización del cerebelo además de reducir la expresión del S1P₁ (Lopez-Juarez et al., 2011). Estos datos nos indican que la relación entre enzimas, receptores y lípidos es muy estrecha y que el desbalance de alguno de los componentes tiene consecuencias importantes en la formación del sistema nervioso. Además sabemos que estos lípidos no solo pueden tener una actividad a través de sus receptores acoplados a proteínas G, sino que también pueden estar involucrados en procesos intracelulares. Por ejemplo la S1P repercute en la regulación de la acetilación de histonas (Hait et al., 2009) lo cual a su vez afecta la expresión diferencial de genes, quienes podrían afectar la diferenciación y viabilidad celular.

Un resultado novedoso fue que la DHS1P (pero no el LPA o la S1P) se incrementó en los medios condicionados de los EBs mutantes. Este resultado es interesante ya que se ha descrito que la DHS1P es sintetizada en el retículo endoplásmico por la *Sphk1*. También se ha descrito que la *Sphk1* y LPP3 co-localizan intracelularmente (Long et al, 2005), lo cual podría estar regulando la síntesis de DHS1P, de tal manera que en ausencia de LPP3 no se podría defosforilar DHS1P y su concentración se vería incrementada tal como se observó en este trabajo. Otra alternativa podría ser que la ausencia de LPP3 tenga como

resultado la sobre expresión de Sphk1, ya que esta enzima es la principal responsable de la síntesis de DHS1P sin embargo, será necesario hacer western blots o PCR en tiempo real para poder determinar si hay un aumento o no en la expresión de esta enzima.

La ausencia de LPP3 podría afectar no solo la concentración de los lípidos sino también la expresión de las enzimas involucradas en su síntesis (como lo son las cinasas de esfingosina) y los receptores de S1P acoplados a proteínas G. Además, no debemos dejar de analizar la concentración de los otros lípidos que LPP3 es capaz de procesar, así como el metabolismo de estos lípidos por parte de otras enzimas, ya que justamente DHS1P puede ser metabolizado por la N-acil-esfinganina deshidrogenasa para generar Ceramida uno de los principales lípidos involucrados en la muerte celular (Berdyshev et al., 2006; Edsall et al., 1997; Hartfield et al., 1997; Shinpo et al., 1999).

Otro de los aspectos interesantes que resultaron de este trabajo es el incremento de células positivas a actina de músculo liso en un protocolo de diferenciación hacia linaje neural. Como ya se mencionó en la introducción, la adición de S1P durante la diferenciación de células troncales embrionarias hacia cardiomiocitos, incrementa la eficiencia de formación de los mismos, los cuales expresan transitoriamente a SMA (Clement et al., 2007; Sachinidis et al., 2003b). Dado que la DHS1P también es capaz de activar a todos los receptores de S1P (Im et al., 2001) es posible que el incremento de este lípido que encontramos en nuestros medios condicionados, se encuentre favoreciendo esta diferenciación a través de los receptores acoplados a proteínas G de S1P. Otra alternativa para explicar estos sucesos es que las células SMA positivas provengan de un linaje de la cresta neural (pericitos, cresta neural cardiaca o miofibroblastos) ya que se ha reportado que existe comunicación entre la S1P y la vía de TGF- β , la cual es muy importante para el establecimiento de células de músculo liso a partir de células de la cresta neural (Sailer et al., 2005; Shah et al., 1996; Xin et al., 2004), por lo que sería interesante averiguar si existe una activación de las SMADs mediada por DHS1P en nuestros cultivos. Aparentemente la aparición de células de músculo liso se debe en parte a la fosforilación de bases esfingoideas ya que al poner un

inhibidor de SphK1/2 se reduce el número de células SMA positivas y cuando se agrega DHS1P a cultivos silvestres también se incrementa modestamente el número de células positivas a SMA. Cuando agregamos DHS1P a ES silvestres, no se observó un incremento de células de músculo liso de la misma manera que en los cultivos mutantes, quizá debido a la actividad de fosfatasas que tienen estas células silvestres.

