



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE LA LPP3 EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA
DEL HIPOCAMPO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
LBM. ISRAEL COTZOMI ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Diana Escalante Alcalde. El autor recibió la beca de maestría CONACYT 549523/300729 y el proyecto fue realizado con donativos de DGAPA-PAPIIT IN205812 y SEP-CONACYT CB-165897.

Apoyo a la investigación "Miguel Alemán Valdés" en el área de la salud.
FMA/UNAM 2012.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi papá Alberto y mi mamá Irma por su apoyo y cariño incondicional, su ejemplo y consejos me dan impulso a seguir adelante. A mis hermanos, Erika Y Edgar por echarnos la mano en diversos momentos y las bromas que amenizan los días.

Gracias a la Dra. Diana Escalante por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, sus enseñanzas, su apoyo para llevar a cabo este trabajo y su dedicación en mi para entender un poco más del maravilloso mundo de las neurociencias.

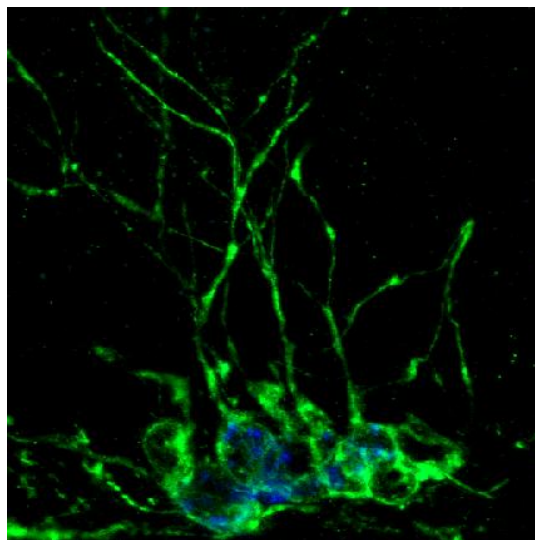
A mi comité tutorial: Dra. Lourdes Massieu Trigo y a la Dra. Clorinda Arias Álvarez por las aportaciones a lo largo del presente trabajo que la enriquecieron más.

Gracias a la Dra. Ana Valeria Martínez Silva por su apoyo técnico a lo largo de este proyecto. Además de su confianza que me ha brindado.

A mis compañeros de laboratorio: Angélica, Martha, Arlen, Ricardo y Alejandro, por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por su apoyo para poder asistir y presentar un cartel en el congreso internacional llevado a cabo los días 7 al 11 de Julio del presente año en la ciudad de Rio de Janeiro, Brazil.

A los humanos les encanta maravillarse. Esto es la semilla de la ciencia. Emerson
(1803-1882)



DCX/BrdU

RESUMEN

La neurogénesis es el proceso que da lugar a la formación de nuevas neuronas funcionales a partir de células progenitoras. En el cerebro adulto esto ocurre en la zona Ventricular-Subventricular (V-SVZ) de los ventrículos laterales y en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. La generación continua de neuronas en el hipocampo es importante para procesos de aprendizaje y memoria.

Por otro lado, la fosfatasa de lípidos fosfatados-3 (LPP3) desfosforila algunos lípidos bioactivos, regulando su concentración y actividad de señalización, como la esfingosina-1-fosfato (S1P), ácido lisofosfatídico (LPA), ácido fosfatídico (PA) y ceramida-1-fosfato (C1P). Estos son reguladores importantes de diversos procesos biológicos, como son la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis.

Tanto la LPP3 como algunos receptores acoplados a proteínas G (RAPG) de S1P y LPA se expresan en áreas neurogénicas de ratones adultos, lo cual podría sugerir que la enzima regula la concentración y actividad biológica de estos lípidos en ambos nichos neurogénicos.

El principal objetivo de este trabajo fue investigar los efectos de la deficiencia de la LPP3 en la neurogénesis del hipocampo adulto. Inicialmente demostramos que la LPP3 se expresa en células troncales neurales con características de glía radial y no radiales del hipocampo. Además, empleando el sistema *Cre/LoxP* para inactivar de manera condicional al *Ppap2b/Lpp3* en el linaje neuronal analizamos las consecuencias de la deficiencia de LPP3 en la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales en el giro dentado *in vivo*.

Los resultados muestran que el número de células BrdU⁺ (después de un pulso de 2 h) en la SGZ de ratones deficientes de LPP3 se reduce en comparación con lo encontrado en ratones control. También, se encontró una reducción en la cantidad de neuroblastos/BrdU⁺ en el hipocampo de los ratones LPP3^{-/-}, y se observaron alteraciones en la morfología del árbol dendrítico y localización en la ZSG del giro dentado del hipocampo de este tipo celular. En resumen, nuestros datos indican que la LPP3 tiene un papel importante en la regulación de la proliferación de células progenitoras y en la diferenciación de neuroblastos en el hipocampo de ratón adulto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Fosfatasa de lípidos fosfatados	4
1.2 Ácido lisofosfatídico y Esfingosina-1-fosfato	7
1.3 Importancia de la LPP3 en el desarrollo embrionario y en el sistema nervioso del ratón.....	10
1.4 Importancia de la señalización de LPA y S1P en la neurogénesis.....	11
1.5 Neurogénesis adulta	12
1.6 El Nicho celular neurogénico	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Mapa metodológico	19
5.2 Animales.....	20
5.3 Marcaje con BrdU	21
5.4 Perfusión y fijación de los cerebros	21
5.5 Corte y montaje de las secciones de cerebro	22
5.6 Inmunofluorescencia	23
5.7 Obtención de extractos celulares	25
5.8 Western Blot	26
6. RESULTADOS	28
6.1 Identificación del tipo celular que expresa la LPP3 en el giro dentado del hipocampo.	28
6.2 Comparación de la capacidad proliferativa de las células progenitoras intermedias de ratones LPP3 ^{+/+} y LPP3 ^{-/-} mediante la incorporación de BrdU.	32
6.3 Efectos de la deficiencia de LPP3 en el linaje neuronal del hipocampo.....	34

7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS.....	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47
11. APÉNDICE.....	51
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	53

ABREVIATURAS

BMPs	Proteína morfogénica del hueso
BrdU	Bromodeoxiuridina
DCX	Doblecortina (proteína asociada a microtubulos)
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial (proteína de filamentos intermedios)
GFP	Proteína Verde Fluorescente
IPCs	Células Progenitoras Intermedias
LPA	Ácido Lisofosfatídico
LPP	Fosfatasa de Lípidos Fosfatados
NSC	Células Troncales Neurales
RAPG	Receptores Acoplados a Proteínas G
RGL	Células similares a la Glía Radial
SGZ	Zona Subgranular del Giro Dentado
VEGF	Factor de crecimiento endotelio-vascular
V-SVZ	Zona Ventricular-Subventricular
S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1P ₁	Receptor 1 de S1P

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fosfatasa de lípidos fosfatados

La actividad de fosfatasa es la hidrólisis de un grupo fosfato que puede ocurrir en diversos sustratos, desde azúcares, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que estén fosforilados (Stukey & Carman 1997).

La conversión del ácido fosfatídico (PA) a diacilglicerol (DAG), el cual es importante para la síntesis de triacilglicerol (TAG), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) fue descrita en la década de 1950. Se observó que este proceso era llevado a cabo por una enzima con actividad de fosfatasa de fosfatido (PAP) (Brindley *et al.* 2009). Esta actividad ocurre en los compartimentos intracelulares; sin embargo posteriormente se describió una actividad PAP en la membrana citoplasmática que parecía ser diferente a la citosólica, por lo que se le llamó PAP2. Actualmente a estas enzimas se les denomina fosfatasa de lípidos fosfatados o LPPs (del inglés Lipid Phosphate Phosphatase) ya que no solo actúa sobre PA sino también sobre otros lípidos fosfatados (Sigal *et al.* 2005; Brindley & Pilquil 2009; Brindley *et al.* 2009; Bergmann *et al.* 2012; Kok *et al.* 2012).

Las LPPs se pueden diferenciar de las PAPs debido a que las primeras no requieren magnesio (Mg^{++}) para su actividad y no son inhibidas por N-etilmaleimida. Además las PAPs actúan solo en el citosol, mientras que las LPPs principalmente son proteínas integrales de la membrana citoplasmática, por lo que tienen actividad ectoenzimática (Kok *et al.* 2012), aunque también se encuentran en las membranas de algunos organelos intracelulares.

La secuencia consenso que da lugar a la actividad de las LPPs fue descrita por Stukey y Carman en 1997 en *Saccharomyces cerevisiae* (Stukey & Carman 1997). Estas enzimas pertenecen a una superfamilia de fosfatasa, incluyendo las fosfatasa de esfingosina-1-fosfato, glucosa-6-fosfatasa y, diacilglicerol pirofosfatasa, entre otras (Brindley & Pilquil 2009; Chun *et al.* 2013).

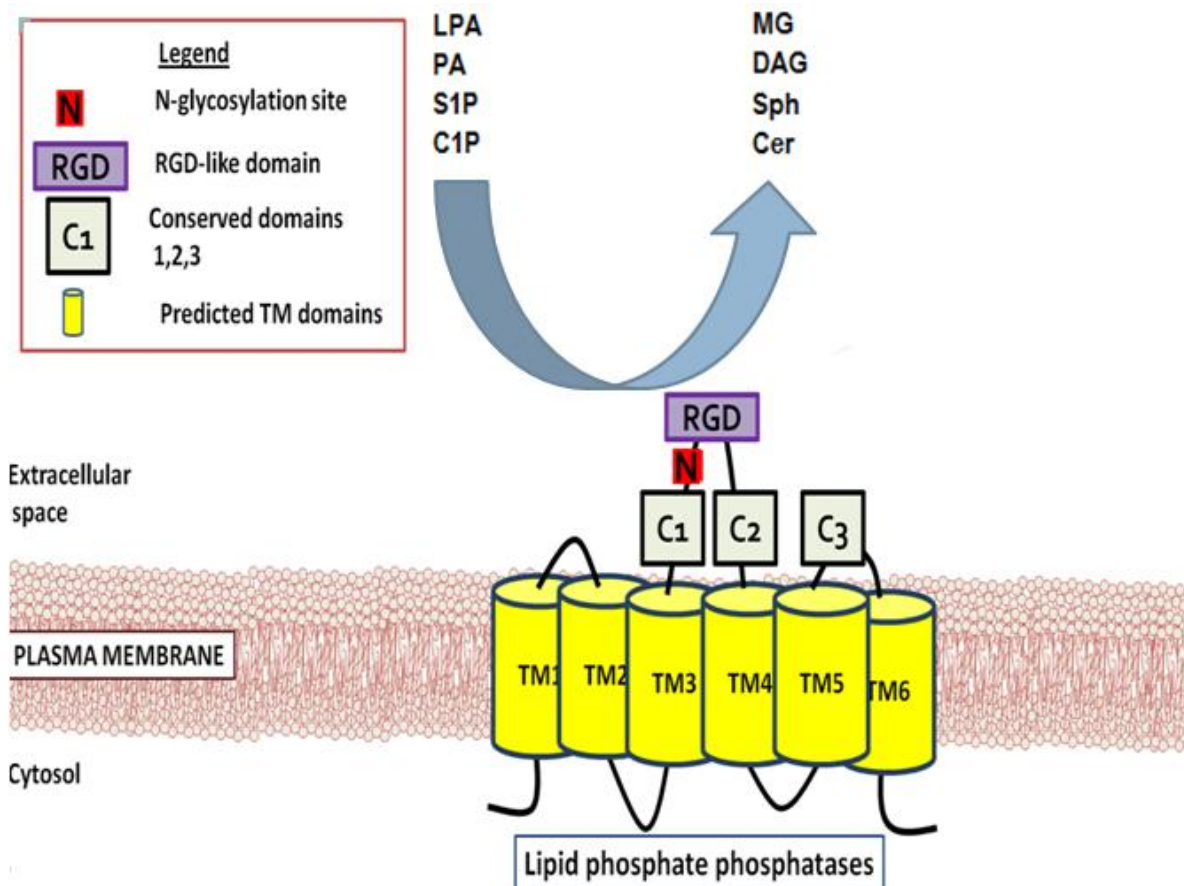


Figura 1. Fosfatasa de Lípidos Fosfatados. El dominio RGD se encuentra solo en la LPP3. Tomado y modificado de Brindley, 2013.

Las LPPs son glucoproteínas con una estructura similar a un canal, contienen seis dominios transmembranales putativos, con su amino y carboxilo terminal del lado citoplasmático. Tienen 3 dominios altamente conservados en su sitio catalítico que se localizan en el lado extracelular o en el lumen de los compartimentos intracelulares. Los dominios catalíticos C1 y C2 (Figura 1) se localizan en la segunda asa extracelular. En esta misma asa y entre estos dominios se encuentra un sitio de N-glicosilación. En la tercera asa extracelular se encuentra el tercer dominio catalítico C3 (Long *et al.* 2008; Kok *et al.* 2012). La LPP3 humana contiene además una secuencia de aminoácidos de adhesión celular: arginina, glicina y aspartato (RGD). En el ratón cambia el aspartato por un glutamato (RGE). Ésta se localiza en la segunda asa extracelular. Esta secuencia es reconocida por integrinas, y así media las interacciones célula-célula que

conjuntamente con las interacciones célula-matriz son importantes para muchos procesos biológicos, tanto en el desarrollo embrionario como en eventos patológicos (Chun *et al.* 2013). Estudios genéticos y funcionales muestran que la regulación de la LPP3 sobre la señalización mediada por integrinas y β -catenina/LEF-1 tiene efectos en la adhesión, migración, proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular, así como el establecimiento del patrón corporal (Escalante-Alcalde *et al.* 2003; Sigal *et al.* 2005; Humtsoe *et al.* 2010).

Las LPPs (LPP1, LPP2 y LPP3) son codificadas por tres genes diferentes (*PPAP2A*, *PPAP2C* y *PPAP2B*, respectivamente). Éstas hidrolizan a un amplio rango de lípidos fosfatados: PA, ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida-1-fosfato (C1P) y esfingosina-1-fosfato (S1P), para dar lugar a sus respectivos productos: DAG, monoacilglicerol (MAG), Ceramida (C) y esfingosina (S) (Sigal *et al.* 2005).

Tanto los lípidos fosfatados como sus productos, tiene papeles fisiológicos relevantes. Por ejemplo, se sabe que el DAG actúa como un segundo mensajero; el LPA, al igual que la S1P, actúa sobre receptores acoplados a proteínas G (RAPG) lo que da lugar a una amplia variedad de respuestas celulares (Sigal *et al.* 2005). Debido a esto las LPPs parecen tener un papel importante en la regulación de la señalización mediada por estos lípidos debido al control del balance entre los lípidos bioactivos antes mencionados y sus productos desfosforilados (Brindley & Pilquil 2009).

Como se mencionó anteriormente, las LPPs se localizan tanto en la membrana plasmática como en la de algunos organelos intracelulares (aparato de Golgi y retículo endoplásmico) dependiendo del tipo celular e isoenzima (Long *et al.* 2008; Gutiérrez-Martínez *et al.* 2013). La LPP1 tiene un motivo FDKTRL en su N-terminal el cual es una señal para dirigirla a la membrana apical. Por otro lado la LPP3 tiene un motivo de di-tirosina en su segunda asa citoplasmática que la dirige a la membrana basolateral en células MDCK (Jia *et al.* 2003). La LPP3 se localiza también en compartimentos de la vía secretoria; en el retículo endoplásmico, donde se encuentra de forma no glucosilada, y en la membrana citoplasmática se localiza principalmente en las balsas lipídicas y en las caveolas (Gutiérrez-Martínez *et al.* 2013; Long *et al.* 2008; Nanjundan & Possmayer 2001). El

transporte vesicular intracelular está facilitado por los lípidos LPA, PA y DGA, los cuales ayudan a que las membranas se curven formando las vesículas intracelulares. En este sentido recientemente se ha visto que la LPP3 regula el metabolismo de diversos lípidos, así como la formación del transporte acarreador en la vía secretoria, principalmente en el movimiento retrógrado entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Gutiérrez-Martínez *et al.* 2013).

1.2 Ácido lisofosfatídico y Esfingosina-1-fosfato

Los dos lípidos fosfatados, sustratos de las LPPs, más estudiados actualmente son el LPA y la S1P. La síntesis y degradación de estos lípidos ocurre tanto extracelular como intracelularmente.

Los RAPG del LPA y de la S1P activan cascadas de señalización que regulan la proliferación, apoptosis y diferenciación celular. Por lo tanto la disponibilidad y actividad fisiológica de estos lípidos fosfatados están reguladas por las LPPs, debido a que éstas participan en su metabolismo tanto a nivel extracelular como intracelular (Figura 2) (Escalante-Alcalde *et al.* 2003; Brindley *et al.* 2009; Sánchez-Sánchez *et al.* 2012; Chun *et al.* 2013).

