



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IMPLICACIÓN DE LA FOSFATASA DE FOSFOLÍPIDOS-3 EN LA INTEGRACIÓN DE INTERNEURONAS EN EL BULBO OLFATORIO DE RATONES ADULTOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
JOSÉ RIVERA ALVAREZ

**TUTORA PRINCIPAL:**  
DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE  
Instituto de Fisiología Celular

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**  
DR. JULIO MORÁN ANDRADE  
Instituto de Fisiología Celular  
DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ  
Instituto Nacional de Psiquiatría "Juan Ramón de la Fuente"

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Diciembre, 2017



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.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio AL-103 del Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Diana Escalante Alcalde. El autor recibió la beca de maestría CONACYT 703341. Se contó con el apoyo de Presupuesto UNAM, CONACYT CB-165897 y DGAPA-PAPIIT IN207015. El programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), brindó un apoyo económico para asistir al XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, realizado del 8 al 12 de marzo de 2016 en Lagos de Moreno, Jalisco.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Diana Escalante Alcalde por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, su gran ayuda y contribuir siempre con ideas que impulsaron el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Ana Valeria Martínez Silva por proporcionar el apoyo técnico para la realización de los experimentos y la ayuda en los trámites de compra de material.

Al Dr. Julio Morán y al Dr. Gerardo Rodríguez por sus valiosos comentarios en los exámenes tutorales.

A la Dra Susana Castro Obregón por el préstamo del microscopio de epifluorescencia con el que cuenta su laboratorio.

A la Dra. Sandra Gómez López por la enseñanza de técnicas para el corte y preservación de tejidos, además de colaborar con la realización de las histoquímicas del gen reportero de PLPP3.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por el apoyo técnico en el manejo del microscopio DSU y el software *Stereoinvestigator* para la realización de los conteos estereológicos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al Dr. Luis Covarrubias, Dra. Magdalena Guerra, Dr. Gabriel Gutiérrez, Dr. Luis Tovar y Dra. Angélica Zepeda por sus comentarios constructivos que ayudaron a dar la mejor versión de esta tesis.

A la M. en C. Ana María Escalante y el Ing. Francisco Pérez de la Unidad de Cómputo.

A la unidad de histología del IFC por el préstamo del criostato para realizar los cortes histológicos.

A mi familia, que siempre me apoya en lo que realizo.

A mis amigos, que siempre están presentes cuando se les necesita.

Al lab. AL-103 por los buenos momentos y el gran aprendizaje que recibí de todos.

## Índice

Abreviaturas.....	7
1.- Resumen .....	8
2.- Introducción .....	10
2.1.1.-El nicho neurogénico adulto de la zona ventricular sub-ventricular.....	10
2.1.2.- La vía rostral migratoria.....	12
2.1.3.- Maduración como neuronas en el BO.....	12
2.1.4.- Regulación molecular dentro del bulbo olfatorio.....	14
2.1.5.- Aspectos conductuales relacionados con la neurogénesis adulta.....	15
2.2.-Fosfolípidos bioactivos y su regulación por la Fosfatasa de fosfolípidos-3 (PLPP3).....	15
2.2.1.-Fosfolípidos bioactivos.....	15
2.2.2.- Esfingosina-1-fosfato (S1P).....	16
2.2.3.- Ceramida-1-fosfato (C1P). .....	16
2.2.4.- Ácido lisofosfatídico (LPA).....	17
2.2.5.- Ácido fosfatídico (PA).....	17
2.2.6.-Características estructurales de la PLPP3.....	18
2.2.7.-Fosfatasa de fosfolípidos-3 (PLPP3) y su función en el SNC.....	20
2.2.8.- PLPP3 y su impacto en la neurogénesis adulta en el hipocampo.....	21
3.- Justificación.....	23
4.- Hipótesis.....	23
5.- Objetivos.....	23
6.- Métodos.....	24
6.1.- Cruzas de ratones y genotipificación.....	24
6.1.1.- Aislamiento de DNA.....	25
6.1.2- PCR.....	25
6.2.- Inmunofluorescencias.....	25

6.3.-Estimación de número de células mediante estereología.....	27
6.4.- Análisis conductual.....	28
6.5.- Análisis estadístico.....	29
7.- Resultados .....	30
7.1.- Expresión y distribución de PLPP3 en el bulbo olfatorio y su localización celular.....	30
7.1.1- Observaciones del alelo reportero de <i>Plpp3 (lacZ/+)</i> .....	30
7.1.2- Detección de PLPP3 mediante inmunofluorescencia.....	31
7.1.3- PLPP3 no se expresa en neuronas maduras y tampoco en neuroblastos.....	32
7.1.4.- Plpp3 co-localiza con proteínas de membrana astrocítica.....	33
7.1.5.- Número y morfología de astrocitos.....	35
7.1.6.- Discusión de expresión y distribución de PLPP3 en el bulbo olfatorio y su localización celular.....	37
7.2.- Incorporación de interneuronas granulares en el bulbo olfatorio de ratones adultos.....	38
7.2.1.- Estandarización del protocolo de BrdU.....	38
7.2.2- La ausencia de PLPP3 no produce diferencias en el número de neuronas que se incorporan en la capa granular.....	39
7.2.4.- Discusión de incorporación de interneuronas.....	41
7.3.- Cómo influye PLPP3 en el olfato.....	42
7.3.1.-Prueba de comida escondida.....	42
7.3.2.- Prueba de contenedores.....	42
7.3.3.- Discusión de conducta olfativa.....	43
7.4.- Permanencia de ventrículos olfatorios en ratones adultos deficientes en PLPP3.....	45
7.4.1- Ventrículos olfatorios en los ratones deficientes de Plpp3.....	45
7.4.2.- Naturaleza epéndimo-astrocítica del epitelio ventricular del BO en mutantes.....	47
7.4.3.- Presencia del ventrículo olfatorio en el día posnatal 5.....	50

<b>7.4.4.- Discusión de permanencia de ventrículos olfatorios en ratones adultos deficientes en PLPP3.....</b>	<b>51</b>
<b>7.5.-Discusión final.....</b>	<b>53</b>
<b>8.- Bibliografía.....</b>	<b>54</b>
<b>Información anexa.....</b>	<b>61</b>

## Abreviaturas

### Capas y tipos celulares del bulbo olfatorio

CGlo: Capa glomerular

CCM: Capa de células mitrales

CM: Célula mitral

CP: Célula en penacho

CPG: Célula periglomerular

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

CCG: Capa de células granulares

MO: Mucosa olfatoria

NSO: Neuronas sensoriales olfatorias

### Estructuras cerebrales

BO: Bulbo olfatorio

GDH: Giro dentado del hipocampo

ZSV: Zona sub-ventricular

ZSG: Zona sub-granular

VRM: Vía rostral migratoria

### Marcadores moleculares

BrdU: 5-Bromo-2-deoxiuridina

CalB: Calbindina

CalR: Calretinina

Dcx: Doblecortina

GFAP: (por sus siglas en inglés) Proteína glial fibrilar ácida

NeuN: Núcleo neuronal

TH: Tirosina hidroxilasa

### Moléculas relacionadas con fosfolípidos bioactivos

C1P: Ceramida-1-fosfato

PLPP3: Fosfatasa de fosfolípidos- 3

LPA: Ácido lisofosfatídico

PA: Ácido fosfatídico

S1P: Esfingosina-1-fosfato

S1P1: Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato

## 1.-Resumen

El cerebro adulto de los mamíferos posee dos regiones donde se integran neuronas de manera constitutiva, estas son el giro dentado del hipocampo (GDH) y el bulbo olfatorio (BO). Las neuronas que se forman en el BO son el producto de un complejo proceso que implica la proliferación de las células troncales neurales que se encuentran en la zona sub-ventricular (ZSV), su migración por la vía rostral migratoria (VRM) y su maduración en BO. Esta adición de neuronas constituye un mecanismo de plasticidad que permite enfrentar un ambiente olfativo en constante cambio.