Otra parte del trabajo aquí presentado reveló que LPP3 afecta la extensión de las neuritas, proceso que está directamente relacionado con la activación e inactivación de Rho/ROCK y Rac1 (Govek et al., 2005). En este sentido tanto LPA como S1P son capaces de inducir la retracción de las neuritas y afectar ambas vías de señalización (Fukushima and Morita, 2006; Postma et al., 1996), además Rac1 puede ser activada por la PI3K la cual a su vez puede ser activada por una gran variedad de receptores de lisofosfolípidos (Choi et al., 2010; Sanchez and Hla, 2004). De esta manera estas vías de señalización podrían estar afectadas en alguna proporción de neuronas ya que al poner un inhibidor de ROCK y de PI3K parte de las neuronas diferenciadas en este trabajo son capaces de recuperar la extensión de neuritas. Sin embargo, dicho efecto no necesariamente se debe a la acción de lípidos extracelulares ya que cuando las células mutantes en *Lpp3* fueron expuestas a un ambiente silvestre no fueron capaces de extender sus neuritas adecuadamente.

Es importante mencionar que LPP3 es una enzima que al regular el balance de varios lípidos puede tener múltiples efectos en diversas vías de señalización, a lo cual se debe sumar funciones independientes de su actividad catalítica descritas como son la unión célula-célula o bien la regulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Todas estas moléculas que pueden ser afectadas por las funciones de la LPP3 deben ser consideradas para lograr entender los mecanismos precisos por los que afecta a un linaje celular en específico

CONCLUSIONES

La LPP3 es una enzima fundamental para la diferenciación de células troncales embrionarias a progenitores neurales espinales y neuronas jóvenes.

La ausencia de LPP3 altera la diferenciación de estas neuronas mediante la reducción de la proliferación de sus precursores, el aumento de la muerte celular apoptótica y la predisposición de algunas células a diferenciarse a un linaje positivo a actina de músculo liso.

Las neuronas espinales *Lpp3*^{-/-} diferenciadas *in vivo* y *ex vivo* presentan defectos en la extensión de sus neuritas. Este fenotipo es parcialmente originado por la activación de las vías de Rho/ROCK y PI3K.

La deficiencia de LPP3 en los EBs diferenciados incrementa la concentración extracelular de DHS1P. El tratamiento de ES silvestres con este lípido fenocopia parcialmente los fenotipos mutantes.

PERSPECTIVAS.

Nuestro trabajo reveló un papel clave de la LPP3 en la diferenciación neuronal a partir de células troncales embrionarias y sugerimos que ésta puede jugar un papel también fundamental durante el desarrollo temprano del sistema nervioso *in vivo*. Para corroborar lo anterior es importante validar nuestros hallazgos inactivando a *Lpp3* en etapas iniciales del desarrollo del sistema nervioso sin alterar su expresión en otros tejidos. Una opción es usando el sistema *Cre/loxP* mediante la cruce de nuestro alelo condicional con un ratón que exprese la recombinasa Cre usando un promotor de expresión neural que se active eficientemente desde las primeras etapas del desarrollo neural como el “knockin” *Sox1-Cre* (Takashima et al, 2007) o usar otro tipo de deletores también tempranos pero cuyo blanco sean estructuras particulares del sistema nervioso. Por ejemplo sería interesante inactivar la enzima en la placa del piso o en el cerebro medio y posterior o en células de la cresta neural.