El LPA tiene un papel importante en el crecimiento axonal, proliferación, diferenciación, movilidad y sobrevivencia celular (Spohr *et al.* 2008). A la fecha se han descrito 6 receptores para LPA. LPA₁ y LPA₂ están acoplados a G_i, G_q y G_{12/13}, mientras que LPA₃ solo a G_i y G_q. Por otro lado, LPA₄ activa a G_i, G_q, G_{12/13} y G_s. El LPA₅ activa solo G_q y G_{12/13} (Brindley & Pilquill 2009; Blaho & Hla 2011) mientras LPA₆ puede activar a G_{12/13}, G_i e incluso a G_s. Por lo anterior es que el mismo ligando puede tener efectos opuestos (Choi & Chun 2012). Todos estos receptores de manera general activan diferentes vías entre las que se encuentran PI3K, PKC, PKA, MAPK y la vía de Rho, afectando el re-arreglo del citoesqueleto, la adhesión, migración, morfogénesis celular, entre otras (Matas-Rico *et al.* 2008; Spohr *et al.* 2011; Sánchez-Sánchez *et al.* 2012). No obstante la acción del LPA es dependiente de la expresión específica de cada uno de sus RAPGs.

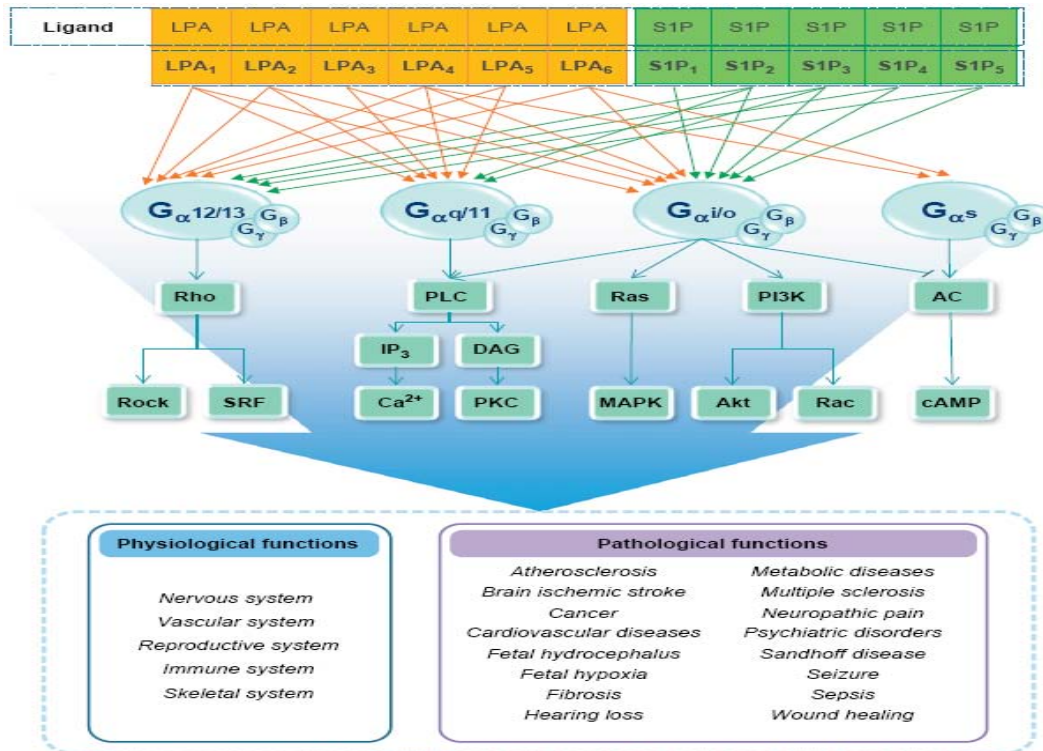


Figura 2. Vías de señalización para los receptores de LPA y S1P. Tomado y modificado de Choi J. W. 2012.

Las células progenitoras neurales (NPC) expresan altos niveles del mRNA de los receptores LPA₁, LPA₂ y LPA₄ (Blaho & Hla 2011), y en las NPC derivadas de células troncales embrionarias humanas el LPA induce la retracción neuronal y reduce su diferenciación debido a una disminución en su proliferación y un aumento en la apoptosis mediada por la activación de la vía Rho-RhoK (Frisca *et al.* 2013). Además, el LPA ha sido implicado en la inducción de la polaridad neuronal (revisado en Sánchez-Sánchez *et al.* 2012).

En otros trabajos, se ha visto que la sobre-expresión de autotaxina (ATX), enzima que actúa sobre la lisofosfatidilcolina (LPC) para producir el LPA en el espacio extracelular, promueve la progresión de tumores, metástasis, angiogénesis, y protege a las células tumorales de la apoptosis. Esto ocurre principalmente porque en esta condición hay sobreproducción de LPA (Chun *et al.* 2013).

La S1P se forma a partir de los esfingolípidos, por la remoción de una cadena de ácido graso de la ceramida por la acción de la ceramidasa y la posterior adición de un grupo fosfato por la acción de una cinasa de esfingosina. La remoción del grupo fosfato se lleva a cabo por la acción de las fosfatasas de S1P, y las LPPs o es irreversiblemente degradado por la liasa de S1P (Figura 3) (Mendelson *et al.* 2014).

La S1P también activa a RAPG, el resultado de la activación de éstos es la activación de Rho, Rac y Ras, adenilato ciclasa, PI3K, fosfolipasa C, proteína cinasa C y el consecuente incremento del Ca^{++} intracelular para la regulación de interacciones célula-célula, célula-matriz, así como la migración, diferenciación y sobrevivencia celular (Sugimoto *et al.* 2003; Blaho & Hla. 2011). Se han descrito 5 RAPG para la S1P, que pueden activar a G_i , G_q y $G_{12/13}$, dependiendo del receptor que expresen las células (Mendelson *et al.* 2014).

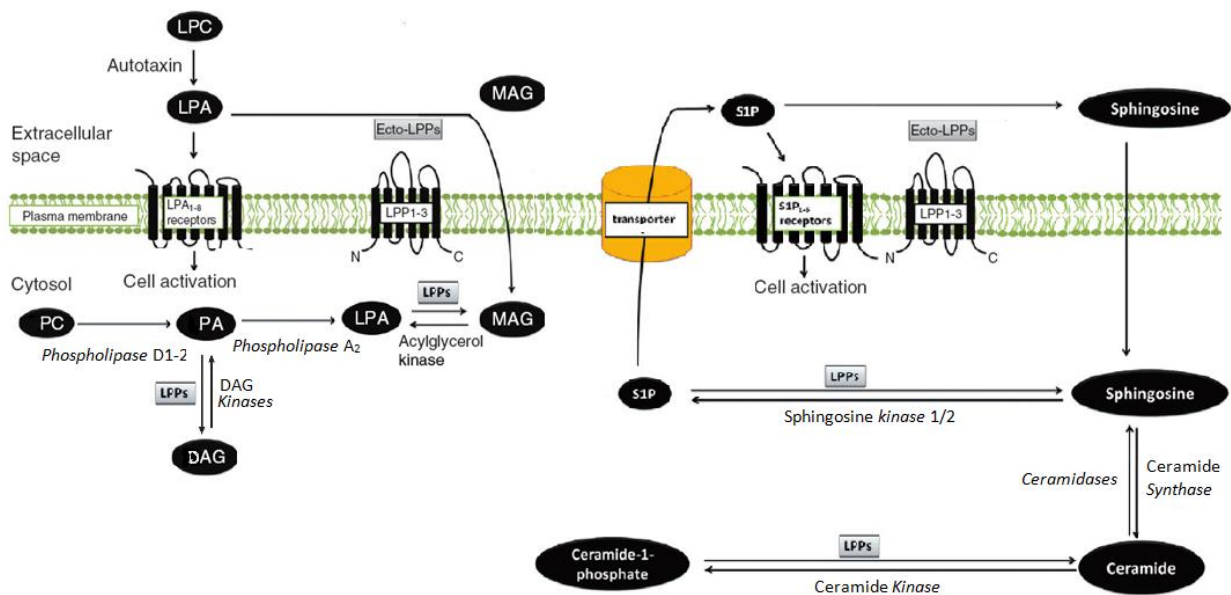


Figura 3. Metabolismo de LPA y S1P. Tomado y modificado de Chun, J. 2013.

1.3 Importancia de la LPP3 en el desarrollo embrionario y en el sistema nervioso del ratón

La LPP3 se expresa en el desarrollo embrionario post-implantación, es detectada en el ectodermo extra-embrionario a los 6.5 días. Posteriormente, en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico, se expresa en la zona ventral del tubo neural del día embrionario 8.5 (E8.5), en la gestación media, se expresa en el sistema nervioso periférico, nervios craneales, entre otras estructuras (Escalante-Alcalde *et al.* 2003). En etapas adultas se encuentra expresada en el cerebelo, el bulbo olfatorio, la corriente de migración rostral y el sistema ventricular (López-Juárez *et al.* 2011). Por lo que la LPP3 tiene una expresión variable en diversas estructuras a lo largo del desarrollo embrionario y en la etapa adulta del ratón. Por otro lado la LPP1 se expresa constitutivamente en el desarrollo murino y está presente en la mayoría de los tejidos, mientras que la LPP2 tiene una expresión difusa (Escalante-Alcalde *et al.* 2003). La importancia de la LPP3 se ha demostrado en modelos de ratones “knock out” (KO) los cuales mueren antes del día 10.5 de gestación, debido a una deficiente formación de la placenta corioalantoidea y de la vasculatura del saco vitelino, un acortamiento del eje antero-posterior y una duplicación de estructuras axiales (Escalante-Alcalde *et al.* 2003). También se observaron defectos en el cerrado del tubo neural anterior (Escalante-Alcalde *et al.* 2007) y un incremento de la muerte celular apoptótica del neuroepitelio (Escalante-Alcalde, datos no publicados).

Coincidentemente varios de los fenotipos mencionados son similares a los producidos por la deficiencia de las cinasas de esfingosina o la ATX (bloqueo en la síntesis de S1P y LPA, respectivamente) (Mizugishi *et al.* 2005).

La S1P y el LPA promueven la autorenovación y proliferación de las células troncales embrionarias de ratón (Pitson & Pebay 2009). Sin embargo el papel que tiene la LPP3 en la regulación de los niveles de estos lípidos en estas células aún no se ha definido.

En otros estudios se demostró que existe una reducción en la cantidad de precursores neurales derivados de la diferenciación de células troncales embrionarias carentes de LPP3, esto debido a una reducción en la proliferación y a un incremento de muerte celular por apoptosis (Sánchez-Sánchez *et al.* 2012).

La LPP3 se expresa en el sistema nervioso central y periférico. Por ejemplo, se ha observado que en el desarrollo del sistema nervioso, la enzima se expresa en áreas neurogénicas, además de expresarse en los axones en crecimiento de algunas neuronas del sistema nervioso central y periférico, como las neuronas motoras y las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Escalante-Alcalde *et al.* 2009). De hecho la deficiencia de la LPP3 evita el crecimiento axonal de neuronas diferenciadas a partir de células troncales embrionarias (Sánchez-Sánchez *et al.* 2012).

La LPP3 también se encuentra abundantemente expresada en las regiones neurogénicas del cerebro adulto y en la glía de Bergmann en el cerebelo en desarrollo y adulto. Este último tipo de glía es un astrocito especializado que conserva algunas propiedades similares a las células troncales neurales (revisado en López-Juárez *et al.* 2011). La carencia de la LPP3 en el cerebelo provoca defectos en la foliación como hipotrofia e hipoplasia, debido a alteraciones en el número, el arreglo y la morfología de las células de la glía de Bergmann. También provoca una disminución en la proliferación y migración de células granulares externas, y un aumento de la muerte las células granulares. Además estos ratones mostraron defectos de coordinación motora sobre todo en sus extremidades traseras (López-Juárez *et al.* 2011). Es interesante mencionar que al igual que la LPP3, algunos receptores de LPA y S1P así como enzimas productoras de éstos, también se expresan en las zonas neurogénicas del cerebro adulto (Ver Apéndice I).

1.4 Importancia de la señalización de LPA y S1P en la neurogénesis

La relevancia de la señalización mediada por LPA en la neurogénesis del hipocampo se puede apreciar en los estudios realizados con el ratón KO de la variante maLPA₁ nulo (ratón de Málaga), el cual es una sublínea de un ratón nulo

para el receptor LPA₁. Éste muestra un desarrollo normal de CA1, CA3 y el giro dentado comparado con un ratón silvestre. Sin embargo se observó una menor proliferación de progenitores neurales y un incremento en la muerte de las nuevas neuronas. Con base en lo anterior se estableció que el LPA y su receptor LPA₁ participan en la regulación de la actividad mitótica, diferenciación y muerte celular de progenitores neurales (Matas-Rico *et al.* 2008).

Durante el desarrollo embrionario la S1P regula procesos como la angiogénesis, cardiogénesis, el desarrollo de extremidades además de la neurogénesis (Mizugishi *et al.* 2005). El receptor S1P₁ está enriquecido en el tejido neuronal (Chae *et al.* 2004) y se ha visto que los ratones que carecen de las dos esfingosina cinasas muestran defectos en la neurogénesis y un incremento en la muerte celular del neuroepitelio (Mizugishi *et al.* 2005). Por otro lado los astrocitos tratados con S1P promueven la diferenciación de progenitores neurales al incrementar la producción de laminina (Spohr *et al.* 2012).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la capacidad neurogénica de células aisladas del hipocampo adulto a través de la formación de neuroesferas, encontrando que las células que derivan de hipocampos que carecen de la enzima presentan una reducción en el número y el tamaño de neuroesferas en comparación con las formadas de animales control (Castro-Hernández, tesis de licenciatura, 2015). Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo y otros hemos descrito que la LPP3 se expresa en zonas neurogénicas y el giro dentado no es la excepción (López-Juárez *et al.* 2011; Miller *et al.* 2013; Apéndice I). Debido a que el LPA y la S1P son metabolizados por la actividad membranal de las LPP3 regulando su concentración y actividad, es posible que la carencia de la LPP3 en el sistema nervioso afecte la neurogénesis del giro dentado del hipocampo.

1.5 Neurogénesis adulta

A partir de los estudios pioneros de Altman en 1965, se demostró por primera vez la presencia de neuronas generadas *de novo* en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo de rata postnatal (Altman & Das 1956). Los primeros

estudios usaban timidina tritiada como marcador de células en proliferación en el cerebro adulto, seguido por detección autorradiográfica. Posteriormente en los años 90's se usó bromodeoxiuridina (BrdU) e inmunohistoquímicas para determinar la proliferación celular en el cerebro adulto, por lo que el estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto comenzó a tener mayor éxito después de la introducción de este análogo de timidina (Del Rio & Soriano 1989; Eriksson *et al.* 1998).

La neurogénesis adulta es un proceso durante el cual se generan nuevas neuronas funcionales, a partir de precursores neuronales. Esto ocurre en el giro dentado del hipocampo y la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de los ventrículos laterales, donde las nuevas neuronas se integran a la capa granular del giro dentado o migran al bulbo olfatorio a través de la corriente de migración rostral (RMS), respectivamente (Doetsch *et al.* 1999; Seri *et al.* 2001). En el humano, debido a la evolución y un menor uso del sistema olfatorio, la capacidad neurogénica de los ventrículos y migración de neuroblastos hacia el bulbo olfatorio se pierde después de los 12 meses de vida mientras que en la mayoría de los mamíferos inferiores esta capacidad se mantiene durante toda la vida pero disminuye con la edad (Ernst *et al.* 2014).

Recientemente se ha sugerido la aparición *de novo* de neuroblastos en el estriado del humano adulto, una zona muy cercana a la región subventricular, y mediante el análisis de ^{14}C se sugirió una continua generación de interneuronas. Además también se ha sugerido que en pacientes con enfermedades neurodegenerativas la generación de estas células está reducida (Ernst *et al.* 2014; Kempermann 2014), sin embargo estos trabajos aún son controversiales y esperan ser replicados por otros grupos.

Las células troncales neurales (NSC) que son las encargadas de la neurogénesis (Reynolds & Weiss 1992), presentan dos características bien definidas: 1) la capacidad de autorrenovarse por medio de la división celular y 2) la capacidad de generar células especializadas por medio de la diferenciación celular (Gage 2000).

En el modelo imperante de la neurogénesis del hipocampo adulto, las NSC, que se comportan como células quiescentes, son similares a las células de glía radial (RGL) o también llamadas células tipo 1. A partir de estas células se generan precursores altamente proliferativos que se conocen como IPCs, los cuales a su vez dan lugar a neuroblastos o células tipo 3 y finalmente a neuronas maduras (Ming & Song 2011) (Figura 4). Las nuevas neuronas en etapas específicas de la maduración son preferencialmente reclutadas en la circuitería hipocampal bajo su propio balance de excitación-inhibición, lo que permite una mayor plasticidad sináptica (Benarroch 2013).

Las NSC o células tipo 1, como ya se mencionó, tiene características morfológicas y antigénicas semejantes a la glía radial. Sus principales características son: un soma de forma triangular localizado en la SGZ y un proceso apical que atraviesa la capa granular y que llega a la capa molecular del giro dentado. Se dividen lentamente, expresan GFAP (que también es un marcador de astrocitos), filamentos intermedios de nestina, la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) y el factor de transcripción SOX2, que es un marcador de células troncales neurales (Bonaguidi *et al.* 2012, Ehninger & Kempermann 2008). Las células RGL pierden su proceso radial y dan lugar a los precursores neurales no radiales (tipo 2), que se localizan en la SGZ y tienen una división asimétrica que da lugar a otro precursor y a las IPCs (Kempermann *et al.* 2004; Ming & Song 2011).