Para que ocurra la neurogénesis se requieren factores que modulen el microambiente molecular. En este sentido, la fosfatasa de fosfolípidos-3 (PLPP3), una proteína cuyo gen se expresa en ambos sitios neurogénicos, disminuye la concentración de fosfolípidos bioactivos que participan en vías de señalización ya sea como ligandos de receptores asociados a proteínas G o como segundos mensajeros. Teniendo en consideración que la deficiencia de la PLPP3 en SNC afecta negativamente la neurogénesis en el hipocampo adulto, se propuso la hipótesis de que esta deficiencia también tendría repercusión en la integración de neuronas en el BO adulto.

Primero se caracterizó la localización de la PLPP3 mediante inmunofluorescencias, donde se identificó a esta fosfatasa como una proteína astrocítica con presencia en todo el BO, siendo particularmente abundante en los tubos gliales de la VRM.

Para estudiar neurogénesis se administró 5-Bromo-2-deoxiuridina (BrdU) a ratones adultos para marcar células en proliferación, dando un tiempo de 4 semanas después de la administración del compuesto para sacrificar los animales y hacer el análisis de la capa granular en los BOs. Los ratones deficientes a PLPP3 no tuvieron cambios significativos respecto a los controles en el número de neuronas con la marca de BrdU en el BO. No obstante, en una prueba de contenedores olfativos, los ratones mutantes tienen una menor interacción con un odorante colocado, sugiriendo así una función olfativa disminuida independiente de la neurogénesis en la zona estudiada.

Con la identificación de PLPP3 en los astrocitos del BO se pueden proponer funciones de la fosfatasa asociadas a diferentes fenómenos celulares, y que podrían explicar la posible afectación en la conducta olfativa en ratones deficientes a PLPP3.

Inesperadamente, en los ratones deficientes a PLPP3 se observó una estructura ventricular adyacente a la VRM, la cual estaba bordeada por un epitelio cúbico simple con marcadores de células endoteliales y GFAP, que marca astrocitos. Este ventrículo en los mutantes, que forma una continuidad con los ventrículos laterales, es un fenotipo que no se ha reportado previamente en ratones adultos, por lo que su fisiología y mecanismos de formación quedan por resolver en futuros estudios.

**Palabras clave: Bulbo olfatorio, PLPP3, neurogénesis**

## **1.-Abstract**

Adult mammalian brain has two regions where neurons are added constitutively, these are the dentate gyrus of the hippocampus (DGH) and the olfactory bulb (OB). Neurons formed in OB are the product of a complex process that involves the proliferation of neural stem cells located in the sub-ventricular zone (SVZ), neural progenitors derived migration through the rostral migratory stream (RMS) and their maturation in OB. This neuronal addition comprises a phenomenon of plasticity that allows the mice to deal with an olfactory environment in constant change.

For neurogenesis to occur, factors are required that modulate the molecular microenvironment. In this sense, phospholipid phosphatase (PLPP3), a protein whose gene is expressed in both neurogenic sites, diminishes the concentration of bioactive phospholipids that participate in signaling pathways, either as ligands or as second messengers. Considering that the deficiency of PLPP3 affects negatively neurogenesis in adult hippocampus, it was proposed the hypothesis that its deficiency would have a repercussion in the addition of neurons in the adult OB.

Initially, PLPP3 distribution in the OB was characterized by immunofluorescence, identifying it as an astrocytic protein with presence in the whole OB, being particularly abundant in the glial tubes of the RMS.

To study neurogenesis, 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) was administered to adult mice to label proliferating cells. Four weeks after the administration of the compound, the animals were sacrificed and the number of incorporated cells in the granular layer of OB was analyzed. Mice deficient for PLPP3 didn't show changes in the number of BrdU marked cells. Nevertheless, in an olfactory container test, mutant mice had fewer contacts with an odorant, suggesting a diminished olfactory function independent of neurogenesis in the studied zone.

With the identification of PLPP3 in OB astrocytes, it can be proposed that PLPP3 could be associated to the regulation of different cellular phenomena (i.e. neurotransmission, metabolism, adhesion), participating in olfactory behavior.

Unexpectedly, in PLPP3 deficient brains a ventricular structure adjacent to the RMS was observed. This was bordered by a simple cubical epithelium with ependymal markers and GFAP, an astrocytic marker. This abnormal structure is a ventricular continuity of the lateral ventricles, a phenotype never reported previously in adult mice, so its physiology and mechanisms of formation remains to be established in future studies.

**Key words: Olfactory bulb, PLPP3, neurogenesis**

## **2.- Introducción**

El cerebro es el órgano más complejo que existe en la naturaleza debido a que es el origen de procesos como la motricidad, las emociones, la memoria y el desarrollo de pensamientos. Estos aspectos son regulados por la transmisión de impulsos por parte de las neuronas, células que en el cerebro de los mamíferos se generan y establecen mayoritariamente en etapas embrionarias y juveniles (Greig, *et al*, 2013).

Sin embargo, existen dos zonas en el cerebro adulto donde diariamente ocurre la generación de neuronas. Estas zonas son el giro dentado del hipocampo (GDH) y la zona sub-ventricular (ZSV) de los ventrículos laterales. La ZSV es el nicho neurogénico más grande del cerebro mamífero y produce células que viajan un trayecto conocido como vía rostral migratoria (VRM) y que finalmente se establecen en el bulbo olfatorio (BO) como neuronas (Lledo, *et al*, 2006).

Este fenómeno hace que el olfato sea una modalidad sensorial sujeta a un mecanismo poco usual de plasticidad y que le permite al individuo interactuar con un ambiente cuyos estímulos olfativos son muy variados (Gheusi y Lledo, 2014).

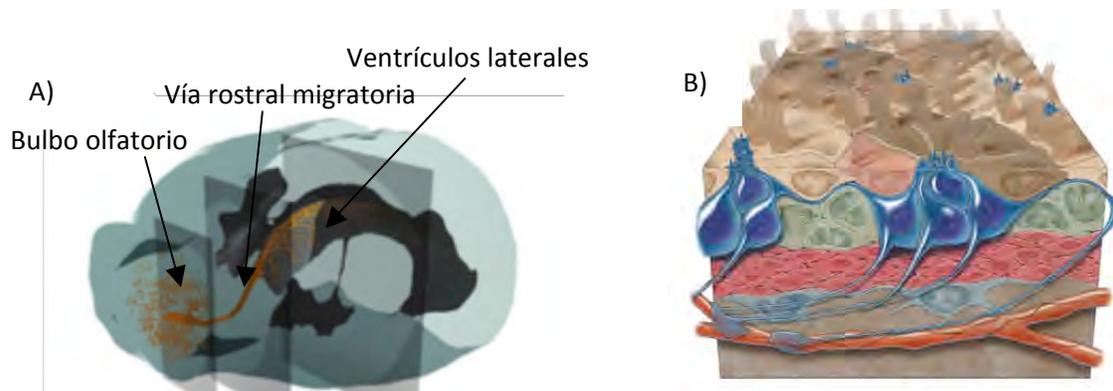
### **2.1.1- El nicho neurogénico adulto de la zona ventricular sub-ventricular**

Las neuronas generadas en el BO adulto provienen de células troncales neurales (células tipo B) ubicadas en la ZSV de los ventrículos laterales (Fig 1A). En este sitio, existen interacciones celulares que definen un microambiente permisivo para la neurogénesis, conocido como nicho neurogénico. Entre las células más importantes del nicho neurogénico en la ZSV están las células endodiales, los vasos sanguíneos y células tipo B, que dan lugar a neuroblastos que maduran como neuronas (Fig. 1B) (Chaker, *et al*. 2016).