También será muy relevante realizar un perfil lipídico exhaustivo no solo de los medios condicionados por las células mutantes y silvestres sino de los lípidos intracelulares AP, DAG, Cer, C1P, DHS, DHS1P, Sph, S1P y LPA y realizar un análisis de las proteínas involucradas en sus vías de síntesis y degradación así como de las moléculas asociadas a sus vías de señalización. Por ejemplo podemos determinar si alguno de los receptores para S1P, la SphK 1/2 o la Atx se expresan de manera diferente en las células mutantes con respecto a las células silvestres. De esta manera podremos entender mejor el papel que juega la LPP3 en el metabolismo de estos lípidos y en el desarrollo neural.

A partir de los resultados obtenidos del perfil lipídico, podremos darnos cuenta de cuales vías de señalización de los lípidos será interesante estudiar y cuáles lípidos podrían rescatar el fenotipo debido a la ausencia de LPP3, de tal manera que en las condiciones de deficiencia en LPP3 se espera que no se defosforilen C1P, S1P, LPA y AP, entonces, al agregar ceramida, Diacil-glicerol, esfingosina y monoacil-glicerol a los cultivos celulares, podríamos conocer si alguno de estos lípidos está involucrado particularmente en alguno de los fenotipos observados en este trabajo.

Para comenzar a entender el por qué las ES *Lpp3*^{-/-} presentan susceptibilidad a diferenciar células que expresan α -SMA es necesario entender como ocurre la cinética de diferenciación de las tres capas germinales en las primeras etapas de la formación y diferenciación de los EBs. Para esto podemos analizar marcadores de endodermo (alfa feto-proteína, FoxA2), mesodermo (Brachyury) y neuro ectodermo (Sox1) en etapas tempranas de diferenciación y analizar si hay una desproporción en la formación de estos linajes en las células mutantes, además de analizar desde que etapas encontramos más células α SMA. Por ejemplo, en EBs de 4 días de cultivo observamos un incremento notorio en la expresión de FoxA2 (datos no mostrados) en las células mutantes. Aunque aún desconocemos el significado de esta observación puede ser que en los EBs mutantes se diferencien más eficientemente las células del endodermo visceral o

células de neuroepitelio ventral ya que FoxA2 es un marcador de ambos linajes celulares.

Para saber si las células α SMA⁺ son derivadas de la cresta neural habrá que determinar la expresión de marcadores de precursores de la cresta neural como es Sox10, o bien si tienen un origen mesodérmico. De ser el primer caso, se puede estudiar si al bloquear la fosforilación de SMADs se revierte el fenotipo, indicando un “crosstalk” entre DHS1P/SMADs para promover la formación de células de músculo liso derivadas de la cresta neural.

Con la finalidad de hacer notar que la ausencia de LPP3 es la responsable de todos los fenotipos aquí mostrados, es necesario hacer el rescate de estos fenotipos mutantes mediante la re-inserción de LPP3 por medio de la transfección de ES LPP3^{-/-} con un vector que exprese de manera inducible la LPP3 (sistema de inducción por tetraciclina), de tal manera que además podremos conocer el efecto de la ausencia de LPP3 en diferentes tiempos del desarrollo y podremos observar la recuperación de los efectos causados por la mutación como son la extensión de las neuritas o la reducida diferenciación a linaje neural.

Es importante determinar los mecanismos por los que se activa ROCK y PI3K, mediante la inactivación de receptores específicos de LPA y S1P (para lo cual será necesario primeramente determinar cuáles receptores de estos lípidos se expresan durante nuestro protocolo de diferenciación), en este sentido podríamos abatir la expresión de estos receptores mediante RNAs de interferencia, además podríamos bloquear la vía de señalización río abajo mediante el bloqueo de proteínas G mediante el uso de la toxina de pertusis (para inactivar la proteína G_i), la expresión de proteínas dominantes negativas para evitar la función de la proteína G_{12/13} (transfectando a las células con vectores que las expresen), además se puede analizar la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) para determinar cómo se afecta su actividad en ausencia de LPP3, lo que podría tener un efecto en el crecimiento de las neuritas.