Las IPCs, las cuales también actúan como células precursoras, expresan BLBP, Nestina y Sox2, sin embargo no expresan GFAP (Bonaguidi *et al.* 2012). Como se mencionó son el tipo celular más proliferativo en el giro dentado del adulto por lo que incorporan preferentemente análogos de timidina en pulsos cortos y se localizan exclusivamente en la SGZ. Poseen pequeños procesos tangenciales, en contraste con el proceso radial de las células tipo 1 (Ihrle & Alvarez-Buylla 2011; Bonaguidi *et al.* 2012).

A partir de las IPCs se generan neuroblastos los cuales expresan DCX y Prox1 que son marcadores de neuronas inmaduras. Finalmente, las neuronas inmaduras migran a la capa granular más interna y se diferencian en células

granulares. En unos días se genera una nueva neurona que extiende sus dendritas hacia la capa molecular y proyecta sus axones a través del hilio hacia CA3 (Benarroch 2013). Se ha mencionado que estas nuevas neuronas se agregan al giro dentado para la generación de nuevas conexiones celulares más que para reemplazar células granulares viejas (Ehninger & Kempermann 2008).

1.6 El Nicho celular neurogénico

El nicho celular es un medio heterogéneo que está compuesto de astrocitos, oligodendrocitos, células del sistema inmune, vasculatura y los componentes de la matriz extracelular. Los nichos son definidos como el micro-ambiente de las células troncales y que funcionalmente controlan su desarrollo *in vivo* (Bonaguidi *et al.* 2012). Recientemente se ha demostrado que las NSC tiene una arquitectura estereotípica que le permite el contacto con diferentes zonas de los nichos celulares lo que afecta su autorenovación o diferenciación (Gage 2000; Ihrie & Alvarez-Buylla 2011; Fuentealba *et al.* 2012).

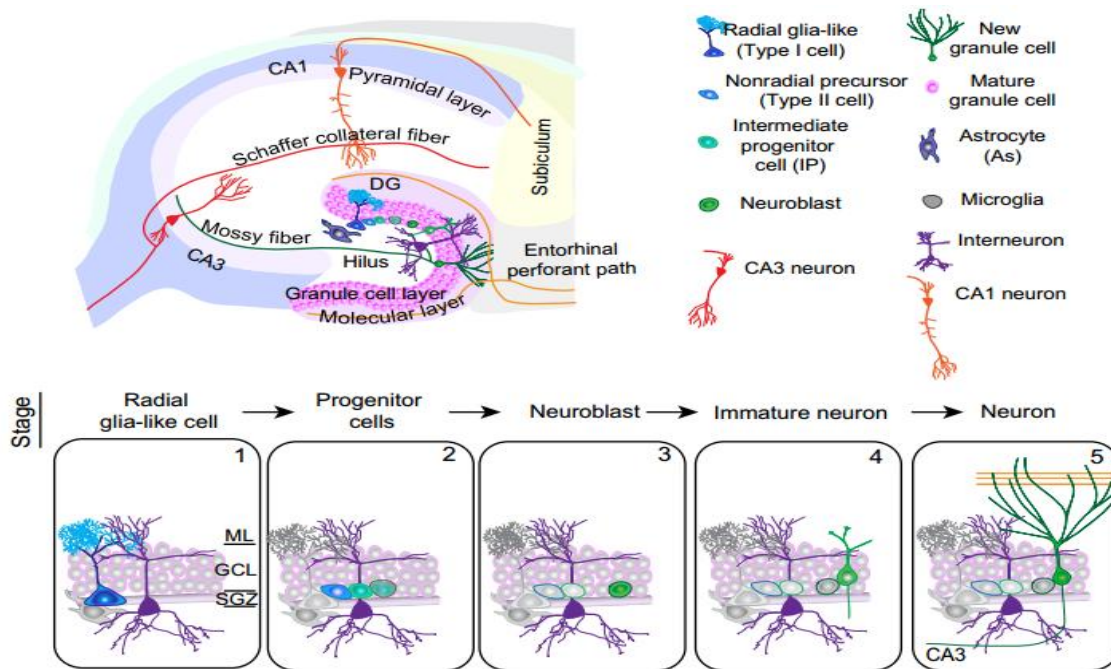


Figura 4. Etapas de la neurogénesis en el hipocampo. Tomado y modificado de Ming, J. 2011.

Tanto en la V-SVZ como en la SGZ las NSC tiene una localización particular, que pueden responder a estímulos locales así como estímulos proveniente de los vasos sanguíneos (Fuentealba *et al.* 2012).

Por ejemplo las RGL en su dominio proximal (hilo-SGZ) se ha visto que responde a VEGF promoviendo su proliferación. Por otro lado, en su dominio intermedio (el proceso radial que atraviesa la capa granular y contacta células granulares y progenitores intermedios) actúa Notch, Nogina y BMPs, que ayudan a la sobrevivencia, proliferación y mantenimiento del estado quiescente de las NSC. Por último, su elemento distal (árbol dendrítico), contacta a las células de la capa molecular y responde a estímulos de GABA y glutamato, lo que promueve una reducción en su proliferación, y tiene un efecto en su diferenciación (Fuentealba *et al.* 2012). En cuanto a los progenitores primarios de los ventrículos laterales, se ha visto que contactan muchos de los componentes del nicho neurogénico como las células de amplificación transitoria, neuronas jóvenes, vasos sanguíneos, las células ependimales y el líquido cefalorraquídeo, por lo que los progenitores primarios reciben diversas señales que regulan su actividad (Ihrie & Alvarez-Buylla 2011).

Cabe resaltar la importancia que juega el nicho celular en la neurogénesis, ya que por ejemplo VEGF es uno de los factores tróficos que se deriva de la vasculatura y es un potente regulador de la neurogénesis adulta. Además la población de astrocitos tiene un papel importante en la creación permisiva del nicho neurogénico en la SGZ (Kirby *et al.* 2015).

Igualmente las interacciones de las NSC con la neuroglia tienen un papel importante en muchos procesos de la neurogénesis, migración neuronal, guía axonal, mielinización, formación sináptica y maduración neuronal. Los astrocitos son las células más abundantes del tipo glial, producen muchos de los componentes de la matriz extracelular y factores neurotróficos en el sistema nervioso central que están involucrados en el crecimiento axonal y la proliferación neuronal. Además, se ha demostrado que los astrocitos expresan diversos subtipos de receptores para LPA (Spohr *et al.* 2011).

Finalmente, la relevancia de la señalización mediada por lípidos bioactivos en la neurogénesis adulta de la V-SVZ se ha evidenciado en un trabajo reciente. En éste, se hizo una caracterización de las NSC en la V-SVZ dividiéndolas en NSC quiescentes y NSC activadas. Las primeras son GFAP⁺CD133⁺ y las segundas GFAP⁺CD133⁺EGFR⁺. Ambas NSC muestran diferentes cinéticas de proliferación siendo las NSC activadas las que son capaces de formar neuroesferas mientras que las quiescentes raramente lo hacen. En este mismo estudio demuestran que S1P es un regulador clave del estado quiescente, ayudando al mantenimiento de éste. Finalmente, dentro de los genes diferencialmente expresados entre las NSC quiescentes y activadas se encuentra *Ppap2b/ LPP3*, cuya expresión es 5 veces mayor en las quiescentes que en las activas (Walker *et al.* 2013 & Codega *et al.* 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó, la LPP3 y varios de los receptores para LPA y S1P se expresan abundantemente en áreas neurogénicas. Existe evidencia de que al menos uno de los receptores de LPA está involucrado en el control de la neurogénesis del hipocampo adulto. Las células derivadas de animales deficientes de LPP3 muestran una reducción en el número y tamaño de neuroesferas formadas en comparación con las formadas de tejido proveniente de animales control. Estas observaciones sugieren fuertemente que la LPP3 podría participar en la neurogénesis del hipocampo adulto, tal vez regulando la proliferación y/o sobrevivencia de los progenitores neurales a través de modificaciones en la señalización de sus lípidos sustrato. Por lo anterior es necesario realizar estudios en la SGZ *in situ* para establecer el efecto de la ausencia de la LPP3 en la regulación de la neurogénesis del giro dentado *in vivo*.

3. HIPÓTESIS

La deficiencia de la enzima LPP3 en el cerebro adulto de ratón afectará la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, alterando la proliferación de precursores neurales, y la formación de neuroblastos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

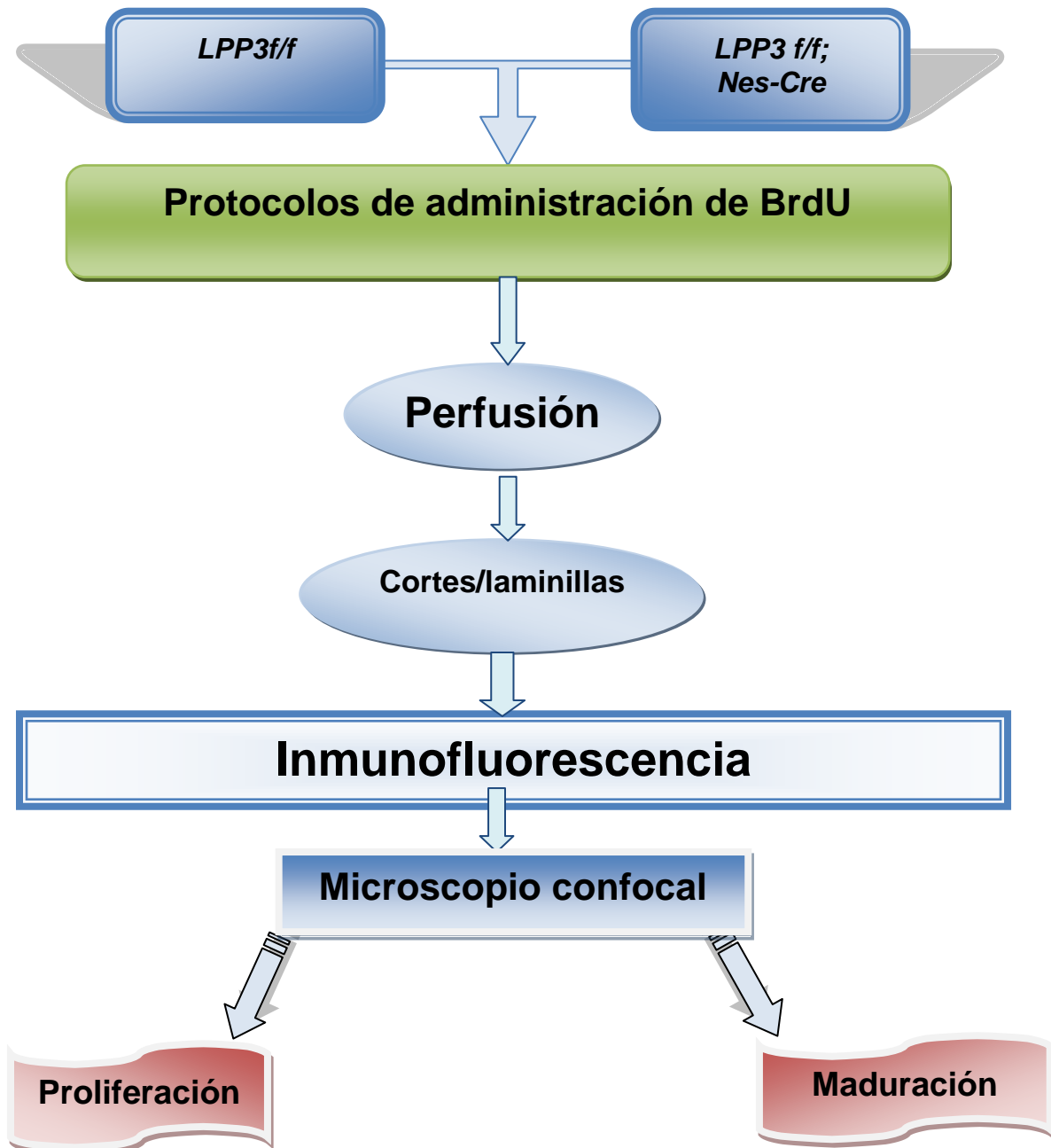
Evaluar la proliferación y maduración de los progenitores neurales en el giro dentado del hipocampo de ratón adulto que carece de la expresión de la LPP3 en el sistema nervioso *in vivo*.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar el(los) tipo(s) celular(es) que expresa(n) a la LPP3 en el giro dentado del hipocampo.
2. Comparar la capacidad proliferativa de los progenitores neurales de ratones silvestres y de ratones carentes de la LPP3 mediante la incorporación de BrdU *in vivo*.
3. Evaluar la formación y maduración de neuroblastos en la zona granular y SGZ del giro dentado en ratones carentes de LPP3.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Mapa metodológico



5.2 Animales

Para realizar la inactivación de la LPP3 en el cerebro, se usó el sistema Cre/*loxP*. Este sistema es una herramienta muy poderosa para generar KO condicionales o cepas reporteras. Este sistema requiere de dos componentes: 1) La recombinasa Cre, que es la enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios *loxP*; 2) la orientación y localización de los sitios *loxP* lo cual determina si la recombinación de Cre induce una delección, inversión o translocación (Nagy 2000). Se emplearon ratones que tenían flanqueados los exones 3 y 4 de la enzima LPP3 con una secuencia *loxP* (*Ppap2b^{floxed}*). Los exones 3 y 4 codifican para amino ácidos del segundo dominio transmembranal, la primera asa intracelular, el tercer dominio transmembranal, la segunda asa extracelular y 12 amino-ácidos del cuarto segmento transmembranal (Escalante-Alcalde *et al.* 2007).

Para lograr la delección tejido específica de LPP3, se hizo una cruce de ratones hembra homocigotos *Ppap2b^{floxed}* con ratones macho transgénicos *Nestina-Cre; Ppap2b^{floxed}*, por lo que la transcripción de Cre está bajo el promotor de Nestina, lo que asegura su expresión en los progenitores neurales del sistema nervioso desde el día 11 de gestación (Escalante-Alcalde *et al.* 2007).

Para confirmar la recombinación mediada por Cre, se hicieron genotipificaciones por PCR de DNA extraído de fragmentos de cola de crías de ratones provenientes de la cruce *Ppap2b^{floxed} X Nestina-Cre; Ppap2b^{floxed}*. Se usaron oligonucleótidos específicos para identificar ratones sin recombinación (en los cuales se preserva el sitio *loxP* huérfano, *Ppap2b^{floxed}*) y ratones mutantes con los exones escindidos (*Ppap2b^{deltafloxed}*) generando productos de 235 pb y de 162 pb, respectivamente. También se emplearon oligonucleótidos específicos para identificar Cre (Escalante-Alcalde *et al.* 2007).

También se trabajó con ratones hembra que expresan la EGFP bajo el promotor de GFAP (Tg(*Gfap-EGFP*)Ket) GFAP::EGFP, donación del Dr. Ataulfo Martínez Torres.

5.3 Marcaje con BrdU

Después de identificar los genotipos de los ratones, se usaron ratones macho de 8-10 semanas de edad. Los ratones hermanos de cada camada *Ppap2b^{floxed}* (llamados LPP3^{+/+} en adelante) se emplearon como controles. Se administró BrdU 50 mg/kg/inyección (Ver apéndice II) por vía intraperitoneal, tanto a ratones *Ppap2b^{deltafloxed}* (llamados LPP3^{-/-} en adelante) como a LPP3^{+/+} de acuerdo a los siguientes protocolos: A) En el primer protocolo de marcaje se administró BrdU en dosis única y 2 h después se sacrificó el ratón para la fijación del cerebro. B) En el segundo protocolo se administró BrdU 2 veces por día durante 4 días. Después de la última inyección se esperó 2 semanas para sacrificar el ratón y fijar el cerebro (Figura 5).

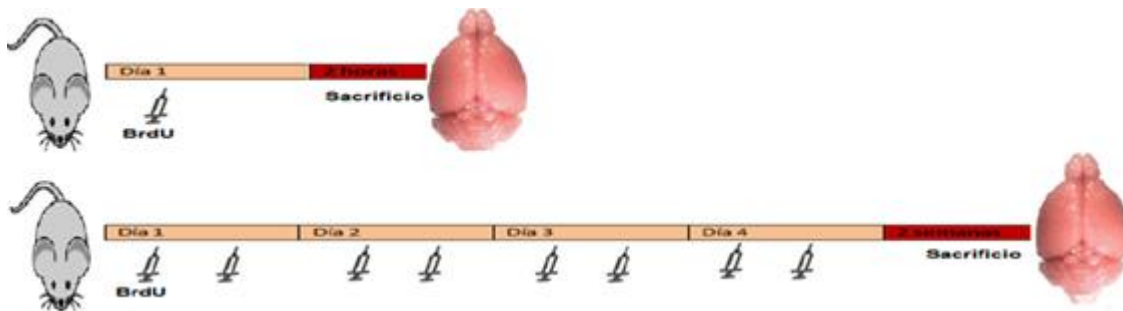


Figura 5. Protocolos de marcaje con BrdU.

5.4 Perfusión y fijación de los cerebros

Para poder realizar la fijación y disección del cerebro de ratón, se hizo una perfusión intracardiaca, para lo cual se realizó lo siguiente: el ratón se anestesió con Avertina 2% (Ver apéndice II), 15 μ l/gr peso por vía intraperitoneal. Una vez anestesiado, se abrió la caja torácica teniendo cuidado de no cortar alguna arteria o vena importante. Una vez expuesto el corazón, con un sistema de venoclisis se introdujo la aguja en el ventrículo izquierdo. Se cortaron las venas cavas para permitir la salida de líquido durante la perfusión y se dejó fluir de 20-25 ml de NaCl al 0.9 % por gravedad.