La epéndima es un epitelio ciliado que en su parte apical está en contacto directo con el fluido cerebroespinal. Las células endodiales forman una estructura denominada de rehilete debido a la disposición que rodea la parte apical de las células B, las cuales proyectan únicamente un cilio apical al lumen ventricular. En su parte basal, las células B contactan mediante un “pie vascular” a los vasos sanguíneos (Fig. 1) (Doetsch, *et al*, 1997; Mirzadeh, *et al*. 2008).

Las células B son de identidad astrocítica por las proteínas que expresan, y cuando se activan para tener divisiones neurogénicas, originan células de amplificación transitoria (tipo C o TAPs por “*transit amplifying cells*”) que se diferencian en neuroblastos (células tipo A) (Tabla 1). Estos neuroblastos migran en grupos y confluyen en la parte anterior de los ventrículos laterales, estableciendo una agrupación de células migratorias denominada como vía rostral migratoria (VRM), que está dirigida hacia el BO (Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996; Alvarez-Buylla, *et al*. 2001).

En la tabla 1 se da un resumen de las características generales de algunas células que componen la ZSV.



**Figura 1.- A)** Las células troncales que propician la neurogénesis adulta en el BO se encuentran en los ventrículos laterales (zona sombreada) y migran un trayecto de varios milímetros por la vía rostral migratoria hasta llegar al BO (Tomado y modificado de Fiorelli, et al. 2015). **B)** Esquema del nicho neurogénico de la zona sub-ventricular en los ventrículos laterales, sitio donde se originan las interneuronas del bulbo olfatorio. En café se representan las células endodiales, en azul las células tipo B, en verde las células tipo C y debajo de estas están las células tipo A (neuroblastos) en color rojo. Se muestra también un vaso sanguíneo sobre el cual contactan los “pies vasculares” (Tomado de Mizraheh, et al. 2008).

**Tabla 1.-** Tipos celulares de ZSV que producen interneuronas en el BO de ratones adultos (Con información de Lledo, et al. 2009; Lim y Alvarez-Buylla, 2015)

Tipo celular	Marcadores	Características
<b>Células endodiales</b>	S100 Nestina CD133	Epitelio multiciliado que contacta con el fluido cerebroespinal.
<b>B (tipo glía radial)</b>	GFAP Glast BLBP Nestina (B activadas)	Células de división lenta con características de astrocitos (pueden estar en estado quiescente o activado).
<b>C (células en amplificación)</b>	Ascl1, Dcx	Células de división rápida
<b>A (neuroblastos)</b>	Dcx, PSA-NCAM	Migran hacia parte anterior de los ventrículos laterales, donde coalescen y migran en la VRM.

### 2.1.2.- La vía rostral migratoria

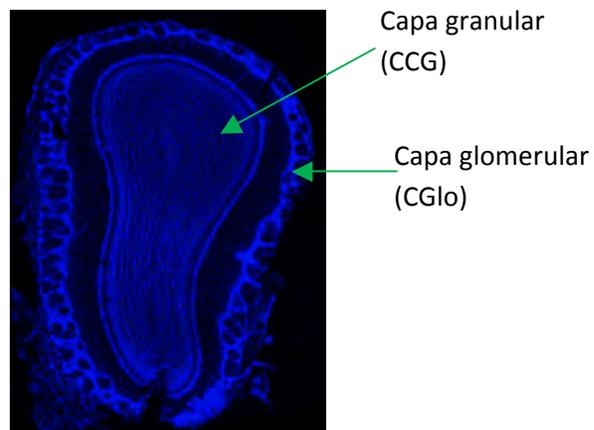
En ratones, aproximadamente 30,000 neuroblastos salen diariamente de diversas partes de los ventrículos laterales en dirección a la parte anterior de los mismos (Lois & Alvarez-Buylla, 1994), formando en este punto una sola ruta migratoria, que es la VRM. La migración de los neuroblastos ocurre en cadenas de células que se deslizan tangencialmente entre ellas. Este deslizamiento se facilita por la interacción con los “tubos gliales”, astrocitos que envuelven a las agrupaciones migratorias (Deng, *et al.* 2014).

La interacción neuroblastos-tubos gliales se produce por factores secretados por parte de ambos tipos celulares. Uno de estos factores es el ligando Slit, secretado por neuroblastos y cuyo receptor Robo está en astrocitos, siendo que al interactuar estos factores, se induce la morfología característica tubos gliales (Kaneko et al., 2010). La movilidad de los neuroblastos también es posible por moléculas de matriz extracelular, como PSA-NCAM (Chazal, *et al.* 2000).

### 2.1.3.- Maduración como neuronas en el BO

Cuando alcanzan el BO, los neuroblastos abandonan los tubos gliales, migran de manera radial y proyectan una protrusión polarizada en dirección al sitio donde maduran como neuronas. De las células que inician la migración se integra aproximadamente un 75% en el BO, teniendo muerte celular el porcentaje restante (Deng, *et al.* 2011).

Los neuroblastos que se establecen, maduran como interneuronas GABAérgicas en dos capas principalmente: capa granular (CCG) y capa glomerular (CGlo) (Fig. 2). La gran mayoría de las neuronas que se integran al BO lo hacen en la capa granular, alcanzando un 90% del total de neuronas integradas (Gheusi & Lledo, 2014).



**Figura 2.-** Fotografía de un BO teñido con Hoescht. Se señalan las regiones donde se integran las interneuronas procedentes de ZSV.

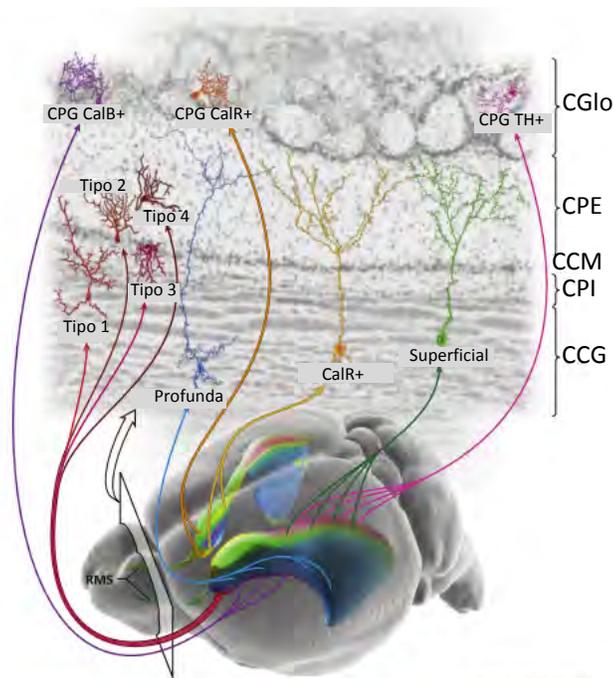
Las células que se integran en CCG son células granulares y tardan 15 días en volverse funcionales. Las células que llegan a CGlo, lo hacen como células periglomerulares (PGC) y toman 28 días para integrarse completamente (Petreanu & Alvarez-buylla, 2002; Lledo, et al., 2008). En la tabla 2 se muestran las características de las neuronas que llegan a BO producto de la neurogénesis adulta.