BIBLIOGRAFÍA

- Berdyshev, E.V., Gorshkova, I.A., Usatyuk, P., Zhao, Y., Saatian, B., Hubbard, W., and Natarajan, V. (2006). De novo biosynthesis of dihydrosphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase 1 in mammalian cells. *Cellular signalling* 18, 1779-1792.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-445.
- Budhu, A.S., and Noy, N. (2002). Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Molecular and cellular biology* 22, 2632-2641.
- Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013-1026.
- Castilla-Ortega, E., Hoyo-Becerra, C., Pedraza, C., Chun, J., Rodriguez De Fonseca, F., Estivill-Torrus, G., and Santin, L.J. (2011). Aggravation of chronic stress effects on hippocampal neurogenesis and spatial memory in LPA(1) receptor knockout mice. *PLoS One* 6, e25522.
- Castillo-Badillo, J.A., Molina-Munoz, T., Romero-Avila, M.T., Vazquez-Macias, A., Rivera, R., Chun, J., and Garcia-Sainz, J.A. (2012). Sphingosine 1-phosphate-mediated alpha1B-adrenoceptor desensitization and phosphorylation. Direct and paracrine/autocrine actions. *Biochim Biophys Acta* 1823, 245-254.
- Catala, M., Teillet, M.A., De Robertis, E.M., and Le Douarin, M.L. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 122, 2599-2610.
- Chen, J., Boyle, S., Zhao, M., Su, W., Takahashi, K., Davis, L., Decaestecker, M., Takahashi, T., Breyer, M.D., and Hao, C.M. (2006). Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol* 17, 1283-1291.
- Choi, J.W., Herr, D.R., Noguchi, K., Yung, Y.C., Lee, C.W., Mutoh, T., Lin, M.E., Teo, S.T., Park, K.E., Mosley, A.N., *et al.* (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 157-186.
- Clement, S., Stouffs, M., Bettiol, E., Kampf, S., Krause, K.H., Chaponnier, C., and Jaconi, M. (2007). Expression and function of alpha-smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Journal of cell science* 120, 229-238.
- Diez del Corral, R., and Storey, K.G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26, 857-869.
- Dottori, M., Leung, J., Turnley, A.M., and Pebay, A. (2008). Lysophosphatidic acid inhibits neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells derived from human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 1146-1154.
- Edsall, L.C., Cuvillier, O., Twitty, S., Spiegel, S., and Milstien, S. (2001). Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *Journal of neurochemistry* 76, 1573-1584.

- Edsall, L.C., Pirianov, G.G., and Spiegel, S. (1997). Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 17, 6952-6960.
- Edsall, L.C., and Spiegel, S. (1999). Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. *Analytical biochemistry* 272, 80-86.
- Ensini, M., Tsuchida, T.N., Belting, H.G., and Jessell, T.M. (1998). The control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord: specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm. *Development (Cambridge, England)* 125, 969-982.
- Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H.S., Jr Gang, C., Sciorra, V.A., Daar, I., Spiegel, S., Morris, A.J., *et al.* (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development (Cambridge, England)* 130, 4623-4637.
- Escalante-Alcalde, D., Morales, S.L., and 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, 139-147.
- Escalante-Alcalde, D., Sanchez-Sanchez, R., and Stewart, C.L. (2007). Generation of a conditional Ppap2b/Lpp3 null allele. *Genesis* 45, 465-469.
- Fotopoulou, S., Oikonomou, N., Grigorieva, E., Nikitopoulou, I., Paparountas, T., Thanassopoulou, A., Zhao, Z., Xu, Y., Kontoyiannis, D.L., Remboutsika, E., *et al.* (2010). ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental biology* 339, 451-464.
- Fukushima, N., and Chun, J. (2001). The LPA receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators* 64, 21-32.
- Fukushima, N., and Morita, Y. (2006). Actomyosin-dependent microtubule rearrangement in lysophosphatidic acid-induced neurite remodeling of young cortical neurons. *Brain research* 1094, 65-75.
- Fukushima, N., Shano, S., Moriyama, R., and Chun, J. (2007). Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA1-G(i/o) pathway. *Neurochemistry international* 50, 302-307.
- Fukushima, N., Weiner, J.A., and Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Developmental biology* 228, 6-18.
- Furuya, S., Mitoma, J., Makino, A., and Hirabayashi, Y. (1998). Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *Journal of neurochemistry* 71, 366-377.
- Glickman, M., Malek, R.L., Kwitek-Black, A.E., Jacob, H.J., and Lee, N.H. (1999). Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1. *Molecular and cellular neurosciences* 14, 141-152.
- Gomez-Munoz, A., Kong, J.Y., Parhar, K., Wang, S.W., Gangoit, P., Gonzalez, M., Eivemark, S., Salh, B., Duronio, V., and Steinbrecher, U.P. (2005). Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS letters* 579, 3744-3750.