Posteriormente se procedió a fijar el animal con 20-25 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 (Ver apéndice II). Para que de esta manera se mantengan las características estructurales de la muestra necesarias para describir la distribución de moléculas específicas *in situ*. En este caso se usó PFA 4% el cual es la forma polimerizada del formaldehído (Daneshtalab *et al* 2010).

Subsecuentemente a la disección, se colocó el cerebro en 20 ml de PFA 4% durante 16 h a 4°C y después de lavados con PBS se pasó a sacarosa 30% (Ver apéndice II) hasta que sedimentara el tejido para ulteriormente poder ser cortados en el criostato.

5.5 Corte y montaje de las secciones de cerebro

Se realizaron cortes coronales de 40 µm de grosor de cada cerebro con el criostato Leica CM 1850. Los cortes de hipocampo, desde la zona anterior hasta la región más posterior, fueron recolectados en placas de 6 pozos con PBS 1X pH 7.4, usando el método fraccionador. En éste, cada uno de los cortes se van colocando en cada uno de los 6 pozos, de tal forma que el primer corte se coloca en el primer pozo, el segundo corte en el segundo pozo y así sucesivamente hasta el sexto corte en el último pozo. El séptimo corte se coloca en el primer pozo y se vuelve a repetir el ciclo hasta terminar el hipocampo. Al usar este método, cada pozo contiene una muestra representativa del todo el giro dentado y cada uno puede ser usado para propósitos de cuantificación usando el método de Cavalieri (Encinas & Enikolopov 2008).

Los cortes que se almacenaron por más de una semana se guardaron a 4°C en PBS 1X pH 7.4 con PFA 0.01%. Antes de realizar la inmunofluorescencia se montaron los cortes de cada pozo en una sola laminilla (*SuperfrostPlus*, VWR) de tal forma que cada laminilla contenía cortes representativos de todas las zonas del hipocampo. En total se obtuvieron 6 laminillas por ratón las cuales se emplearon para los análisis de los diferentes marcadores como se describe a continuación.

5.6 Inmunofluorescencia

En la técnica de inmunofluorescencia se utilizan anticuerpos para poder detectar antígenos específicos (Odell & Cook 2013).

En este trabajo se usó la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la cual el anticuerpo primario se une al antígeno, después un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo reconoce el dominio Fc del anticuerpo primario. La ventaja en el uso de esta técnica es que es más sensible, ya que se amplifica la señal fluorescente (Odell & Cook 2013).

Las laminillas primero se lavaron con PBS 1X, posteriormente se hizo un desenmascarado de antígenos con el buffer de citratos *Antigen Unmasking Solution* (Vector, H-3300) en una olla express por 6 minutos 30 segundos. Esto nos permitió aumentar la exposición de los antígenos a los anticuerpos (Daneshtalab *et al* 2010). Después de la incubación con citratos, se procedió a lavar nuevamente con PBS 1X pH 7.4 para remover el citrato, se incubaron las muestras en glicina 0.1 M/PBS pH 7.4 por 15 minutos a temperatura ambiente, nuevamente se lavó con PBS 1X pH 7.4 para remover la glicina y posteriormente se bloqueó 1 h con la siguiente solución de bloqueo: *blocking reagent solution* 1% (Roche) con Triton X-100 al 0.2% en PBS 1X pH 7.4. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo y se incubaron durante 24 h a 4°C (Ver tabla 1). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se hicieron 3 lavados de 10 min. cada uno con PBS 1X pH 7.4 para remover el anticuerpo primario y se colocaron los anticuerpos secundarios por 2 h a temperatura ambiente (Ver tabla 1). Nuevamente se hizo el lavado de los anticuerpos secundarios, para finalmente incubar con Hoechst 1 µg/ml por 15 minutos a temperatura ambiente. Se removió el Hoechst con PBS 1X pH 7.4 y se procedió a montar las laminillas usando *Vectashield* (Vector) como medio de montaje. Las laminillas montadas se dejaron secar y se sellaron para posteriormente ser observados en los Microscopios Confocales Olympus FV1000, Olympus FV10 y Leica TCS-SP5. En ocasiones las

laminillas fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon ECLIPSE Ti.

A lo largo de los diferentes protocolos se usó BrdU, debido a que es un nucleótido sintético análogo de la timidina, el cual es muy usado en ensayos de proliferación celular. La BrdU es incorporada al DNA de las células en división durante la fase S del ciclo celular. El desarrollo de anticuerpos específicos contra BrdU ayuda a la detección de DNA sintetizado *de novo*. Por este motivo el uso de BrdU ha sido una herramienta eficaz para evaluar el proceso neurogénico (Cavanagh *et al.* 2011). Es importante mencionar que para la inmunodetección de BrdU se usó el siguiente protocolo: después de haber realizado la inmunofluorescencia contra los diferentes marcadores, se procedió a realizar la inmunofluorescencia contra BrdU utilizando el *BrdU Labeling and Detection Kit* de Roche. El anti-BrdU se diluyó 1:100 en la solución de incubación (la cual contiene nucleasa) según las indicaciones del fabricante y se dejó incubando 45 minutos a 37°C. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS 1X, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína 1:100 por 45 minutos a 37°C, seguido de lavados con PBS 1X. Finalmente el tejido se incubó con Hoechst para marcar los núcleos celulares y se procedió al montaje de las laminillas como se describió anteriormente.

Para estudiar la expresión de la LPP3 en ratones GFAP::EGFP, se realizaron modificaciones a la técnica de inmunofluorescencia. Antes de montar las laminillas se colocaron a 50°C por 2 h en buffer de citratos a pH 6, ya que el desensamblado en una olla express produjo la pérdida de la fluorescencia de EGFP. Después se procedió a lavar con PBS 1X, se bloqueó 1 h y se incubó con los anticuerpos primarios y secundarios respectivos, todo en placas de 4 pozos, después de incubar con Hoechst, los cortes se montaron en laminillas, se sellaron y observaron en el microscopio.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en este trabajo.

Anticuerpos primarios		
Anticuerpo	Dilución	Fuente
Anti-BrdU	1:100	Roche, 11296736001, ratón
Anti-LPP3	1:400	SIGMA, conejo
Anti-DCX	1:400	Santa Cruz biotechnology, sc-8066, cabra
Anti-EDG1	1:3000	Santa Cruz biotechnology, sc-25489, conejo
Anti-GAPDH	1:4000	Millipore, MAB374, ratón
Anticuerpos secundarios		
Anticuerpo	Dilución	Fuente
Anti-conejo 594	1:500	Alexa Fluor A21442, pollo
Anti-cabra 568	1:500	Alexa Fluor A11057, burro
Anti-ratón FITC	1:100	Roche, 11296736001, oveja
Anti-conejo-HRP	1:5000	Santa Cruz biotechnology, sc-2030, cabra
Anti-ratón-HRP	1:5000	Santa Cruz biotechnology, sc-2031, cabra

5.7 Obtención de extractos celulares

Para obtener extractos del hipocampo, primero se perfundió al ratón con solución salina al 0.9%, como se indicó anteriormente. Después con la ayuda de un estereoscopio, se separó el hipocampo del resto del cerebro para poder ser homogeneizado por acción mecánica en un tubo Eppendorf en buffer de lisis (Ver apéndice II) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.8 Western Blot

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida. Variando la cantidad de ambas sustancias obtenemos geles de diferente grado de reticulación, es decir de diferente diámetro de poro.

En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales, que al agregarle bis-acrilamida, da lugar a la formación de puntos de ramificación en el polímero lo que permite la formación de una matriz tridimensional, la poliacrilamida. El agente iniciador de la polimerización es el radical persulfato de amonio que activa a la tetrametil etilenodiamina (TEMED), el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice.

En esta técnica de electroforesis se utilizó la modalidad desnaturalizante que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Además, se utiliza azul de bromofenol como colorante y sirve de referencia para poder seguir el avance de las muestras durante la corrida.

Primero se lavaron perfectamente las placas de vidrio y se preparó el gel separador, que es un gel de poliacrilamida al 10% (Ver apéndice II), inmediatamente después de haber agregado el gel separador, se le añadió una pequeña cantidad de butanol encima de éste. Una vez que polimerizó el gel se lavó con agua tridestilada para remover totalmente el butanol, y se secó con un papel de filtro. Después se añadió el gel concentrador al 3.9% de poliacrilamida (Ver apéndice II). Una vez agregado el gel de empaquetamiento, y antes que polimerice se insertó el peine para poder formar los carriles donde se van a colocar las muestras. Después de la polimerización se retiraron los peines de los geles y se colocaron en una cámara de electroforesis, la cual se llenó con el buffer de corrida (Ver apéndice II), quedando listo para la aplicación de las muestras.

Las muestras se diluyeron en buffer de carga 6X y se hirvieron por 5 minutos, para agregar 20 μ l de volumen final en cada carril del gel. La concentración de la proteína fue de 40 μ g.

La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 100 voltios durante 3 h; posteriormente las proteínas se transfirieron en frío a membranas de fluoruro de

polivinilideno con un voltaje constante de 30 V durante 16 h dentro de una solución de Tris-HCl 20 mM, glicina 0.19 mM y metanol al 20%.

Posteriormente las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con leche en buffer TBS-Tween (Ver apéndice II) en agitación constante y a temperatura ambiente y después se incubaron con los primeros anticuerpos diluidos en solución de bloqueo, durante toda la noche, con agitación constante a 4 °C. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno, con buffer TBS-Tween. Después se incubaron durante 1 h con anticuerpo secundario diluido con la solución de bloqueo y luego se realizaron otros tres lavados. Finalmente las membranas de nitrocelulosa se expusieron 5 minutos al sistema de inmunodetección quimioluminiscente (ECL, *Western Blotting Analysis System*) en presencia de un film de autorradiográfico. Los film revelados se emplearon para los análisis.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación del tipo celular que expresa la LPP3 en el giro dentado del hipocampo.

Cabe mencionar, que al comienzo de este proyecto se hicieron estandarizaciones de la técnica de inmunofluorescencia, desde el tiempo de fijación, los cortes y montaje de los tejidos. Se probaron diferentes formas de desenmascarado de antígenos y se llegó al que se describió anteriormente en la metodología. Todo esto para obtener muestras que se puedan analizar adecuadamente como las mostradas en Material Suplementario I.

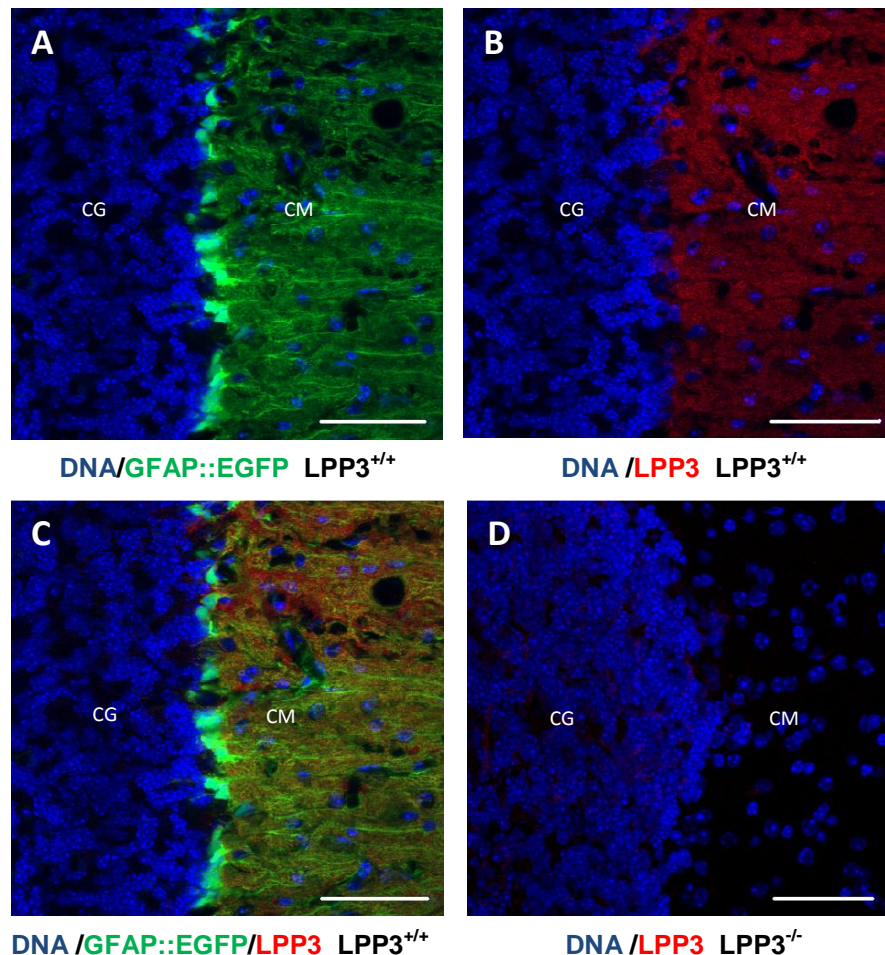


Figura 6. Expresión de la LPP3 en la glía de Bergmann. Inmunofluorescencias contra LPP3 en el cerebelo de un ratón reportero que expresa la GFAP::EGFP (A-C) y en un ratón LPP3^{-/-} (D). CG: capa granular. CM: capa molecular. Barra= 50 μ m.

Para poder identificar si las NSC del giro dentado expresan la LPP3, se usó un ratón transgénico reportero que expresa la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de la GFAP. Inicialmente realizamos inmunofluorescencias control en los cerebelos de los ratones adultos ya que la LPP3 se expresa muy abundantemente en la glía de Bergmann, la cual expresa también GFAP. Se observó que en los cortes de cerebelo efectivamente había una amplia expresión de la EGFP en la glía de Bergmann (Figura 6 A). Al realizar la inmunofluorescencia contra la LPP3 sobre este mismo tejido (Figura 6 A-C), se observó una colocalización de la señal de la EGFP con la de LPP3 (Figura 6 C). Estos resultados corroboraron lo encontrado por López-Juárez *et al.* 2011, donde observaron una colocalización de LPP3 con el transportador de glutamato Glast, el cual se expresa abundantemente en la glía de Bergmann. El uso del anticuerpo anti-LPP3 fue específica, ya que en cerebelos de ratones LPP3^{-/-} no se observó expresión de la enzima en componentes de origen neural (Figura 6 D).

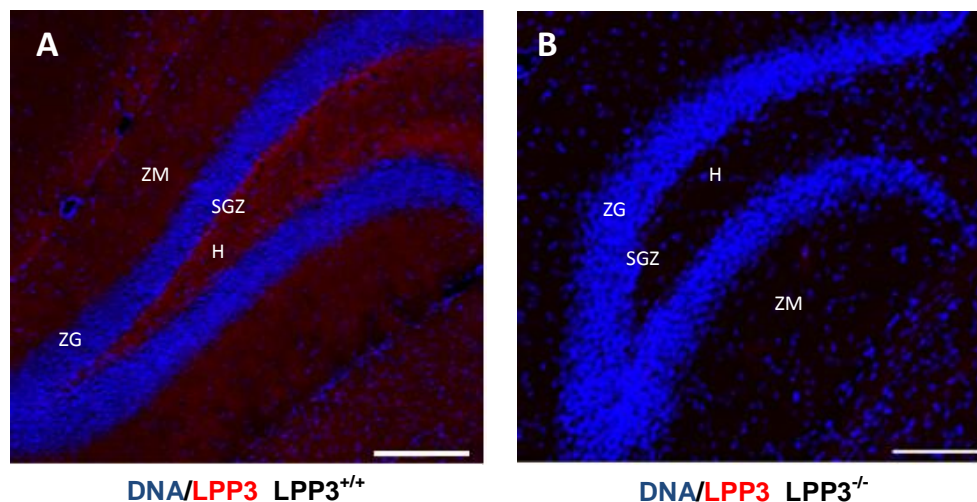


Figura 7. Expresión de la LPP3 en el giro dentado del hipocampo. (A) Inmunofluorescencias contra LPP3 en el giro dentado de un ratón LPP3^{+/+} y (B) en un ratón LPP3^{-/-}. ZM: zona molecular. ZG: zona granular. SGZ: zona subgranular. H: hilio. Barras: 100 µm.

A continuación se hizo una inmunofluorescencia contra LPP3 en cerebros de ratones LPP3^{+/+} para estudiar la expresión de la LPP3 en el hipocampo, y en ratones LPP3^{-/-} para analizar la eficiencia de la delección de la LPP3 en el giro

dentado del hipocampo (Figura 7 A-B). La expresión de la enzima solo se observó en los ratones condicionales mientras que en los mutantes la expresión en tejido neural fue negativa, lo que nos asegura que los animales carecen de la enzima en el tejido de interés.

Para determinar si la LPP3 se expresa en las células RGL, las cuales expresan GFAP, realizamos inmunofluorescencias contra la LPP3 en el giro dentado del hipocampo de ratones GFAP::EGFP. Como se puede observar en la Figura 8 A, las RGL se pueden identificar en este ratón reportero por sus características particulares: su soma es de forma triangular y se localizan en la zona subgranular y tienen un proceso radial que atraviesa la capa granular (Figura 8 A, flechas). Como se mencionó, la LPP3 está ampliamente expresada en el giro dentado (Figura 8 B-D), sin embargo fue posible observar expresión de la enzima en células RGL (Figuras 8 B-D, flecha amarilla e inserto). Es importante notar que no en todas las células RGL se observó colocalización con la LPP3 (Figura 8 B-D, flecha blanca), esto quizá indicaría que existe otra población de células RGL, unas que expresan y otras que no expresan la LPP3.