**Tabla 2.- Características de las células que se incorporan al bulbo olfatorio de ratón adulto (con información de Lledo et al., 2008; Parrish-Aungst et al., 2007; Batista-Brito et al., 2008).**

	<b>Granulares (CG)</b>	<b>Periglomerulares (CPG)</b>
<b>Ubicación</b>	Capa de células granulares (CCG)	Alrededor de los glomérulos en la capa glomerular (GL)
<b>Tiempo en incorporarse</b>	15 días	28 días
<b>Marcadores moleculares</b>	NeuN+, CalR+	TH+, CalB+, CalR+, GAD65/67+
<b>Diámetro del soma</b>	5-6 $\mu\text{m}$	11-12 $\mu\text{m}$ (TH+), 5-6 $\mu\text{m}$ (CalB y CalR+)
<b>Características estructurales</b>	Carecen de axón, contactan con dendritas de CM o CP en la CPE.	Numerosas dendritas que contactan con un glomérulo y un axón que contacta con uno o varios glomérulos

Las neuronas que el BO incorpora en CCG tienen una gran diversidad morfológica y de marcadores. Entre las más importantes están las profundas, superficiales, CalR+ y las tipo 1, 2, 3 y 4, que se diferencian por el dominio en el cual extienden el árbol dendrítico y la ubicación del soma. Mientras tanto, las CPG son similares morfológicamente, difiriendo por las proteínas que expresan, pudiendo ser positivas a CalR, CalB o TH (Tabla 2 y fig. 3) (Batista-Brito et al., 2008; Merkle et al., 2014).

La posición e identidad de las neuronas que se integren al BO depende del sitio de la ZSV de origen. En la zona ventral de la ZSV se obtienen en su mayoría células CalB+, en la dorsal se producen células TH+ y en la parte más rostral de la ZSV y VRM se producen CalR+ (Fig. 6) (Merkle et al., 2007; Merkle et al., 2014). Esta especificidad se establece desde etapas embrionarias, donde se determinan los diferentes tipos de células progenitoras que habitan la zona ventricular aproximadamente desde el día embrionario 15 (E15) en una zona del cerebro embrionario que es la eminencia ganglionar lateral (Young, et al., 2007; Fuentealba et al., 2015).



**Figura 3.-** Tipos de neuronas generadas dependiendo la región donde se produzcan en la ZSV. CGlo: capa glomerular, CPE: Capa plexiforme externa, CCM: Capa de células mitrales, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de células granulares, CPG: Célula periglomerular (tomado y modificado de Lim & Alvarez-Buylla, 2014)

#### 2.1.4.- Regulación molecular dentro del bulbo olfatorio

La migración radial en el BO se produce por moléculas quimioattractoras como la glicoproteína reelina, secretada por las células mitrales del BO y que permite el traslado de los neuroblastos de la VRM hacia la CCG (Hack et al. 2002); la tenascina R, que es otra glicoproteína de matriz extracelular, es secretada por neuronas granulares y también funciona para el traslado de los neuroblastos hacia la CCG (Saghatelian et al. 2004). La procinectina, que a través de la estimulación del receptor 2 de procinectina induce el inicio de la migración hacia el BO (Ng et al. 2005).

La regulación de la maduración neuronal está mediada en algunas neuronas por el factor de transcripción NeuroD1, que promueve la formación de dendritas en neuronas periglomerulares (Boutin et al., 2010).

En cuanto a las estructuras que sirven como andamio para la migración radial se ha observado que los vasos sanguíneos del BO son importantes para este proceso, pues aproximadamente la mitad de los neuroblastos que se encuentran en fase de migración radial se asocian de manera estrecha a un vaso sanguíneo (Bovetti et al., 2007).

### **2.1.5.- Aspectos conductuales relacionados con la neurogénesis adulta**

Debido a que el olfato participa en varios procesos de la vida normal de los roedores, siendo inclusive la modalidad sensorial más importante para estos, se puede pensar en que la neurogénesis como proceso de renovación celular provee de una mayor plasticidad para responder a los cambiantes estímulos ambientales.

Para estudiar la relevancia en el comportamiento de la neurogénesis adulta en el OB, se han realizado aproximaciones experimentales donde se abate la formación de neuronas. Debido a los diferentes protocolos que se pueden utilizar para evitar la neurogénesis o bien, para cuantificar parámetros de la función olfativa, se han obtenido resultados diferentes en cuanto a los aspectos funcionales de la neurogénesis.

En el estudio de Gheusi y colaboradores en 2000 se observa que los ratones que tienen una deficiencia en la producción de neuronas tienen una falla en el reconocimiento de olores novedosos, siendo que no discriminan entre un olor nuevo y uno previamente mostrado.

En otro artículo (Breton-Provencher, *et al*, 2009) se le atribuye a la adición de neuronas una función en la detección de odorantes, siendo que cuando es defectuosa la neurogénesis adulta, los ratones necesitan una mayor concentración del odorante para poder detectarlo. En este mismo artículo se demuestra que ratones en los cuales se evitó la división celular de las NSC se produce una deficiente memoria olfativa a corto plazo (a partir de 60 minutos).

## **2.2.-Fosfolípidos bioactivos y su regulación por la Fosfatasa de fosfolípidos-3 (PLPP3)**

### **2.2.1.-Fosfolípidos bioactivos**

Los procesos de proliferación, migración, muerte y sobrevivencia que forman a las neuronas del BO adulto dependen de una comunicación celular adecuada. Esta se lleva a cabo mediante la participación de diversos ligandos en el medio extracelular, e intracelularmente por los segundos mensajeros inducidos en las vías de señalización. Los fosfolípidos bioactivos son moléculas que pueden funcionar ya sea como ligandos o como segundo mensajeros (Brindley & Pilquill, 2008).

A pesar de que las proteínas son los ligandos más estudiados, la importancia de los fosfolípidos bioactivos como moléculas de unión a receptores empieza a tener cada vez más relevancia. Entre los más notables ejemplos se encuentran la esfingosina-1-fosfato (S1P) y el ácido lisofosfatídico (LPA), cuyos receptores están asociados a proteínas G. Por otro lado, la ceramida-1-fosfato (C1P) y el ácido fosfatídico (PA) participan río debajo de diversas cascadas de señalización (Hannun & Obeid, 2008).

A pesar de que se sabe poco acerca de la relación entre neurogénesis adulta y fosfolípidos bioactivos, se conoce la función de estas moléculas en otros aspectos del SNC, pues participan en procesos de desarrollo, plasticidad, inflamación y neurotransmisión, por mencionar algunos

(Farooqui & Horrocks, 2007; Kajimoto et al., 2007; López-Juárez et al., 2011). A continuación se describen algunas características y funciones de los fosfolípidos bioactivos que pueden ser de interés en el estudio de la neurogénesis por los procesos celulares involucrados.

### **2.2.2.- Esfingosina-1-fosfato (S1P)**

La esfingosina-1-fosfato (S1P) extracelular es ligando de 5 receptores de siete dominios transmembranales (S1P<sub>1-5</sub>). Los efectos celulares asociados a estos ligandos son principalmente el re-arreglo de citoesqueleto y movilidad celular, inducidos a través de proteínas como G<sub>i</sub>, G<sub>12/13</sub> y G<sub>q</sub>, además de vías que involucran Src y PI3K (Spiegel & Milstien, 2011).

La S1P se sintetiza en el citoplasma, donde existe una reserva de esfingosina que es fosforilada por la esfingosina cinasa (Sphk). La S1P producida de esta manera puede ser transportada al medio extracelular mediante transportadores y ejercer su función de ligando (Spiegel & Milstien, 2011). Extracelularmente es defosforilada por fosfatasa de esfingolípidos (SPP) y por las fosfatasa de fosfolípidos (PLPPs); mientras que intracelularmente, además de las enzimas mencionadas, también es disminuida por la liasa de lípidos fosfatados (Sgpl1) (Spiegel & Milstien, 2003).