Gont, L.K., Steinbeisser, H., Blumberg, B., and de Robertis, E.M. (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* *119*, 991-1004.

Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development* *19*, 1-49.

Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., *et al.* (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, NY)* *325*, 1254-1257.

Harrison, S.M., Reavill, C., Brown, G., Brown, J.T., Cluderay, J.E., Crook, B., Davies, C.H., Dawson, L.A., Grau, E., Heidbreder, C., *et al.* (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Molecular and cellular neurosciences* *24*, 1170-1179.

Hartfield, P.J., Mayne, G.C., and Murray, A.W. (1997). Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. *FEBS letters* *401*, 148-152.

Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R., and Chun, J. (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*, 1071-1083.

Herr, K.J., Herr, D.R., Lee, C.W., Noguchi, K., and Chun, J. (2011). Stereotyped fetal brain disorganization is induced by hypoxia and requires lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 15444-15449.

Humtsoe, J.O., Feng, S., Thakker, G.D., Yang, J., Hong, J., and Wary, K.K. (2003). Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *The EMBO journal* *22*, 1539-1554.

Humtsoe, J.O., Liu, M., Malik, A.B., and Wary, K.K. (2010). Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Molecular and cellular biology* *30*, 1593-1606.

Im, D.S., Clemens, J., Macdonald, T.L., and Lynch, K.R. (2001). Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine 1-phosphate receptors. *Biochemistry* *40*, 14053-14060.

Irie, F., and Hirabayashi, Y. (1998). Application of exogenous ceramide to cultured rat spinal motoneurons promotes survival or death by regulation of apoptosis depending on its concentrations. *Journal of neuroscience research* *54*, 475-485.

Irie, F., and Hirabayashi, Y. (1999). Ceramide prevents motoneuronal cell death through inhibition of oxidative signal. *Neuroscience research* *35*, 135-144.

Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Calver, A.R., Duddy, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Arimura, N., Kaibuchi, K., *et al.* (2005). Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci* *25*, 1459-1469.

Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., and Moolenaar, W.H. (1994). Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of cell biology* *126*, 801-810.

Jia, Y.J., Kai, M., Wada, I., Sakane, F., and Kanoh, H. (2003). Differential localization of lipid phosphate phosphatases 1 and 3 to cell surface subdomains in polarized MDCK cells. *FEBS letters* *552*, 240-246.

Jones, A.T., and Wessling-Resnick, M. (1998). Inhibition of in vitro endosomal vesicle fusion activity by aminoglycoside antibiotics. *The Journal of biological chemistry* 273, 25301-25309.

Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F., and Kanoh, H. (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 272, 24572-24578.

Kamiya, D., Banno, S., Sasai, N., Ohgushi, M., Inomata, H., Watanabe, K., Kawada, M., Yakura, R., Kiyonari, H., Nakao, K., *et al.* (2011). Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. *Nature* 470, 503-509.

Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H. (2007). A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science (New York, NY)* 315, 820-825.