Además, como se puede observar en la figura 8 A (punta de flecha), no todas las NSC GFAP⁺ son del tipo RGL. Estas células, llamadas tipo 2, tienen procesos tangenciales y un núcleo alargado localizado en la SGZ, están mitóticamente activadas y son las que darán lugar a las IPCs después de una división asimétrica. Una célula con las características morfológicas mencionadas se puede ver en la Figura 8 C-D (punta de flecha) la cual es GFAP⁺ y expresa a la LPP3. Con base en lo anterior la LPP3 se expresa en NSC RGL y no-RGL (tipo 2).

Aunque la expresión de la LPP3 está en todo el giro dentado, se puede observar que la mayor expresión se encuentra alrededor de los núcleos de la SGZ y en el hilio (Figura 8 C) Algunos núcleos corresponden a NSC GFAP⁺, sin embargo se pudieron detectar en esta zona otras células con abundante expresión de la LPP3, que expresan débilmente al reportero GFAP::EGFP, lo que sugiere que éstas pueden corresponder a otro tipo celular. Datos previos del laboratorio descartaron que la enzima se exprese en neuroblastos, por lo que es más

probable que dichas células correspondan a IPCs. Actualmente se están realizando experimentos para confirmar esta hipótesis.

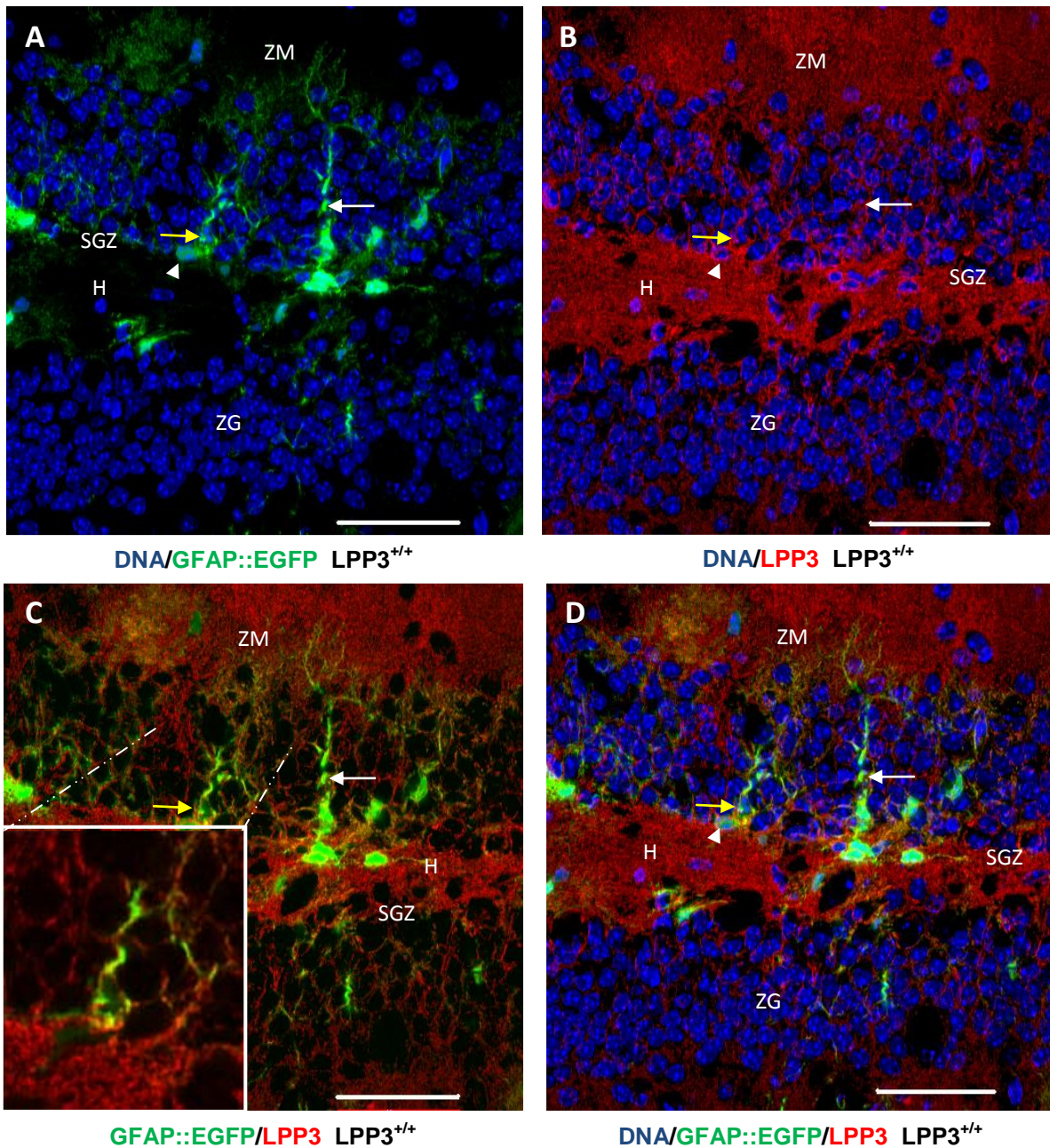


Figura 8. Expresión de la LPP3 en células NSC RGL y no-RGL en el giro dentado. Inmunofluorescencias usando el anticuerpo anti-LPP3. Las células RGL se localizan en la SGZ en verde (A, C, D) debido a la expresión de la proteína GFAP::EGFP. Expresión de la LPP3 (B-D) en el giro dentado y su colocalización con la proteína GFAP (C-D). ZM: zona molecular. ZG: zona granular. SGZ: zona subgranular. H: hilio. Flecha blanca y amarilla: RGL. Cabeza de flecha: células no-RGL. Inserto (C) NSC-RGL que es GFAP⁺/LPP3⁺. Barras: 50 μm.

6.2 Comparación de la capacidad proliferativa de las células progenitoras intermedias de ratones $LPP3^{+/+}$ y $LPP3^{-/-}$ mediante la incorporación de BrdU.

Para analizar si la deficiencia de la expresión de la LPP3 afecta las propiedades proliferativas de las NSC y/o progenitores neurales se requirió administrar BrdU a ratones de ambos genotipos. Para analizar efectos en las NSC, las cuales se dividen muy lentamente, hay que administrar la BrdU por periodos prolongados, mientras que para los IPCs solo se requiere dar un pulso de 2 h ya que su tasa de proliferación es muy elevada. Por cuestiones de tiempo de análisis, en este trabajo nos enfocamos a estudiar los efectos de la carencia de la LPP3 sobre los IPCs (Figura 9 A-B), aunque también se prepararon animales para estudiar los efectos sobre las NSC.

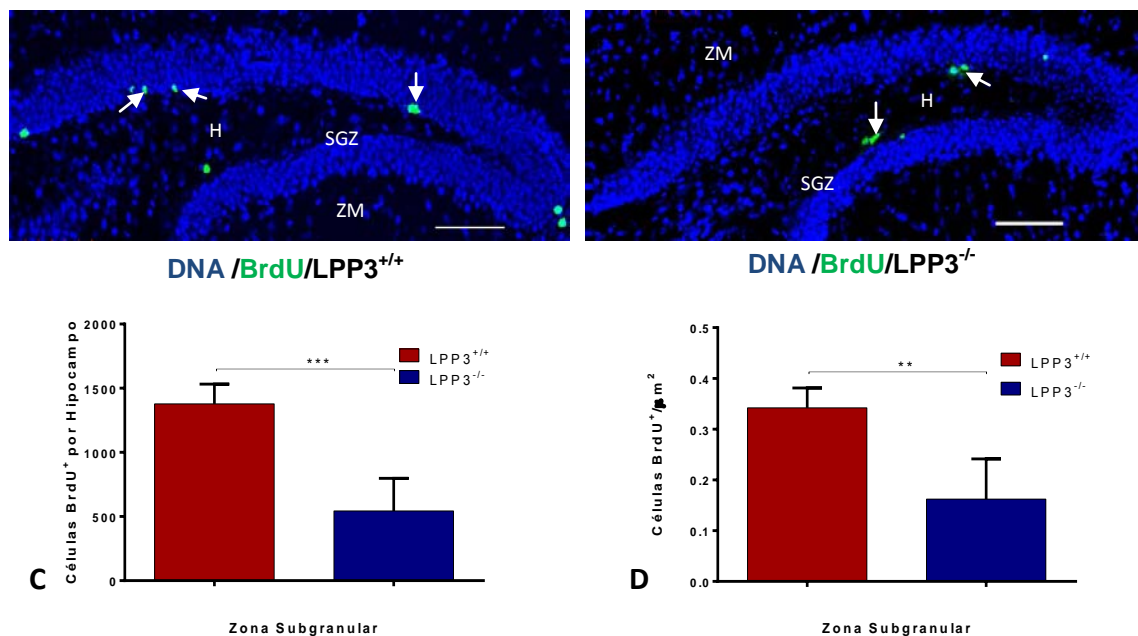


Figura 9. Decremento de células BrdU⁺ en el giro dentado del hipocampo de ratones $LPP3^{-/-}$. Cuantificación de células BrdU⁺ en la SGZ usando el primer protocolo. n=5 (A-D). Imágenes representativas de células BrdU⁺ en el giro dentado del hipocampo de ratones silvestres (A) y mutantes (B). Extrapolación del número total de células BrdU⁺ en la SGZ del hipocampo (C). Densidad celular usando el principio de Cavalieri (D). ZM: zona molecular. ZG: zona granular. SGZ: zona subgranular. H: hilio. Flechas: células BrdU⁺. Barras: 100 μm.

Se cuantificó el número de células BrdU⁺ localizadas en la SGZ de una muestra representativa del hipocampo (una laminilla/individuo) y se multiplicó por 6, lo cual corresponde al número de laminillas obtenidas por individuo. El resultado es una extrapolación del número total de células en proliferación en esta zona por hipocampo (Figura 9 C). Como se puede observar en los individuos LPP3^{-/-} se registró una reducción de 60.5% de células en proliferación respecto a los individuos control. Dado que los cerebros de los mutantes son mas pequeños, para descartar que las diferencias observadas se hubieran debido a esto, se realizó un análisis empleando el principio de Cavalieri para corregir por las diferencias del volumen entre los hipocampos (Figura 9 D). Con este enfoque, el porcentaje de reducción fue menor entre ambos genotipos (50.1%), sin embargo las diferencias continuaron siendo significativas.

También se realizó la cuantificación del número de células BrdU⁺ que no se localizaron en la SGZ (zona granular, hilio y molecular) para determinar posibles efectos en la proliferación de astrocitos. Usando el análisis del método fraccionador no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes zonas (Material Suplementario SII). Tampoco hubo diferencias significativas cuando se hizo la extrapolación del número total de células BrdU⁺ por hipocampo en sus diversas zonas (Material Suplementario SIII). Sin embargo, al aplicar la corrección por volumen usando el método de Cavalieri, se observó una diferencia estadísticamente significativa solo en la región del hilio (Figura 10), aunque en las otras zonas se observó también una tendencia a la baja en individuos mutantes.

Al comparar el número total de células BrdU⁺ en giros dentados mutantes contra controles (Material Suplementari SIV) se observa que existe un diferencia significativa entre ambos genotipos empleando las tres formas de cuantificación. Esto se puede explicar por una mayor contribución a la diferencia en el número de células BrdU⁺ proveniente de las células en la SGZ. En conjunto estos resultados sugieren que la deficiencia de la LPP3 también afecta la proliferación de astrocitos aunque de una manera más discreta (reducción entre 22 y 38%).

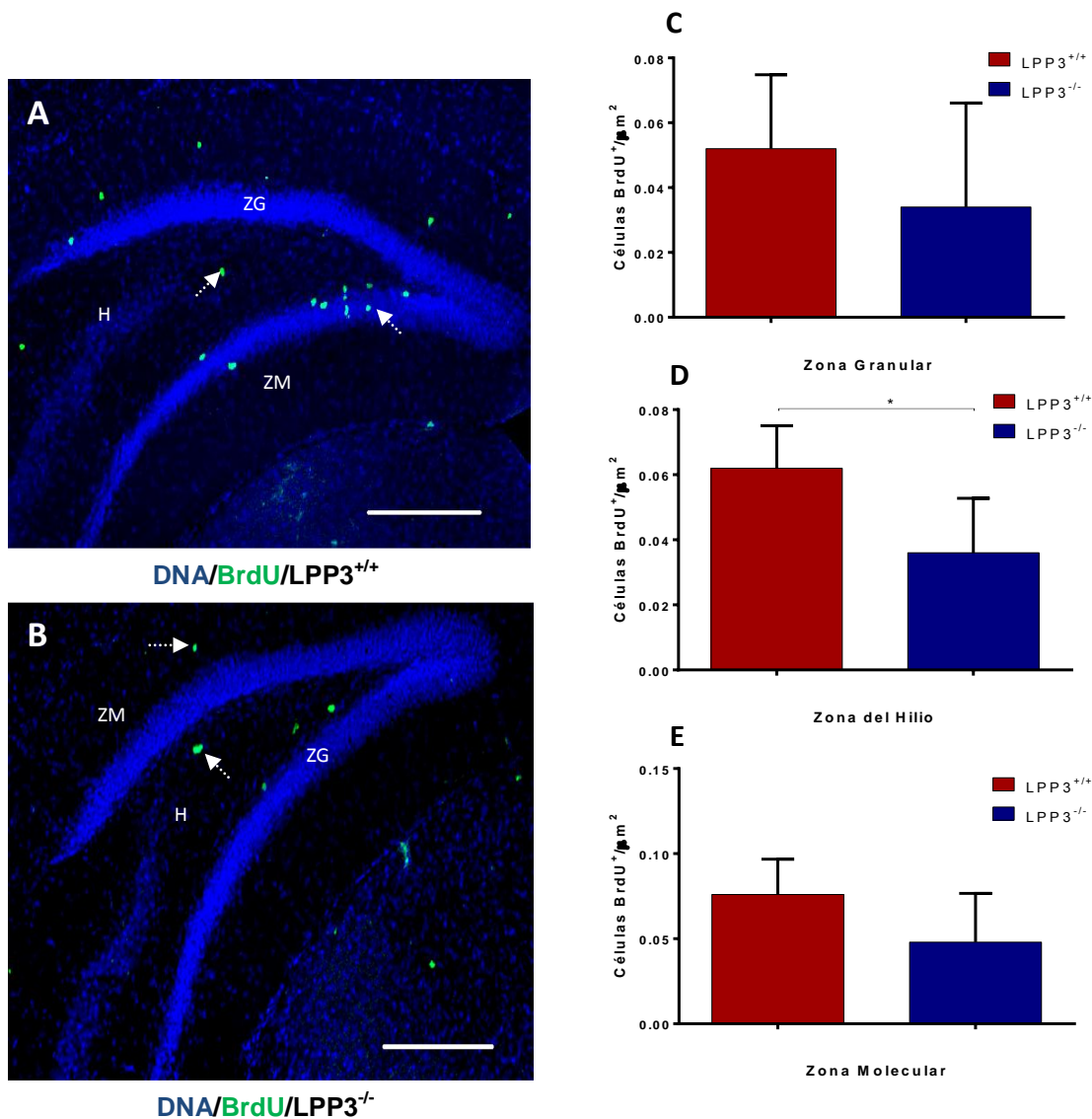


Figura 10. Reducción de la proliferación de otros linajes celulares en el giro dentado del hipocampo LPP3^{-/-}. Cuantificación de células BrdU⁺ en la zona granular, del hilio y molecular. n=5 Imágenes representativas de células BrdU⁺ en el giro dentado del hipocampo de ratones silvestres (A) y mutantes (B). Gráficas donde se muestra la densidad celular en la zona granular (C) en el hilio (D) y en la zona molecular (E). ZM: zona molecular. ZG: zona granular. H: hilio. Flechas: células BrdU⁺. Barras: 300 µm.

6.3 Efectos de la deficiencia de LPP3 en el linaje neuronal del hipocampo.

Debido a que los IPCs se pueden diferenciar hacia el linaje neuronal o al linaje glial, nosotros quisimos evaluar si existía una deficiencia en la capacidad de diferenciación de estas células LPP3^{-/-}, por lo que decidimos emplear un protocolo de marcaje con la BrdU más prolongado junto con el marcador DCX, para marcar

neuroblastos que provienen de IPCs que proliferaron y se comprometieron hacia el linaje neuronal.