A la S1P se le adjudica la función de mantener la cohesión entre los neuroblastos que migran en la VRM. El receptor implicado en este proceso es S1P<sub>1</sub>, que disminuye en los neuroblastos que se desprenden de la VRM para iniciar la migración radial en el BO (Alfonso et al. 2015).

La importancia de S1P se ha descrito principalmente a nivel de sistema inmunitario, donde este lípido fosfatado modula el tráfico de linfocitos T, promoviendo su egreso del timo. Se ha observado que S1P promueve la proliferación, sobrevivencia, y diferenciación en diferentes tipos celulares, como fibroblastos, células del tipo cardíaco, células endoteliales y astrocitos (Spiegel et al, 1997).

### **2.2.3.- Ceramida-1-fosfato (C1P)**

La ceramida-1-fosfato (C1P) es producto de la fosforilación de la ceramida por la cinasa de ceramida (CERK), de la cual existen 2 isoformas en el tejido nervioso. La primera se encuentra en la membrana plasmática y la otra está en el citoplasma. Se asocia a la actividad de CERK extracelular con vesículas sinápticas y por lo tanto con una probable participación en la neurotransmisión (Hannun & Obeid, 2008; Mencarelli & Martinez-Martinez, 2013).

En el SNC se ha encontrado que CERK tiene una actividad abundante respecto a otros órganos. Su presencia se observa en zonas como tálamo, estriado y bulbo olfatorio (BO), sin embargo su mayor actividad es en el cerebelo (Mitsutake et al., 2007). Aún no se han descrito los efectos particulares que tiene C1P en estas regiones del cerebro.

Las principales funciones de C1P se han estudiado en torno al sistema inmune, donde está reportado que provoca efectos como la estimulación de la fagocitosis y el tráfico vesicular de macrófagos (Hannun & Obeid, 2008).

#### **2.2.4.- Ácido lisofosfatídico (LPA)**

El LPA produce sus efectos a través de proteínas de siete dominios transmembranales (ocho conocidas, siendo LPA<sub>1-8</sub>) asociadas a proteínas G. La señalización del LPA está asociada a vías relacionadas con factores de crecimiento, con participación de proteínas como Erk y PI3K. También se involucra a este fosfolípido en la reorganización del citoesqueleto por medio de GTPasas pequeñas como Ras y Rho (Kok, *et al.* 2012).

La autotaxina es una enzima responsable de la producción de LPA a partir de lisofosfatidilcolina, ocurriendo esta reacción en el lado extracelular de la membrana plasmática, en donde funge como ligando.

Se sabe que el LPA está involucrado en el desarrollo del cerebro principalmente a través de los receptores LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub>. Para observar cómo influye LPA en el desarrollo del cerebro, Kingsbury y colaboradores en 2003 colocaron cerebros de ratón en día embrionario 14 (E14) en medio de cultivo con LPA durante 17 horas, produciéndose plegamientos en las cortezas, con un aumento en grosor producto de una mayor sobrevivencia. En otra publicación (Yung, *et al.* 2011) se observa como la inyección de LPA (una sola administración) en E14 provoca hidrocefalia y adelgazamiento de la corteza, producto de un desprendimiento de la pared ventricular.

A nivel celular se ha reportado su actividad en astrocitos, pues la administración de LPA en cultivo produce cambios morfológicos asociados con reactividad astrocítica. Cuando se inyecta LPA en hipocampo de ratas adultas ocurre un aumento en el volumen en los astrocitos marcados por GFAP (Zeng & Zhang, 2007). En el caso de los neuroblastos corticales de ratón, después de ser administrados con LPA *in vitro*, hay una hipoertrofia en el citoesqueleto de actina y una incapacidad para dispersarse (Fukushima, Weiner, & Chun, 2000).

Las células gliales envoltoras del BO tienen receptores para LPA (LPA<sub>1-3</sub>) y el incremento de este ligando induce una mayor proliferación y migración, así como un aumento en las fibras de estrés dependiente de las proteínas Rho y ROCK (Yan, Lu, & Rivkees, 2003). Es notable que la deficiencia en el receptor LPA<sub>1</sub> además de producir letalidad en gran parte de los ratones que carecen de este, induce defectos asociados a la conducta olfatoria (Contos *et al.* 2000).

#### **2.2.5.- Ácido fosfatídico (PA)**

El ácido fosfatídico (PA) participa de manera intracelular en cascadas de señalización asociadas a mitógenos. Su producción está mediada por cinasas de diacilglicerol y por la fosfolipasa D (PLD),

que tiene función catalítica sobre la fosfatidilcolina, produciendo PA y colina (Yung *et al*, 2015; Park *et al*, 2015).

Las actividades biológicas del PA se relacionan con la dinámica del citoesqueleto de actina en el desarrollo de prolongaciones neuronales. Esta implicación en el desarrollo morfológico se observa porque PLD, su enzima productora, está río abajo del factor de crecimiento neuronal en una vía de señalización que induce el desarrollo de prolongaciones neuronales en células PC12 (Watanabe, *et al*. 2004). Se ha observado además que en cerebro de rata, PA interactúa con proteínas de citoesqueleto y de tráfico vesicular (Park *et al*. 2015).

En la tabla 3 se hace un resumen de algunos de los efectos de los fosfolípidos bioactivos en el SNC, mencionados previamente.

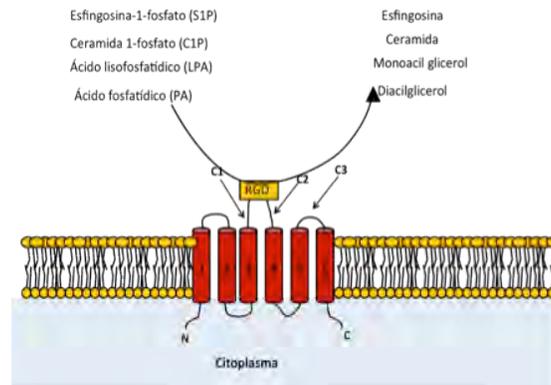
**Tabla 3.- Lípidos fosfatados y algunas características en relación al SNC**

Lípido fosfatado	Efectos celulares en SNC	Referencia
Esfingosina -1-fosfato (S1P)	-La estimulación del receptor S1P <sub>1</sub> está involucrada en la migración de astrocitos corticales <i>in vitro</i> . -La disminución del receptor S1P <sub>1</sub> en vía rostral migratoria se relaciona con el inicio de la migración radial de los neuroblastos.	Mullershausen <i>et al</i> , 2007 Alfonso <i>et al</i> , 2015
Ácido lisofosfatídico (LPA)	-Su aumento provoca fibras de estrés en astrocitos <i>in vitro</i> . -El incremento de LPA induce reactividad astrocítica en hipocampo. -Los aumentos en sus niveles produce deformación en la morfología de neuroblastos. -Regula proliferación y migración de glía olfatoria envolvente <i>in vitro</i> . -La falta del receptor LPA <sub>1</sub> provoca conductas asociadas a disfunción olfativa.	Manning, <i>et al</i> , 1998 Zeng & Zhang, 2007 Fukushima <i>et al</i> , 2000 Yan <i>et al</i> , 2003 Contos <i>et al</i> , 2000
Ácido fosfatídico (PA)	-Se relaciona con proteínas reguladoras de citoesqueleto para la formación de neuritas.	Park <i>et al</i> , 2015
Ceramida-1-fosfato (C1P)	-La cinasa de ceramida se encuentra ampliamente expresada en vesículas sinápticas y es abundante en cerebelo.	Mitsutake <i>et al</i> , 2007

### 2.2.6.-Características estructurales de la PLPP3

La fosfatasa de fosfolípidos-3 (PLPP3) es una proteína integral de membrana con 6 dominios transmembranales y cuyos dominios N y C terminal se encuentran en el lado citoplasmático. Esta proteína ejerce una función de fosfatasa y además cuenta con un dominio (RGD) de unión a integrinas, por lo que está involucrada en adhesión celular (Fig. 4A) (Kok *et al*, 2012).