Kingsbury, M.A., Rehen, S.K., Contos, J.J., Higgins, C.M., and Chun, J. (2003). Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nature neuroscience* 6, 1292-1299.

Koike, S., Yutoh, Y., Keino-Masu, K., Noji, S., Masu, M., and Ohuchi, H. (2011). Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Dev Dyn*.

Lado, D.C., Browe, C.S., Gaskin, A.A., Borden, J.M., and MacLennan, A.J. (1994). Cloning of the rat *edg-1* immediate-early gene: expression pattern suggests diverse functions. *Gene* 149, 331-336.

Lavieu, G., Scarlatti, F., Sala, G., Carpentier, S., Levade, T., Ghidoni, R., Botti, J., and Codogno, P. (2006). Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 281, 8518-8527.

Leemhuis, J., Boutillier, S., Barth, H., Feuerstein, T.J., Brock, C., Nurnberg, B., Aktories, K., and Meyer, D.K. (2004). Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. *The Journal of biological chemistry* 279, 585-596.

Lepine, S., Allegood, J.C., Park, M., Dent, P., Milstien, S., and Spiegel, S. (2011). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell Death Differ* 18, 350-361.

Liu, A., and Niswander, L.A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6, 945-954.

Liu, C.H., and Hla, T. (1997). The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor *edg-1*. *Genomics* 43, 15-24.

Long, J., Darroch, P., Wan, K.F., Kong, K.C., Ktistakis, N., Pyne, N.J., and Pyne, S. (2005). Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *The Biochemical journal* 391, 25-32.

Lopez-Juarez, A., Morales-Lazaro, S., Sanchez-Sanchez, R., Sunkara, M., Lomeli, H., Velasco, I., Morris, A.J., and Escalante-Alcalde, D. (2011). Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. *Glia*.

MacLennan, A.J., Browe, C.S., Gaskin, A.A., Lado, D.C., and Shaw, G. (1994). Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development. *Molecular and cellular neurosciences* 5, 201-209.

Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8, 755-765.

- Meng, H., and Lee, V.M. (2009). Differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors 1-5 in the developing nervous system. *Dev Dyn* 238, 487-500.
- Miranda, G.E., Abraham, C.E., Agnolazza, D.L., Politi, L.E., and Rotstein, N.P. (2011). Ceramide-1-phosphate, a new mediator of development and survival in retina photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 6580-6588.
- Mitoma, J., Ito, M., Furuya, S., and Hirabayashi, Y. (1998). Bipotential roles of ceramide in the growth of hippocampal neurons: promotion of cell survival and dendritic outgrowth in dose- and developmental stage-dependent manners. *Journal of neuroscience research* 51, 712-722.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., and Proia, R.L. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Molecular and cellular biology* 25, 11113-11121.
- Moolenaar, W.H. (1995). Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *The Journal of biological chemistry* 270, 12949-12952.
- Moolenaar, W.H. (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Experimental cell research* 253, 230-238.
- Nievelstein, R.A., Hartwig, N.G., Vermeij-Keers, C., and Valk, J. (1993). Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology* 48, 21-31.
- Novitsch, B.G., Wichterle, H., Jessell, T.M., and Sockanathan, S. (2003). A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40, 81-95.
- Ohuchi, H., Fukui, H., Matsuyo, A., Tomonari, S., Tanaka, M., Arai, H., Noji, S., and Aoki, J. (2010). Autotaxin controls caudal diencephalon-mesencephalon development in the chick. *Dev Dyn* 239, 2647-2658.
- Ohuchi, H., Hamada, A., Matsuda, H., Takagi, A., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H., and Noji, S. (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev Dyn* 237, 3280-3294.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H., and Takuwa, Y. (2000). Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Molecular and cellular biology* 20, 9247-9261.
- Panetti, T.S., Magnusson, M.K., Peyruchaud, O., Zhang, Q., Cooke, M.E., Sakai, T., and Mosher, D.F. (2001). Modulation of cell interactions with extracellular matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Prostaglandins & other lipid mediators* 64, 93-106.
- Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., and Moolenaar, W.H. (1996). Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *The EMBO journal* 15, 2388-2392.
- Ramakers, G.J., and Moolenaar, W.H. (1998). Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Experimental cell research* 245, 252-262.
- Roberts, R., Sciorra, V.A., and Morris, A.J. (1998). Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *The Journal of biological chemistry* 273, 22059-22067.
- Rodgers, A., Mormeneo, D., Long, J.S., Delgado, A., Pyne, N.J., and Pyne, S. (2009). Sphingosine 1-phosphate regulation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 in embryonic stem cells. *Stem cells and development* 18, 1319-1330.