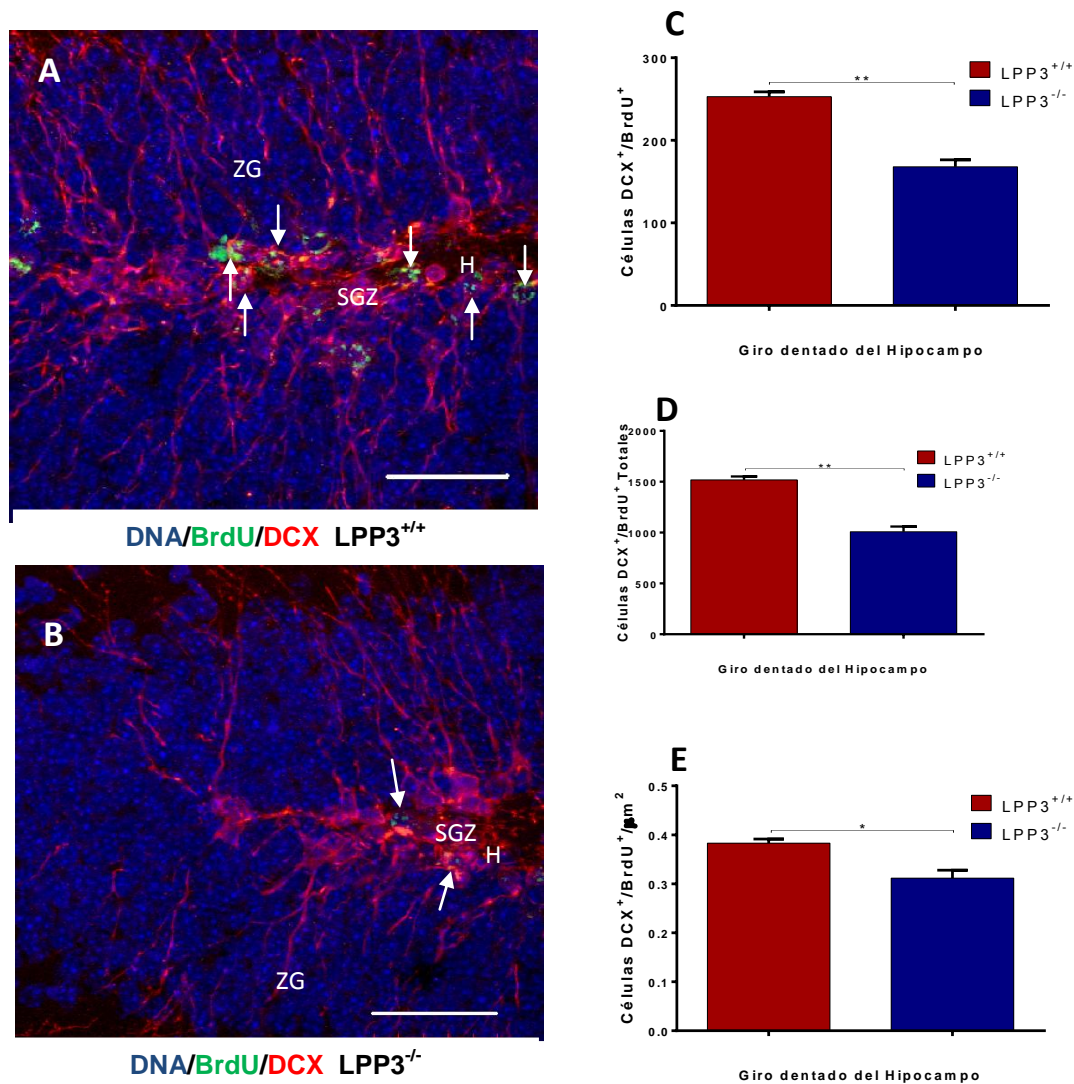


Figura 11. Decremento de neuroblastos/BrdU⁺ en el giro dentado mutante. Cuantificación de células DCX⁺/BrdU⁺ en el giro dentado del hipocampo. n=2. Imágenes representativas en el ápice del giro dentado del hipocampo de ratones silvestres (A) y mutantes (B). Gráficas donde se muestra cuantificación representativa de neuroblastos/BrdU⁺ por hipocampo (C), extrapolación de células DCX⁺/BrdU⁺ totales por hipocampo (D) y densidad de células DCX⁺/BrdU⁺ por hipocampo (E). ZG: zona granular. SGZ: zona subgranular H: hilio. Flechas: células DCX/BrdU⁺. Barras: 50 µm.

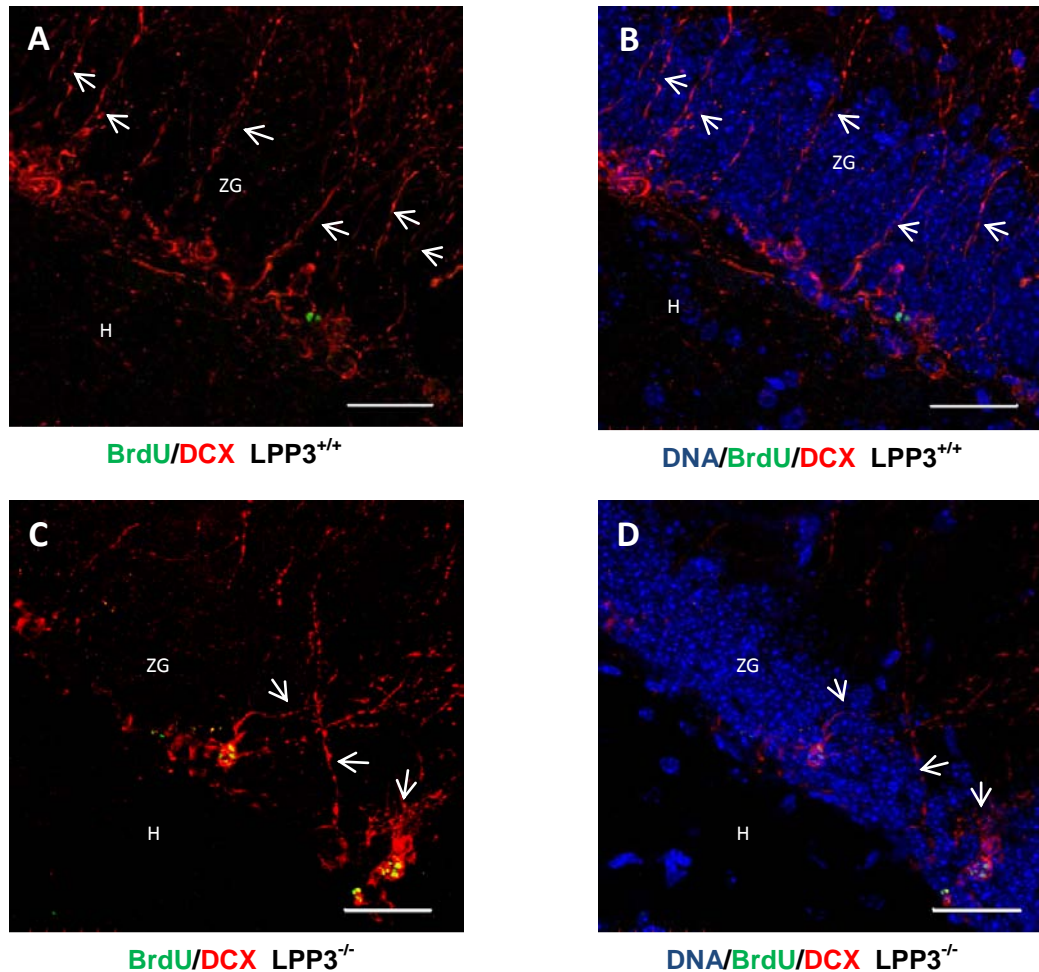


Figura 12. Alteración en la morfología de neuroblastos en el giro dentado del hipocampo. Imágenes representativas de células DCX⁺ en el giro dentado del hipocampo de ratones silvestres (A-B) y mutantes (C-D). En las figuras A y C solo se ve DCX. ZG: zona granular. H: hilio. Las flechas indican la orientación del árbol dendrítico a través de la capa granular. Barras: 50 μm.

Empleando el segundo protocolo de marcado con BrdU (Figura 5), se cuantificaron todas las células del giro dentado que fuesen DCX⁺/BrdU⁺ (Figura 11 A-B). Los resultados indican una disminución en la cantidad de células DCX⁺/BrdU⁺ en ratones LPP3^{-/-} (Figura 11 C-E). Ya sea por cuantificación de una muestra representativa por hipocampo/individuo (Figura 11 C); haciendo una extrapolación para calcular el número total de células DCX⁺/BrdU⁺ en todo el hipocampo por individuo (Figura 11 D) cuya reducción fue del 33.5%, o empleando el principio de Cavalieri para quitar el factor de que el cerebro del ratón mutante es más pequeño y la diferencia significativa de neuroblastos/BrdU⁺ sea debido al

tamaño del hipocampo (Figura 11 E) donde la reducción fue de 18.7%. Aun quitando el factor de diferencias de volumen de los cerebros de ambos genotipos, las diferencias siguen siendo significativas. Estos resultados muestran que la deficiencia de la LPP3 disminuye el número de neuroblastos formados en el giro dentado del hipocampo.

Durante el análisis de las imágenes para la cuantificación celular, observamos que en los hipocampos deficientes de la LPP3 se presentaron alteraciones en la morfología y localización de neuroblastos. Como se ha mencionado anteriormente, los neuroblastos extienden su árbol dendrítico a través de la capa granular (Figura 12 A-B, flechas), el cual es importante para generar sinapsis con los axones de la vía perforante, que es un factor para la maduración de las nuevas neuronas que se van a generar. Además de la disminución del número de células DCX⁺ en el ratón LPP3^{-/-}, su proceso dendrítico se ve frecuentemente alterado ya que algunos neuroblastos no atraviesan la capa granular o no lo hacen de forma perpendicular a esta (Figura 12 C-D).

Así mismo, se observó una localización ectópica de neuroblastos en el hipocampo de ratones LPP3^{-/-} (Figura 13 A-D, flechas). Si bien es cierto que los neuroblastos migran a través de la capa granular del giro dentado durante su proceso de maduración, estos deben establecerse en esta zona para una correcta interacción con las diferentes células que forman el circuito hipocampal. Nosotros detectamos neuroblastos ectópicos en el hilio y la zona molecular del hipocampo (Figura 13 A y C) o en el borde de la zona granular y la molecular (Figura 13 B y D). Hasta el momento no se han encontrado células con estas características en hipocampos LPP3^{+/+}. Estos resultados sugieren que la LPP3 podría estar regulando la morfología, migración y por lo tanto la función de algunos neuroblastos en el giro dentado. Sin embargo, se necesita un análisis más extensivo para observar la frecuencia de aparición de neuroblastos ectópicos en ratones mutantes comparando con los control.

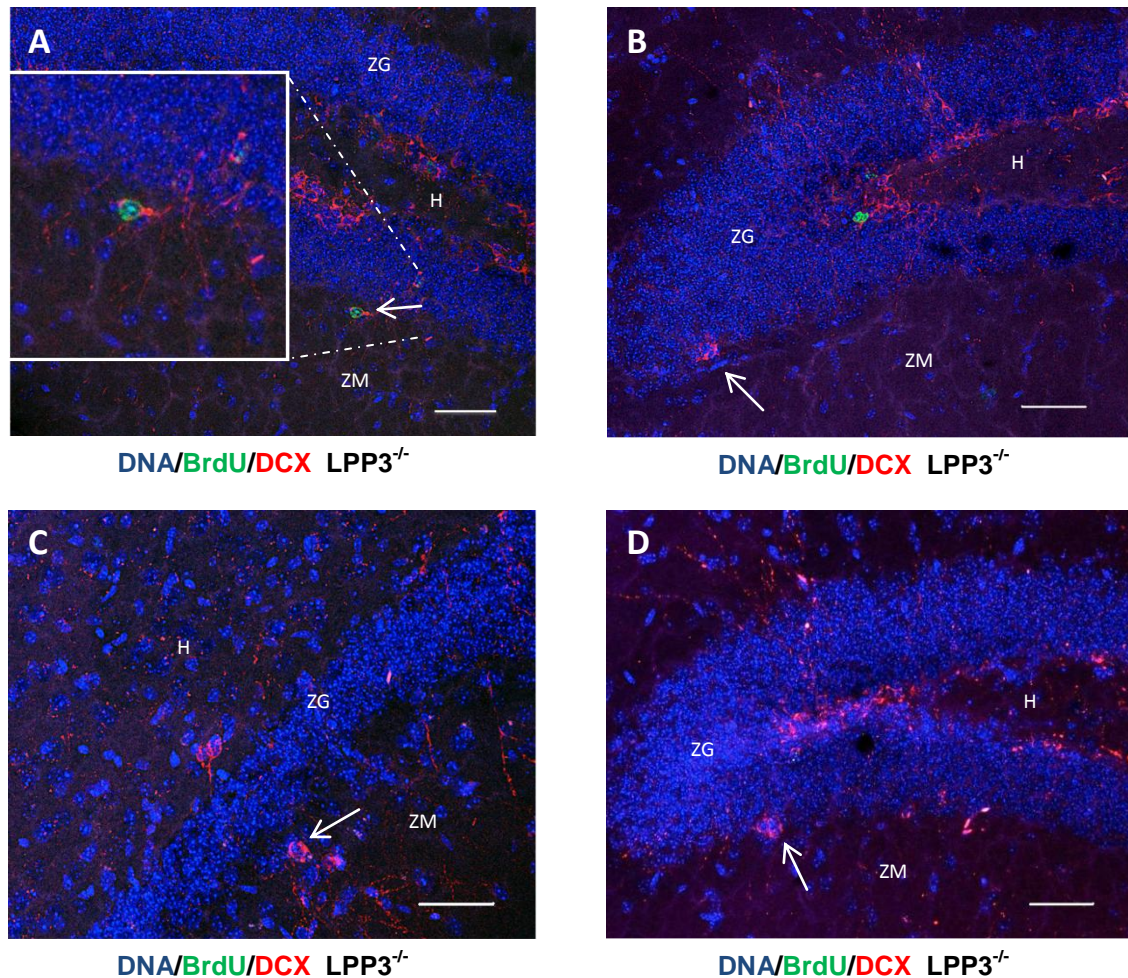


Figura 13. Alteración en la ubicación de neuroblastos de ratones *LPP3*^{-/-} en el giro dentado. Imágenes representativas de células DCX⁺ en el giro dentado del hipocampo de ratones mutantes (A-D). Se observan células DCX⁺ en la capa molecular (A, C) del giro dentado y algunas son DCX⁺/BrdU⁺ (A), ZG: zona granular. H: hilio. ZM: zona molecular. Las flechas indican células DCX⁺ ectópicas en ratones *LPP3*^{-/-}. Barras: 100 μm.

6.4 Desregulación del S1P₁ en hipocampos carentes de LPP3

Como ya se ha mencionado, la S1P ejerce su acción a través de sus RAPG. Unos de estos receptores que se encuentra expresado en el giro dentado del hipocampo es el S1P₁ (Ver apéndice I). Con base en resultados previos de López-Juárez *et al.* 2011, en los que muestran que la carencia de LPP3 en el cerebelo produce una desregulación de este receptor, decidimos comprobar si pasaba algo similar en el hipocampo de ratones *LPP3*^{-/-}. También se analizó el ventrículo, debido a que es

la otra zona donde ocurren procesos neurogénicos y también existe expresión de la LPP3 (datos no mostrados).

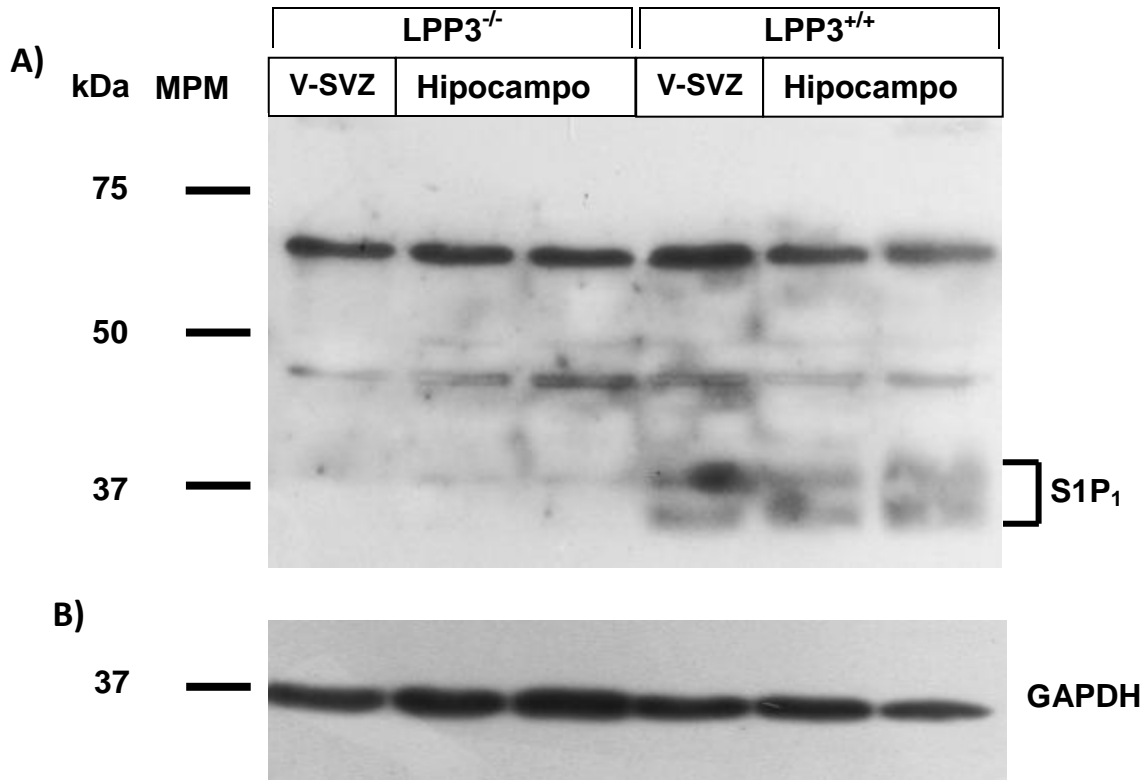


Figura 14. Expresión del receptor 1 de S1P en tejidos silvestres y mutantes. (A) Expresión del S1P₁ en la V-SVZ y el hipocampo (B) Control de carga.