La función de fosfatasa se realiza mediante tres dominios extracelulares que conforman el sitio catalítico, denominados C1, C2 y C3. Los dos primeros se encuentran en la segunda asa extramembranal, entre la tercera y cuarta hélice transmembranal. El sitio C3 está entre el tercer y cuarto dominio transmembranal (Fig. 4). La función de C1 es la del reconocimiento del sustrato, mientras que C2 y C3 funcionan para la reacción de fosfotransferasa. (Kok *et al*, 2012).

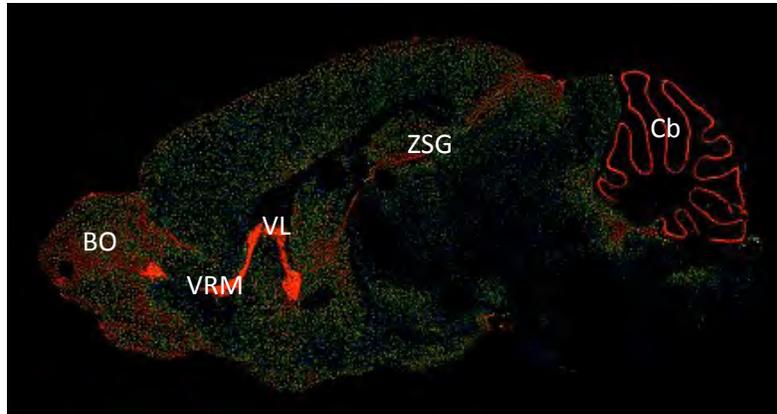


**Figura 4.-** Se muestra la estructura de PLPP3 como una proteína con 6 dominios transmembranales, tres dominios que forman el sitio catalítico; además de un dominio RGD de unión a integrinas. Su principal función es defosforilar lípidos bioactivos como S1P, LPA, PA y C1P (Modificado de Long, *et al*. 2008).

### 2.2.7.- Fosfatasa de fosfolípidos-3 (PLPP3) y su función en el SNC

El cerebro adulto es un sitio con una abundante expresión de la PLPP3, enzima que reconoce una amplia variedad de fosfolípidos bioactivos para defosforilarlos y de esta manera reducir su concentración (Brindley y Pilquil. 2008). Ejemplos de estos fosfolípidos son los previamente mencionados S1P, LPA, PA y C1P (Fig. 4).

Entre los sitios con mayor presencia de la PLPP3 (observado por la presencia del transcrito y de un gen reportero) están las zonas involucradas en la neurogénesis adulta, estos son el GDH y el eje conformado por la ZSV, VRM y BO (Fig. 5)(Allen Brain Atlas; López-Juárez, *et al*. 2011). Esta localización de PLPP3 hace pensar que puede ocurrir una importante modulación de la concentración de fosfolípidos bioactivos en las zonas neurogénicas, por lo que se estarían regulando eventos celulares implicados en la formación de neuronas.



**Figura 5.-** Patrón de expresión del transcrito de *Plpp3* en el cerebro adulto (BO: bulbo olfatorio, VRM: Vía rostral migratoria, LV: ventrículos laterales, ZSG: Zona sub-granular, Cb: Cerebelo) (Tomado y modificado del Allen Brain Atlas <http://mouse.brain-map.org/>).

Puesto que el knock-out (KO) de la proteína en todo el organismo provoca letalidad en el día embrionario 9.5 (E9.5) (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003), una de las aproximaciones experimentales para el estudio de la PLPP3 en el SNC es el knock-out condicional (cKO) en tejido nervioso (Escalante-Alcalde, *et al.* 2007), a partir del cual se han realizado algunas observaciones de los fenómenos celulares en los que está implicada esta fosfatasa en el cerebro.

Ratones cKO para PLPP3 en SNC tienen malformaciones en los plegamientos del cerebelo, lo que conlleva una motricidad defectuosa. Este fenotipo se propicia principalmente por deformaciones en la glía de Bergman, que pierde su morfología y localización características. Debido a que este tipo de glía sirve como andamio en la migración de las células granulares cerebelares en el desarrollo, su malformación provoca una migración ineficiente (López-Juárez *et al.* 2011).

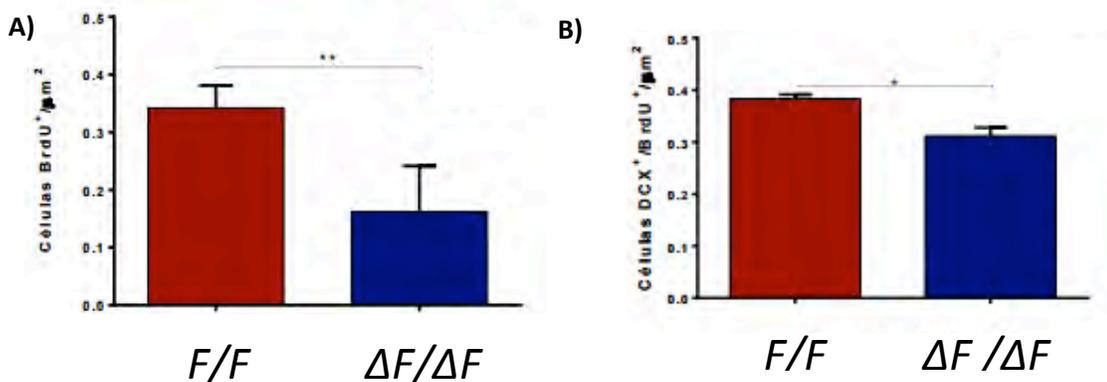
Otra región donde se ha estudiado la función de PLPP3 en el cerebro adulto es la *sustancia nigra*, en donde se ha descrito su implicación en la neurotransmisión. Lo que se encontró en ratones carentes a PLPP3 en SNC fue una liberación defectuosa de dopamina (Gómez-López *et al.*, 2016).

La importancia de PLPP3 en el desarrollo del fenotipo neuronal se ha demostrado a partir de células troncales embrionarias de ratón, donde en condiciones de diferenciación neuronal, la falta de esta enzima disminuye la proporción de neuronas formadas. En conjunto, las poblaciones celulares carentes de la enzima disminuyen en el fenotipo neuronal producto de una diferenciación hacia linaje de músculo liso, además de que se induce una menor proliferación y una mayor muerte (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2012).

### 2.2.8.- PLPP3 y su impacto en la neurogénesis adulta en el hipocampo

Como se ha observado previamente, el patrón de expresión de *Plpp3* se confina a sitios específicos del SNC, siendo abundante su presencia en los sitios permisivos para la proliferación y establecimiento de neuronas en el cerebro adulto, es decir el hipocampo, ZSV, VRM y BO.

Teniendo en cuenta esta observación, se ha realizado el estudio de la neurogénesis hipocampal adulta en ausencia de la PLPP3 mediante ensayos de marcaje con BrdU. Lo que se observó fue que ratones cKO de esta enzima en SNC tienen una menor proliferación en la ZSG del GDH, pues los mutantes incorporaron menos BrdU después de 2 horas de la administración del compuesto. Consecuencia de la menor proliferación hubo una menor marca de BrdU en neuroblastos después de 2 semanas de administrarlo (Fig. 6) (Tesis de Cotzomi, 2015).