Rosenfeldt, H.M., Hobson, J.P., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochemical Society transactions* 29, 836-839.

Sachinidis, A., Gissel, C., Nierhoff, D., Hippler-Altenburg, R., Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2003a). Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 13, 423-429.

Sachinidis, A., Gissel, C., Nierhoff, D., Hippler-Altenburg, R., Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2003b). Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. *Cell Physiol Biochem* 13, 423-429.

Sailer, M.H., Hazel, T.G., Panchision, D.M., Hoepfner, D.J., Schwab, M.E., and McKay, R.D. (2005). BMP2 and FGF2 cooperate to induce neural-crest-like fates from fetal and adult CNS stem cells. *Journal of cell science* 118, 5849-5860.

Sanchez, T., and Hla, T. (2004). Structural and functional characteristics of S1P receptors. *Journal of cellular biochemistry* 92, 913-922.

Schuck, S., Soloaga, A., Schrat, G., Arthur, J.S., and Nordheim, A. (2003). The kinase MSK1 is required for induction of c-fos by lysophosphatidic acid in mouse embryonic stem cells. *BMC molecular biology* 4, 6.

Sciorra, V.A., and Morris, A.J. (1999). Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* 10, 3863-3876.

Sciorra, V.A., and Morris, A.J. (2002). Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1582, 45-51.

Shah, N.M., Groves, A.K., and Anderson, D.J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-343.

Shinpo, K., Kikuchi, S., Moriwaka, F., and Tashiro, K. (1999). Protective effects of the TNF-ceramide pathway against glutamate neurotoxicity on cultured mesencephalic neurons. *Brain research* 819, 170-173.

Sigal, Y.J., McDermott, M.I., and Morris, A.J. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *The Biochemical journal* 387, 281-293.

Sockanathan, S., and Jessell, T.M. (1998). Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell* 94, 503-514.

Spiegel, S., and Milstien, S. (2000). Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1484, 107-116.

Steiner, M.R., Holtsberg, F.W., Keller, J.N., Mattson, M.P., and Steiner, S.M. (2000). Lysophosphatidic acid induction of neuronal apoptosis and necrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 905, 132-141.

Strochlic, L., Dwivedy, A., van Horck, F.P., Falk, J., and Holt, C.E. (2008). A role for S1P signalling in axon guidance in the *Xenopus* visual system. *Development (Cambridge, England)* 135, 333-342.

Svetlov, S.I., Ignatova, T.N., Wang, K.K., Hayes, R.L., English, D., and Kukekov, V.G. (2004). Lysophosphatidic acid induces clonal generation of mouse neurospheres via proliferation of Sca-1- and AC133-positive neural progenitors. *Stem cells and development* 13, 685-693.

Tanabe, Y., William, C., and Jessell, T.M. (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95, 67-80.

Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J., and Arai, H. (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 281, 25822-25830.

Tanyi, J.L., Morris, A.J., Wolf, J.K., Fang, X., Hasegawa, Y., Lapushin, R., Auersperg, N., Sigal, Y.J., Newman, R.A., Felix, E.A., *et al.* (2003). The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer research* 63, 1073-1082.