Con la ayuda de la técnica del laboratorio Dra. Valeria Martínez, se hizo un western blot con extractos proteicos de hipocampos y ventrículos LPP3^{+/+} y de LPP3^{-/-}. Se utilizó un anticuerpo anti-Edg-1 (S1P₁) para ver si existía alguna diferencia en la expresión de este receptor entre ambos genotipos.

Como se puede observar en la figura 14, se observó la expresión del receptor en la V-SVZ y en los hipocampos silvestres mientras que en los individuos mutantes no se encontró o estaba muy disminuido. Un resultado similar se ha obtenido al menos en una segunda ocasión en hipocampos. De ser consistente, estos resultados sugieren que la deficiencia de la LPP3 en el hipocampo desregula la expresión del receptor S1P₁.

7. DISCUSIÓN

Ya se ha mencionado que la LPP3 es importante para el desarrollo embrionario. En el desarrollo del sistema nervioso central y periférico se expresa en la zona ventral del tubo neural en E8.5 y en la gestación media se expresa en el sistema nervioso periférico (Escalante-Alcalde *et al.* 2003, Escalante-Alcalde *et al.* 2011). En etapas adultas se encuentra abundantemente expresada en el cerebelo, el bulbo olfatorio, la corriente de migración rostral y el sistema ventricular (López-Juárez *et al.* 2011). A pesar de que la LPP3 se expresa en regiones neurogénicas incluyendo el giro dentado (López-Juárez *et al.* 2011, Miller *et al.* 2013; Apéndice I) hasta ahora no se había estudiado el tipo celular en el que se expresa esta enzima en el hipocampo, más específicamente en el giro dentado.

Nosotros demostramos, mediante inmunofluorescencia contra LPP3 en ratones transgénicos GFAP::EGFP, que la LPP3 se expresa en las NSC de la SGZ del giro dentado del hipocampo (Figura 7) tanto en células con características radiales como no-radiales que expresan GFAP-EGFP. Sorprendentemente encontramos NSC radiales que no expresaron evidentemente LPP3 lo que podría sugerir que existen dos poblaciones de NSC radiales. Un trabajo que apoya la existencia de dos tipos de NSC se describió recientemente estudiando la V-SVZ. En éste caracterizaron una población de NSC quiescentes (NSCq) GFAP⁺, CD133⁺ y otra de NSC activadas (NSCa) caracterizadas por la expresión de GFAP⁺, CD133⁺ y EGFR⁺. Además se encontró que las NSCq tienen 5 veces mayor expresión de LPP3 que las NSCa (Codega *et al.* 2014). Dado que las NSC comparten características similares en ambos nichos sería interesante especular que las NSC RGL que no expresan LPP3 corresponden a NSC activadas. Una mejor caracterización de estas dos poblaciones podría realizarse en el futuro.

Además de las NSC, se observó expresión de la LPP3 en astrocitos típicos y en otros componentes que aparentemente no expresan GFAP-EGFP o que la expresan débilmente. Creemos que estos últimos son una subpoblación de

astrocitos con características no típicas como se ha descrito recientemente en estudios de RNA-seq de célula única. En dicho trabajo observaron dos subclases de astrocitos, unos típicos que expresan GFAP (clase I) y otros que expresan Mfge8 (clase II), ambos subtipos expresan la LPP3 (Zeisel *et al.* 2015). Estos resultados apoyan nuestra idea de que la LPP3 está ampliamente expresada en el hipocampo en astrocitos, aunque habría que corroborar esta hipótesis empleando marcadores de astrocitos clase II dos o para otros tipos celulares.

Nuestros datos mostraron que la LPP3 es importante para la proliferación de las IPCs las cuales fueron marcados preferentemente usando un pulso de BrdU de 2 h (Duan *et al.* 2008). Aunque con sólo la marca de BrdU nosotros no podemos demostrar tajantemente que sean específicamente IPCs las células que estemos marcando, en experimentos de otro grupo donde se dio un pulso de BrdU de 2 h y se colocó con marcadores de IPCs, como es TBR2, el 99% de las células marcadas correspondió a IPCs (Hodge *et al.*, 2008). Por lo tanto consideramos que el solo cuantificar las células BrdU⁺ después del pulso de 2 h es un buen método para la cuantificación de IPCs.

La reducción en la proliferación de la IPCs *in vivo* (50%), correlaciona con los hallazgos obtenidos *in vitro* en el laboratorio (Castro-Hernández, tesis de licenciatura, 2015) en los que el número de células BrdU⁺ está disminuido en el ensayo de formación de neuroesferas a partir de hipocampos LPP3^{-/-}. Existe evidencia que demuestra que la carencia de la LPP3 afecta la proliferación celular no solo en el hipocampo. En otros trabajos del grupo se observó que la LPP3 es importante para la proliferación celular de precursores neurales diferenciados a partir de células troncales embrionarias (Sánchez-Sánchez *et al.* 2012). En el cerebelo, se observó una disminución de la proliferación de las células granulares externas y de la glía de Bergmann en individuos deficientes de LPP3 (López-Juárez *et al.* 2011). Por otro lado se ha descrito que la carencia de la LPP3 disminuye la proliferación de células tumorales de glioblastomas (Chatterjee *et al.* 2011). Será importante en un futuro establecer el mecanismo por el que la LPP3

afecta la proliferación celular. Una posibilidad es que los efectos estén mediados por el receptor S1P₁ (ver adelante).

Otro proceso que se vio alterado fue la formación de neuroblastos. Esta observación esta en concordancia con la reducción en los IPCs que registramos. Sin embargo, el porcentaje de reducción en el número de neuroblastos (18.7%) fue significativamente menor que en las IPCs (50%). Una manera de explicar esta diferencia es que en ausencia de la LPP3 los IPCs proliferen por más ciclos, se diferencien preferentemente al linaje neuronal y/o que aumente la sobrevivencia de los neuroblastos. En estudios *in vitro*, en el laboratorio, (Castro-Hernández, tesis de licenciatura, 2015) se encontró un mayor número de neuronas diferenciadas a partir de progenitores neurales LPP3^{-/-} en comparación con los silvestres. Por lo que parece ser que tanto *in vitro* como *in vivo*, la diferenciación de los progenitores neurales se va preferentemente al linaje neuronal.

En los trabajos de Sánchez-Sánchez *et al.* 2012 se encontró que la diferenciación de las células troncales embrionarias carentes de LPP3 muestran una reducción de diferenciación a neuronas espinales *in vitro* por disminución de la proliferación de los precursores neurales y un incremento de la muerte celular por apoptosis. Como se puede observar, los efectos de la deficiencia de la LPP3 sobre la diferenciación celular podrían depender del contexto celular.

Otro de los fenotipos registrados fue la alteración de la morfología de los neuroblastos mutantes. Alteraciones similares se encontraron en estudios realizados en el giro dentado del ratón de Málaga, el cual es una sublínea nula para el receptor LPA₁. En ese estudio, cerca de la mitad de los neuroblastos tenían su proceso dendrítico no perpendicular a la capa granular. Interesantemente, observaron una reducción del 30% en la formación de neuroblastos/BrdU⁺ y una reducción del 50% en células BrdU⁺ marcadas con pulsos cortos, en comparación con sus contrapartes silvestres (Matas-Rico *et al.* 2008). Las similitudes entre los fenotipos de nuestros ratones mutantes y los maLPA₁ sugieren que la deficiencia de la LPP3 es fundamental para la regulación de los niveles y señalización del LPA en el giro dentado. En este sentido el

resultado de la deficiencia de la LPP3 debería provocar la desensibilización del LPA₁ (ver adelante).

Otro de los fenotipos encontrados en neuroblastos en giros dentados mutantes fue su localización ectópica, ya sea en la capa molecular, el borde entre la zona granular y la molecular y el hilio. Este resultado sugiere que la LPP3 tiene una función en la migración de los neuroblastos o en la correcta localización de los progenitores neurales. Se ha descrito que en algunas condiciones patológicas (i.e. epilepsia) se produce una localización ectópica de neuroblastos ya que tienen una migración anormal. Pero los mecanismos aún no se conocen con exactitud. Se plantea que pueden estar alteradas las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, o la concentración de proteínas quimioatrayentes o quimirepelentes (Cayre *et al.* 2009). La LPP3 puede estar modificando alguno de esos mecanismos, quizá a esto se deba la localización ectópica de neuroblastos.

La proteína homóloga de LPP3 en *Drosophila*, Wunen, tiene un papel importante en la migración de las células germinales, ya que permite, mediante la desfosforilación de lípidos, un ambiente permisivo o repulsivo para la migración de estas células, ya que al quitar Wunen las células progenitoras tiene una migración ectópica (Zhang *et al.* 1997). La LPP3 podría controlar la migración de neuroblastos o la localización de progenitores por medio de este mecanismo.

Finalmente, será importante determinar los efectos que tiene la LPP3 sobre la señalización de receptores de lípidos y como estos participan en la generación de los fenotipos. Como se mencionó anteriormente los fenotipos del mutante nulo de LPA₁ son similares a los de nuestros mutantes. Sin embargo no podemos descartar que algunas de las características se deban a alteraciones sobre otros receptores. Como demostramos en este trabajo, en los hipocampos carentes de la LPP3 se observó una desregulación del receptor S1P₁ similar a lo observado previamente en el cerebelo (López-Juárez *et al.* 2011).

Tanto para el LPA₁ como para el S1P₁ será importante determinar los efectos sobre la señalización de estos lípidos en la ausencia de la LPP3. Al menos para el caso del S1P₁ nuestros resultados sugieren que hay una degradación de este receptor en el giro dentado. La desensibilización de los RAPG previene la

sobreestimulación por una exposición prolongada del agonista sobre su receptor (Walther & Ferguson 2013) lo que indicaría que la desregulación del S1P₁ se debe a un incremento en los niveles extracelulares de S1P en nuestro modelo.

En nuestro estudio, el aparente incremento de la S1P tiene un efecto semejante al FTY720-P el cual provoca un antagonismo funcional del S1P₁ (Healy *et al.* 2013, López-Juárez *et al.* 2011). Estas observaciones son relevantes en el contexto de la neurogénesis en la V-SVZ, donde se vió que la S1P mantiene el estado quiescente de las NSCq. Si en el hipocampo el S1P₁ tiene la misma función sería de esperar alteraciones en la proliferación de la NSC por lo que se hace muy relevante realizar un protocolo de marcado que nos permita analizar la proliferación en esta población. Por lo que se aislarían NSCs hipocampales (GFAP::EGFP+/ prominina-1+) y sobre estas se usarían una serie de marcadores de NSCs como Glast, Nestina, Sox2, BLBP y algunos marcadores control como S100B (DeCarolis *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2013) combinados con anti-LPP3. Por citometría de flujo se determinaría la población en la que LPP3 está expresada.

En resumen nuestros resultados indican que la proliferación de precursores neurales, y la diferenciación y migración de neuroblastos están afectadas durante el proceso de neurogénesis hipocampal en ratones deficientes de la LPP3. Además sugieren que dichas alteraciones se podrían deber a la desregulación de la vía de señalización del S1P₁, y posiblemente también del LPA₁ aunque aún falta por estudiar estos aspectos con más detalle.

8. CONCLUSIONES

1. La LPP3 se expresa en células troncales neurales similares a la glía radial y en no-radiales en el giro dentado del ratón adulto.
2. La carencia de la LPP3 provoca una disminución de la capacidad proliferativa de los progenitores celulares, comparado con la de ratones silvestres.
3. En los hipocampos LPP3^{-/-} hay un decremento en el número de neuroblastos/BrdU⁺ comparados con hipocampos LPP3^{+/+}. Por lo que la deficiencia de la LPP3 afecta la diferenciación celular hacia el linaje neuronal en el ratón adulto.
4. Los ratones LPP3^{-/-} presentan neuroblastos con morfología alterada en su árbol dendrítico.
5. La deficiencia de la LPP3 provoca una desregulación del receptor 1 de S1P en el hipocampo.

9. PERSPECTIVAS

- Comprobar si la NSC RGL que no expresan LPP3 son del tipo activadas.
- Realiza una mejor caracterización de NSC RGL que expresan LPP3 y las que no la expresan.
- Emplear marcadores para astrocitos clase II, oligodendrocitos y microglia y ver si tiene alguna colocalización con el marcador de la LPP3.
- Establecer el mecanismo por el que la LPP3 afecta la proliferación celular de los IPCs.
- Determinar los efectos sobre la señalización del LPA_1 y $S1P_1$ en la ausencia de la LPP3.
- Realizar un protocolo de marcado con BrdU que nos permita analizar la proliferación de NSC carentes de LPP3.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Altman J. & Das G. D. 1956. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *J. Comp. Neurol.* **124**: 319-36.
- Benarroch E. E. 2013. Adult neurogenesis in the gyrus: General concepts and potential implications. *Neurology* **16**: 1443-1452.
- Bergmann O., Liebl J., Bernard S., Alkass K., Yeung M. S., Steier P., Kutschera W., Johnson L., Landén M., Druid H., Spalding K. L. & Frisén J. 2012. The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* **74**: 634-9.
- Blaho V. A. & Hla T. 2011. Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem. Rev.* **111**: 6299-320.
- Bonaguidi M. A., Song J., Ming G. L. & Song H. 2012. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**: 754-61.
- Brindley D. N. & Pilquil C. 2009. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J. Lipid Res.* **50**: 225-30.
- Brindley D. N., Pilquil C., Sariahmetoglu M. & Reue K. 2009. Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**: 956-61.
- Castro-Hernández. 2015. El papel de la LPP3 en la capacidad proliferativa y de diferenciación de precursores neurales del hipocampo adulto en un modelo *in vitro*. *Tesis de licenciatura en IBB*.
- Cavanagh B. L., Walker T., Norazit A. & Meedeniya A. C. 2011. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules* **16**: 7980-93.
- Cayre M., Canoll P. & Goldman J. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* **88**: 41-63
- Codega P., Silva-Vargas V., Paul A., Maldonado-Soto A. R., Deleo A. M., Pastrana E. & Doetsch F. 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their *in vivo* niche. *Neuron* **82**: 545-59
- Chae S. S., Proia R. L. & Hla T. 2004. Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **73**: 141-50.
- Chatterjee I., Humtsoe J., Kohler E., Sorio C. and Wary K. 2011. Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via b-catenin and Cyclin-D1 signaling. *Mol. Cancer* **10**: 51-62.
- Choi J. W. & Chun J. 2013. Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta.* **1831**: 20–32.
- Chun J., Hla T., Moolenaar W. & Spiegel S. 2013. *Lysophospholipid Receptors*. Wiley.
- Daneshtalab N., Dore J.J. & Smeda J. S. 2010. Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **61**: 127-35.

- DeCarolis N. A., Mechanic M., Petrik D., Carlton A., Ables J. L., Malhotra S., Bachoo R., Götz M., Lagace D. C. & Eisch A. J. 2013. In vivo contribution of nestin- and GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* **23**: 708-719.
- Del Rio J. A. & Soriano E. 1989. Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Dev. Brain Res.* **49**: 311-317.
- Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., & Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**: 703–716.
- Duan X., Kang E., Liu C., Ming G. & Song G. 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**:108–115.
- Ehninger D. & Kempermann G. 2008. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell and Tissue Res.* **331**: 243-50.
- Encinas J. M., & Enikolopov G. 2008. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain. *Methods Cell Biol.* **85**: 243-72.
- Eriksson P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A., Nordborg C., Peterson D. C. & Gage F. H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature* **4**: 1313-1317.
- Ernst A., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Perl S., Tisdale J., Possnert G., Druid H. & Frisén J. 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* **156**: 1072-83.
- Escalante-Alcalde D., Hernandez L., Le Stunff H., Maeda R., Lee H. S., Jr-Gang-Cheng., Sciorra V. A., Daar I., Spiegel S., Morris A. J. & Stewart C.L. 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* **130**: 4623-37.
- Escalante-Alcalde D., Sánchez-Sánchez R., Stewart C. L., 2007. Generation of a conditional Ppap2b/Lpp3 null allele. *Genesis* **45**: 465-9.
- Frisca F., Crombie D. E., Dottori M., Goldshmit Y. & Pebay A. 2013. Rho/ROCK pathway is essential to the expansion, differentiation, and morphological rearrangements of human neural stem/progenitor cells induced by lysophosphatidic acid. *J. Lipid Res.* **54**: 1192-206.
- Fuentealba L. C., Obernier K. & Alvarez-Buylla A., 2012. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell stem cell.* **10**: 698-708.
- Gage F. H. 2000. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* **287**: 1433-38.
- Gutierrez-Martinez E., Fernandez-Ulibarri I., Lazaro-Dieguez F., Johannes L., Pyne S., Sarry E. & Egea G. 2013. Lipid phosphate phosphatase 3 participates in transport carrier formation and protein trafficking in the early secretory pathway. *J. Cell Science.* **126**: 2641-55.
- Healy L. M., Sheridan G. K., Pritchard A. J., Rutkowska A., Mullershausen F. & Dev K. K. Pathway specific modulation of S1P1 receptor signalling in rat and human astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **169**: 1114-1129.
- Hodge R., Kowalczyk T., Wolf S., Encinas J. M., Rippey C., Enikolopov G., Kempermann G., & Hevner R. 2008. Intermediate Progenitors in Adult Hippocampal Neurogenesis: Tbr2 Expression and Coordinate Regulation of Neuronal Output. *J. Neurosci.* **28**: 3707-3717.