**Figura 6.-** La neurogénesis hipocampal disminuye en ratones carentes de PLPP3 en SNC. **A)** Disminución en la proliferación visto por la menor cantidad de células marcadas por BrdU 2 horas antes del sacrificio. **B)** Neuroblastos positivos a BrdU posterior a 2 semanas de la administración de BrdU, las células que se diferencian a linaje neuronal disminuyen significativamente en los ratones mutantes (Tomado de Cotzomi, 2015).

La otra zona donde se incorporan neuronas es el bulbo olfatorio, y como previamente se ha mencionado, el mensajero de *Plpp3* se expresa de gran manera en este sitio (Fig. 5). También existe una presencia abundante en ZSV y VRM, zonas donde los precursores neurales proliferan y migran para finalmente integrarse al BO.

En la base de datos del *Allen Brain Atlas*, se muestra la expresión de genes en el cerebro de ratón, entre ellos están los transcritos de genes relacionados con la producción y señalización de fosfolípidos bioactivos (Tabla 4).

El BO presenta expresión de transcritos como la cinasa 2 de esfingosina (*Sphk2*), la autotaxina (*Atx*), y la cinasa de ceramida (*Cerk*), las cuales producen S1P, LPA y C1P respectivamente. Es notable que también en la ZSV y VRM, zonas donde surgen los precursores y migran, también

presentan expresión de *Sphk2*, *Atx* y otras proteínas relacionadas (Tabla 4, imágenes en información anexa).

**Tabla 4.-** Transcritos de genes relacionados con síntesis, degradación y señalización de fosfolípidos bioactivos encontrados en la base de datos del Allen Brain Atlas en zonas relacionadas con neurogénesis del BO (notación: += bajos niveles, +=niveles medios, +++=niveles altos, ++++= niveles muy altos. ZSV: Zona sub-ventricular, VRM: Vía rostral migratoria, CCG: Capa de células granulares, CCM: Capa de células mitrales, CPI: Capa plexiforme interna, CPE: Capa plexiforme externa, CGlo: Capa glomerular)

	Transcrito expresado	ZSV	VRM	Estructura del BO				
				CCG	CPI	CCM	CPE	CGlo
Degradación	<b><i>Plpp3</i></b>	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>Sgp1</i>	+				+		+
	<i>Sgpp2</i>	+						
	<i>Lpaat3</i>			++		+++		+
	<i>Lcat</i>						++	++
Receptores	<i>S1P1</i>	++++	++++	++	++	++	++	++
	<i>S1P2</i>			+		+		+
	<i>S1P5</i>			+	+	+++		+
	<i>Lpar1</i>			+				+
	<i>Lpar2</i>	++	+	+		+		+
Síntesis	<i>Sphk2</i>		+++	+++	+++	+++		+++
	<i>Pld2</i>	+	+	+		+		+
	<i>Pld3</i>			+				+
	<i>Atx</i>		++	+++	+++	+++		+++
	<i>Cerk</i>					+		

Toda esta evidencia hace pensar que PLPP3, una enzima que regula gran cantidad de fosfolípidos bioactivos, puede tener influencia sobre la integración de interneuronas en el bulbo olfatorio, producto de la desregulación de fosfolípidos bioactivos que conlleve algún efecto sobre la proliferación, migración o maduración al linaje neuronal.

### **3.- Justificación**

Siendo que la PLPP3 regula fosfolípidos relacionados con proliferación, migración y sobrevivencia, y que la deficiencia de PLPP3 en SNC produce una neurogénesis defectuosa en el hipocampo adulto; se propone que esta fosfatasa está involucrada en los procesos regulatorios de la neurogénesis del BO y que por lo tanto regula la integración de neuronas en esta estructura.

### **4.- Hipótesis**

La falta de PLPP3 provoca una disminución en la cantidad de interneuronas que se integran al bulbo olfatorio.

### **5.- Objetivos**

#### **General.-**

Caracterizar el efecto de la deficiencia de la PLPP3 en la integración de interneuronas nuevas en el bulbo olfatorio adulto.

#### **Particulares.-**

- 1) Detectar los tipos celulares del bulbo olfatorio donde se expresa la proteína PLPP3.
- 2) Observar la repercusión que tiene la carencia de la PLPP3 en el establecimiento de interneuronas granulares nuevas en el bulbo olfatorio de ratones adultos.
- 3) Determinar si la ausencia de PLPP3 provoca disfunciones en la conducta olfativa.

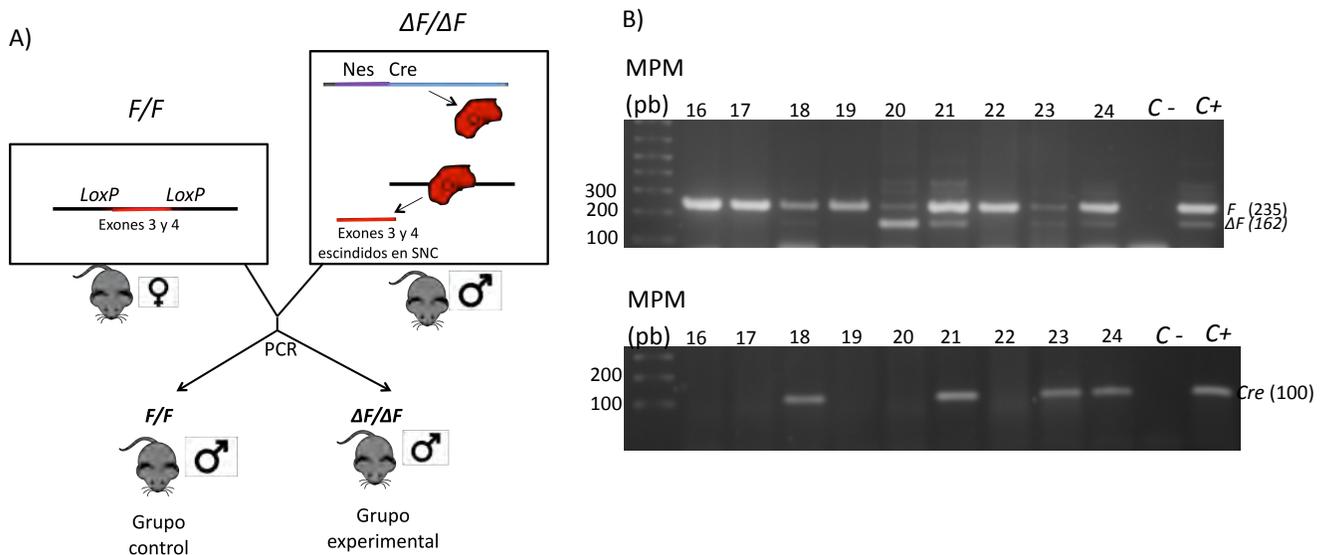
## 6.- Método

### 6.1.- Cruzas de ratones y genotipificación

Para realizar este trabajo se utilizaron ratones que tienen los exones 3 y 4 del gen de *Plpp3* flanqueados por secuencias *LoxP*. Esta secuencia puede ser escindida por una recombinasa Cre bajo el control del promotor de la nestina que se expresa en precursores neurales del SNC, teniendo de esta manera *knock-out* condicionales (cKO) de la *Plpp3* en el SNC. En lo que resta del texto se hará referencia a los ratones con la secuencia flanqueada como *F/F* y a los ratones con la secuencia escindida como  $\Delta F/\Delta F$ .

Para obtener los  $\Delta F/\Delta F$  se realizaron cruza entre ratones hembra *F/F* (con la secuencia flanqueada por *LoxP*) y ratones machos que además de la secuencia flanqueada, expresaban Cre bajo el promotor de nestina (Fig. 7A). Con esta crusa se obtuvo como progenie ratones *F/F* negativa a Cre (grupo control) y ratones positivos a Cre y que por lo tanto fueron  $\Delta F/\Delta F$  (Grupo experimental). Para la mayoría de los experimentos se emplearon machos provenientes de la misma camada.