Tigyi, G., Fischer, D.J., Baker, D., Wang, D.A., Yue, J., Nusser, N., Virag, T., Zsiros, V., Liliom, K., Miller, D., *et al.* (2000). Pharmacological characterization of phospholipid growth-factor receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 905, 34-53.

Tigyi, G., and Miledi, R. (1992). Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *The Journal of biological chemistry* 267, 21360-21367.

Todorova, M.G., Fuentes, E., Soria, B., Nadal, A., and Quesada, I. (2009). Lysophosphatidic acid induces Ca²⁺ mobilization and c-Myc expression in mouse embryonic stem cells via the phospholipase C pathway. *Cellular signalling* 21, 523-528.

Tomsig, J.L., Snyder, A.H., Berdyshev, E.V., Skobeleva, A., Mataya, C., Natarajan, V., Brindley, D.N., and Lynch, K.R. (2009). Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *The Biochemical journal* 419, 611-618.

Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature genetics* 23, 99-103.

Van Brocklyn, J.R., Lee, M.J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D.M., Coopman, P.J., Thangada, S., Liu, C.H., *et al.* (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *The Journal of cell biology* 142, 229-240.

Van Brocklyn, J.R., Tu, Z., Edsall, L.C., Schmidt, R.R., and Spiegel, S. (1999). Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *The Journal of biological chemistry* 274, 4626-4632.

van Meeteren, L.A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M.A., Pradere, J.P., Pettit, T.R., Wakelam, M.J., Saulnier-Blache, J.S., Mummery, C.L., *et al.* (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and cellular biology* 26, 5015-5022.

Weiner, J.A., and Chun, J. (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5233-5238.

Weiner, J.A., Fukushima, N., Contos, J.J., Scherer, S.S., and Chun, J. (2001). Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J Neurosci* 21, 7069-7078.

- Weiner, J.A., Hecht, J.H., and Chun, J. (1998). Lysophosphatidic acid receptor gene *vzg-1/lpA1/edg-2* is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *The Journal of comparative neurology* 398, 587-598.
- West, M.A., Bright, N.A., and Robinson, M.S. (1997). The role of ADP-ribosylation factor and phospholipase D in adaptor recruitment. *The Journal of cell biology* 138, 1239-1254.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., and Jessell, T.M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385-397.
- Wilson, L., and Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental biology* 282, 1-13.
- Xin, C., Ren, S., Kleuser, B., Shabahang, S., Eberhardt, W., Radeke, H., Schafer-Korting, M., Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2004). Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *The Journal of biological chemistry* 279, 35255-35262.
- Yamane, M., Furuta, D., and Fukushima, N. (2010). Lysophosphatidic acid influences initial neuronal polarity establishment. *Neuroscience letters* 480, 154-157.
- Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T., and Ishii, S. (2009). Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, *p2y5/LPA6*. *The Journal of biological chemistry* 284, 17731-17741.
- Ye, X., Ishii, I., Kingsbury, M.A., and Chun, J. (2002). Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochimica et biophysica acta* 1585, 108-113.
- Yuan, X.B., Jin, M., Xu, X., Song, Y.Q., Wu, C.P., Poo, M.M., and Duan, S. (2003). Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nature cell biology* 5, 38-45.
- Zhang, N., Sundberg, J.P., and Gridley, T. (2000). Mice mutant for *Ppap2c*, a homolog of the germ cell migration regulator *wunen*, are viable and fertile. *Genesis* 27, 137-140.
- Zhao, C., Du, G., Skowronek, K., Frohman, M.A., and Bar-Sagi, D. (2007). Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos. *Nature cell biology* 9, 706-712.
- Zheng, Z.Q., Fang, X.J., and Qiao, J.T. (2004). Dual action of lysophosphatidic acid in cultured cortical neurons: survival and apoptogenic. *Sheng Li Xue Bao* 56, 163-171.