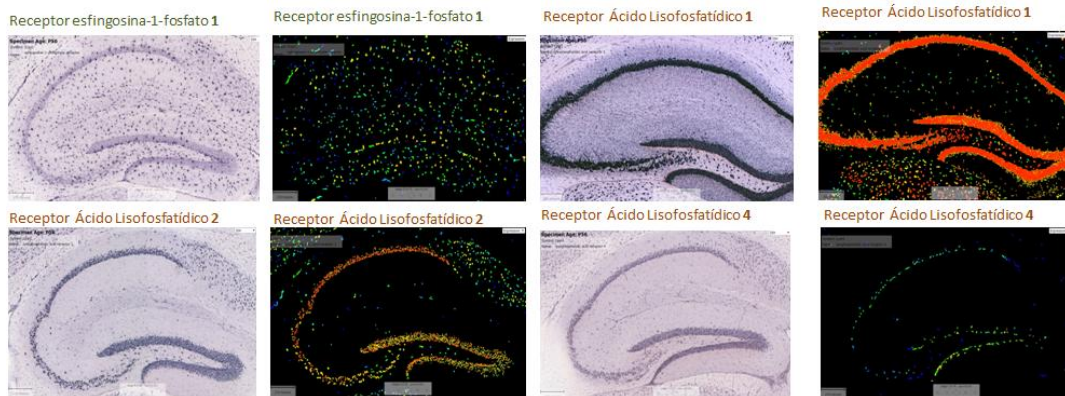
- Humtsoe J.O., Liu M., Malik A. B. & Wary K. K. 2010. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol. Cellular Biol.* **30**: 1593-606.
- Ihrle R. A. & Álvarez-Buylla A., 2011. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* **70**: 674-86.
- Jia Y-J., Kai M., Wada I., Sakane F. & Kanoh H. 2003. Differential localization of lipid phosphate phosphatases 1 and 3 to cell surface subdomains in polarized MDCK cells. *FEBS Letters* **552**: 240-46.h
- Kempermann G., Jessberger S., Steiner B. & Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* **27**: 447-452.
- Kempermann G. 2014. Off the beaten track: new neurons in the adult human striatum. *Cell* **156**: 870-871.
- Kirby E. D., Kuwahara A. A., Messer R. L. & Wyss-Coray T. 2015. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *PNAS.* **112**: 4128-4133.
- Kok B. P., Venkatraman G., Capatos D. & Brindley D. N. 2012. Unlike two peas in a pod: lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases. *Chem. Rev.* **112**: 5121-46.
- Long J. S., Pyne N. J. & Pyne S. 2008. Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function. *Bioche. J.* **411**: 371-377.
- López-Juárez A., Morales-Lázaro S., Sánchez-Sánchez R., Sunkara M., Lomelí H., Velasco I., Morris A. J. & Escalante-Alcalde D. 2011. Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. *Glia* **59**: 577-89,
- Matas-Rico E., Garcia-Diaz B., Llebreg-Zayas P., Lopez-Barroso D., Santin L., Pedraza C., Smith-Fernández A., Fernández-Llebreg P., Téllez T., Redondo M., Chun J., De Fonseca F. R. & Estivill-Torrús G. 2008. Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol. Cell Neurosci.* **39**: 342-55.
- Mendelson K., Evans T. & Hla T. 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* **141**: 5-9.
- Miller J. A., Nathanson J., Franjic D., Shim S., Dalley R. A. 2013. Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. *Development* **140**: 4633-44.
- Ming G. L. & Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* **70**: 687-702.
- Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G. F., Spiegel S. & Proia R. L. 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol. Cell Biol.* **25**: 11113-21.
- Nagy A. 2000. Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genesis* **26**: 99-109.
- Nanjundan M. & Possmayer F. 2001. Pulmonary lipid phosphate phosphohydrolase in plasma membrane signalling platforms. *Biochem. J.* **358**: 637-46.

- Odell I. D. & Cook D. 2013. Immunofluorescence techniques. *J. Invest Dermatol.* **133**: 4-8.
- Pitson S. M. & Pebay A. 2009. Regulation of stem cell pluripotency and neural differentiation by lysophospholipids. *Neurosignals* **17**:242–254.
- Reynolds B. A. & Weiss S. 1992. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science* **255**: 1707-1710.
- Sánchez-Sánchez R., Morales-Lázaro S. L., Baizabal J. M., Sunkara M., Morris A. J. & Escalante-Alcalde D. 2012. Lack of lipid phosphate phosphatase-3 in embryonic stem cells compromises neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Dev. Dyn.* **241**: 953-64.
- Seri B., Garcí'a-Verdugo J.M., McEwen B.S., and Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* **21**: 7153–7160.
- Sigal Y. J., Mcdermott M. I. & Morris A. J. 2005. Integral membrane lipid phosphatase/phosphotransferase: common structure and diverse functions. *Biochem. J.* **387**: 281-93.
- Spohr T. C., Choi J. W., Gardell S. E., Herr D. R., Rehen S. K., Gomes F. C. & Chun J. 2008. Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **283**: 7470-7479
- Spohr T. C., Dezone R. S., Rehen S. & Gomes F. C. 2011. Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway. *J. Neurochem.* **119**: 113-23.
- Stukey J. & Carman G. M. 1997. Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Prot. Sci.* **6**: 469-72.
- Sugimoto N., Takuwa N., Okamoto H., Sakurada S. & Takuwa Y. 2003. Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motility by the G12/13-Rho and Gi Pathways Integrated Downstream of a Single G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor Isoform. *Mol. Cell Biol.* **23**: 1534-45.
- Walker T. L., Wierick A., Sykes A. M., Waldau B., Corbeil D., Carmeliet p. & Kempermann G. 2013. Prominin-1 Allows Prospective Isolation of Neural Stem Cells from the Adult Murine Hippocampus. *J. Neurosci.* **33**: 3010-3024.
- Walther C. & Ferguson S. 2013. Arrestins: Role in the Desensitization, Sequestration, and Vesicular Trafficking of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Biol. Transl. Sci.* **118**: 93-113.
- Zeisel A., Muñoz A., Codeluppi S., Lönnerberg P., La Manno G., Juréus A., Marques S., Munguba H., He L., Betsholtz C., Rolny C., Castelo-Branco G., Hjerling-Leffler J. & Linnarsson S. 2015. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Scienceexpress* **347**: 1138-1142.
- Zhang N., Zhang J., Purcell K., Cheng Y. & Howard K. 1997. The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* **385**: 64-67.

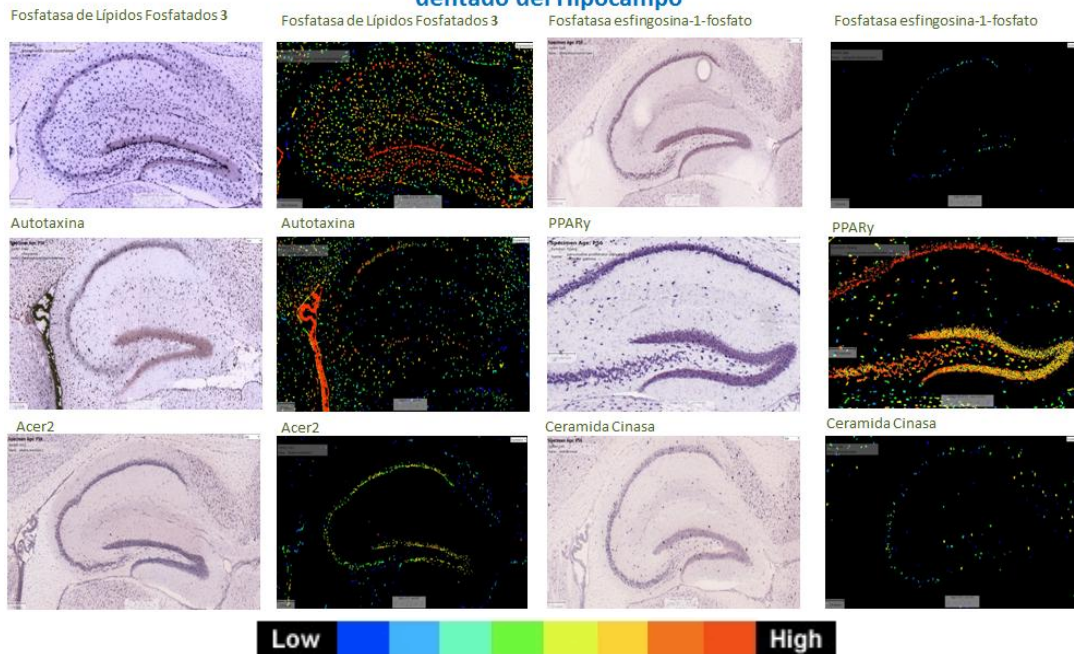
11. APÉNDICE

I. Expresión de receptores para esfingosina-1-fosfato y ácido lisofosfatídico que se localizan en el giro dentado del hipocampo, así como enzimas involucradas en su síntesis y degradación.

Receptores de S1P y LPA que se expresan en el giro dentado del Hipocampo



Expresión de enzimas que participan en la síntesis y degradación de S1P y LPA en el giro dentado del Hipocampo



Tomado y modificado de la base de datos del Allen Brain Atlas. www.brain-map.org

II. Reactivos usados en este proyecto

Avertina 2%. Tribromoetanol (Sigma T4,840-2), es un anestésico y analgésico. Disolver 10 g de tribromoetanol en 10 ml de *tert*-amil-butanol, calentar a 50°C y mezclar toda la noche con agitador magnético. Esterilizar con un filtro de 0.2 µm. Guardar a 4°C en oscuridad.

BrdU. Bromodesoxiuridina (Sigma B5002). Análogo de timidina. El stock se preparó a 10 mg/ml en PBS estéril. Guardar a -20°C en oscuridad.

PFA 4%. Paraformaldehído (Sigma 158127). Disolver 4 g en 100ml de PBS 1X pH 7.4 precalentado a 40°C hasta que aclare. Guardar a -20°C en oscuridad.

PBS 1X. Buffer de Fosfatos. Disolver en un litro de agua destilada 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y KH₂PO₄. pH 7.4.

Buffer de lisis. Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Igpal 1% con inhibidores: Na₂VO₃, NaF y cocktail de inhibidores complete

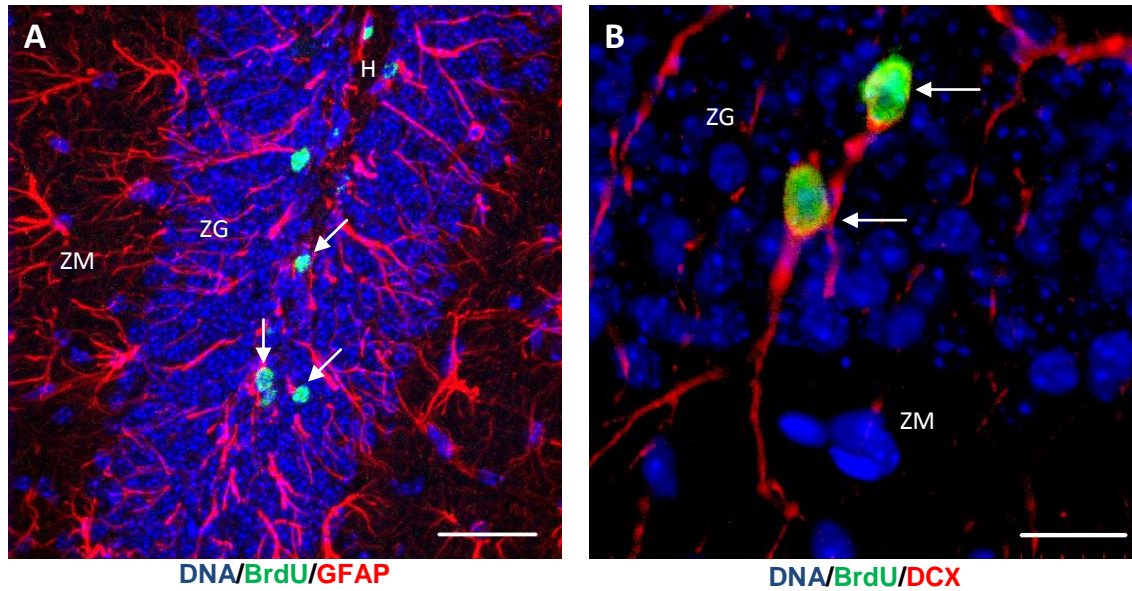
Gel de poliacrilamida al 10%. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, acrilamida al 30%, bis-acrilamida al 0.8%, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 10% y TEMED.

Gel de poliacrilamida al 3.9%. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, acrilamida al 3.9%, bis-acrilamida al 0.8%, SDS al 10%, persulfato de amonio al 10% y TEMED.

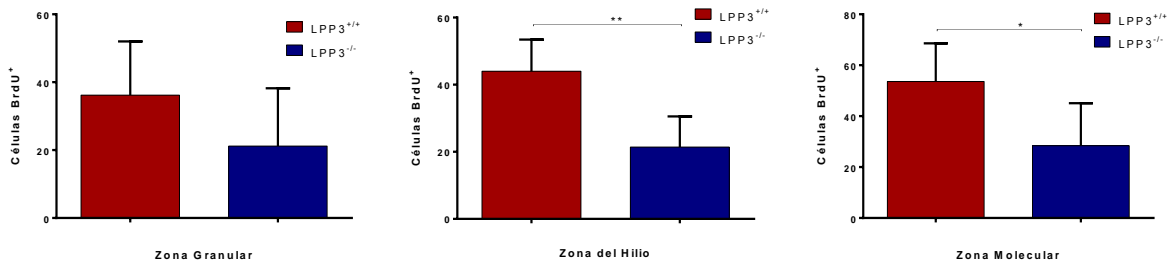
Buffer de corrida. glicina 0.96 M, Tris-HC 0.125 M y SDS al 0.5%.

Buffer TBS-Tween. Disolver en un litro de agua tridestilada 19.9 mM Trizma Base, 171 mM NaCl, Tween al 1% en pH 7.6.

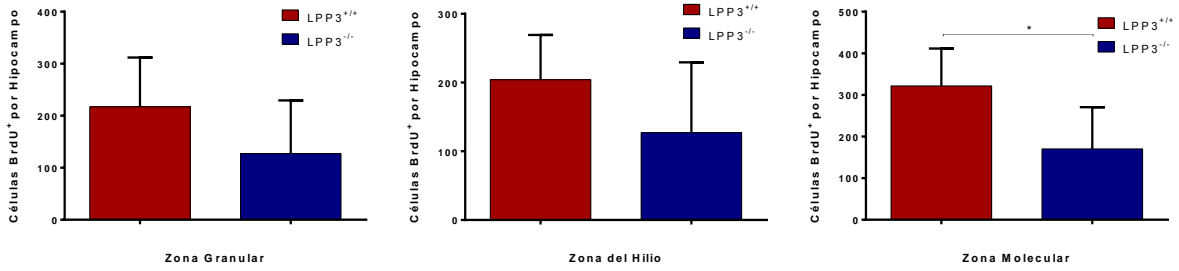
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO



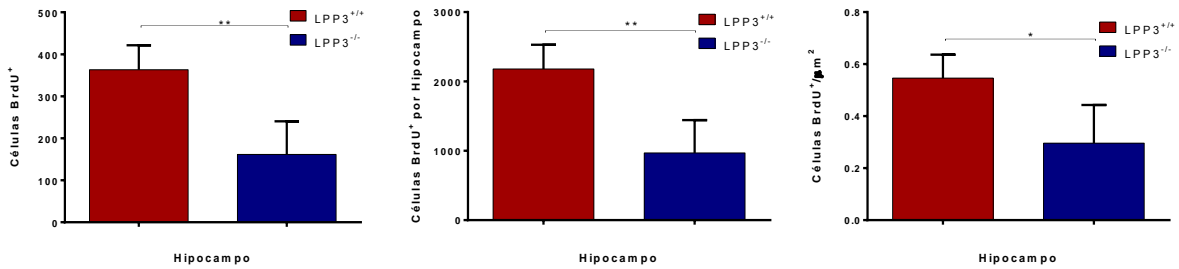
SI. Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia. Ejemplos de inmunotinciones con anticuerpos para marcar células de la glía radial/BrdU⁺ (A) y neuroblastos/BrdU⁺ (B) que se utilizaron en el presente proyecto ZM: zona molecular. ZG: zona granular. SGZ: zona subgranular. H: hilio. Flechas: células BrdU⁺. Barras: (A) 50µm.y (B) 20 µm.



SII. Cuantificación de células BrdU⁺ en distintas zonas del hipocampo. Cuantificación de una muestra representativa (laminilla/individuo) de las zonas granular, molecular y del hilio del hipocampo.



III. Cuantificación total de células BrdU⁺ en distintas zonas del hipocampo. Cuantificación haciendo una extrapolación del número total de células BrdU⁺ de las zonas granular, molecular y del hilio del hipocampo.



SIV. Cuantificación de células BrdU⁺ en todo el hipocampo. Cuantificación de una muestra representativa por laminilla/individuo, haciendo una extrapolación del número total de células BrdU⁺ y utilizando el principio de Cavalieri del número total de células BrdU⁺ en el hipocampo.