El genotipo se determinó por PCR, observando en ratones que contienen la secuencia flanqueada un producto de amplificación de 235 pares de bases (pb) y en ratones con el gen escindido un producto de 162 pb (Fig 7B).



**Figura 7.-** Esquema de la reproducción de ratones cKO de *Plpp3*. A) Como grupo control se utilizan ratones con la secuencia de *Plpp3* flanqueada en los exones 3 y 4 por sitios *LoxP* (*F/F*) y como grupo experimental además de esta secuencia se expresa la recombinasa Cre bajo el promotor de nestina, produciendo una escisión de los sitios *LoxP* en los progenitores neurales ( $\Delta F/\Delta F$ ). B) Geles representativos de las PCR para identificar ratones *F/F* y  $\Delta F/\Delta F$  que tuvieran Cre, a los cuales se les identificó con un número, en este caso del 16 al 24.

La edad de los ratones macho fue de entre 8 y 10 semanas, estando estos alojados en el vivario del Instituto de Fisiología Celular, en condiciones constantes de temperatura (22-23°C) y del ciclo luz: oscuridad, teniendo a disposición comida y agua *ad libitum*.

### **6.1.1.- Aislamiento de DNA**

Se cortó un trozo de cola (3 mm aproximadamente) que se digirió en 375 µl buffer de lisis (SDS 2%, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM), añadiendo 25 µl de proteinasa K (stock 17.9 µg/ml). Se incubó a 37°C durante toda la noche a 850 rpm en un thermomixer. Al día siguiente se agregó medio volumen de fenol y medio volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), separando la fase acuosa de la mezcla y añadiéndola en tubo nuevo. Se añadió 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1) y nuevamente se separó la fase acuosa.

Finalmente se precipitó el DNA con 1 volumen de isopropanol y se incubó 60 minutos a -70°C, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70%, se desechó el etanol y se añadieron 50 µl de buffer Tris EDTA (TE) (100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA) para finalmente incubar toda la noche a 37°C.

### **6.1.2.-PCR**

Para un volumen final de 25 µl por muestra, en tubos para PCR se colocaron 2.5 µl de amortiguador 10x adicionado con MgCl<sub>2</sub>, 2 mM (0.5 µl) de dNTPs, 30 pmoles (0.5 µl) de cada oligonucleótido para las amplificaciones correspondientes, 0.5 µl de Taq polimerasa, 2 µl del DNA extraído previamente y el restante de agua. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de *Plpp3* son: 5' GAA GTG CCA TTA CTC TCT CAG C 3', 5' CCA GGG TGC TAT CTA TCT GTA AC 3', y 5' CTA CAG ATG TCA GTC AGT GTG G 3'. Para *Cre* se utilizan los oligonucleótidos 5' GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC 3' y 5' GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT 3'.

Se programaron los ciclos de amplificación que consisten en 30 ciclos de amplificación con temperatura de alineamiento de 60° para *Plpp3* y 56°C para *Cre*. Se realizó una electroforesis de los productos amplificados en agarosa al 2% en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5x, utilizando 50 V durante una hora. Se observaron en luz UV las bandas correspondientes a *F/F* (235 pb),  $\Delta F/\Delta F$  (162 pb) y *Cre*; determinando así el genotipo de los ratones con los cuales se trabajó.

### **6.2.- Inmunofluorescencias**

Para la realización de inmunofluorescencias se utilizaron ratones *F/F* y *F/F Cre* de dos meses de edad, a los cuales se les realizó una perfusión intracardíaca con 25 ml de solución salina al 0.9% seguido de 25 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en PBS 0.1 M (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), después de lo cual se extrajeron los cerebros y se dejaron fijar 16 horas en solución de PFA, para posteriormente colocar en sacarosa 30% preparada en PBS 0.1 M y realizar

cortes de 40 µm en un criostato. Las inmunofluorescencias se llevaron a cabo por método de flotación de acuerdo a lo descrito en la tabla 5.

Mediante la observación en un microscopio confocal Olympus FV10, se obtuvieron imágenes a una amplificación de 10x y 60x para observar la localización de los diferentes marcadores en las capas del BO y de los tipos celulares que presentaban los marcadores (anticuerpos utilizados en tabla 6).

**Tabla 5.-** Protocolo para realizar las inmunofluorescencias, se indican las sustancias en el orden de adadimiento

Sustancia de incubación	Veces	Tiempo c/vez (minutos)
Buffer de fosfatos salino con tritón 0.2% (PBST)	3	10
Glicina 0.1 M	1	15
PBST	3	10
Solución de bloqueo en PBST	1	60
Anticuerpo primario en solución de bloqueo	1	Toda la noche
Buffer de fosfatos (PB)	3	10
Anticuerpo secundario 1:500	1	120
PB	3	10
Hoescht 1 mg/ml 1:000	1	15
PB	3	10
Montaje en Fluoromount G		

**Tabla 6.-** Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias

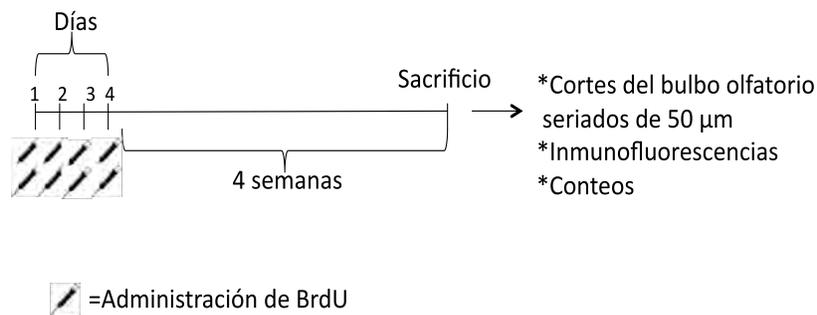
Proteína que detecta	Casa comercial	N. de catálogo	Hecho en	Concentración
<b>BrdU</b>	Roche	11 296 736 001	Ratón	1:10
<b>CalB</b>	Chemicon	AB1778	Conejo	1:200
<b>CalR</b>	Millipore	6B8.2	Ratón	1:100
<b>CD133</b>	Biolegend	141202	Ratón	1:200
<b>Dcx</b>	Santa Cruz	sc 8066	Cabra	1:400
<b>Iba1</b>	Abcam	15690	Ratón	1:400
<b>Nestina</b>	Millipore	MAB353	Ratón	1:400
<b>NeuN</b>	Millipore	MAB337	Ratón	1:400
<b>NeuN</b>	Abcam	ab104225	Conejo	1:400
<b>Glast</b>	Millipore	AB1782	Rata	1:400
<b>Glt1</b>	Millipore	AB1783	Cobayo	1:200
<b>S100</b>	Millipore	MAB079-1	Ratón	1:100
<b>GFAP</b>	Dako	20334	Conejo	1:800
<b>BLBP</b>	Millipore	ABN14	Conejo	1:200
<b>PLPP3</b>	Chemicon	AB4072	Conejo	1:400

**Protocolo de marcaje de BrdU:** Para observar la incorporación de neuronas nuevas, se administraron dos dosis diarias de 50 mg/kg de BrdU (10 mg/ml) de manera intraperitoneal

durante 4 días (8 administraciones en total) y se sacrificó 28 días después para dar tiempo de integración neuronal al BO (Fig. 8). Se realizó la perfusión como previamente está descrito.

Se realizaron cortes coronales seriados de 50  $\mu\text{m}$  del BO completo, almacenándolos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en solución crioprotectora (30% etilen glicol, 30% glicerol, 10% PB 1x y 30%  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) para posteriormente utilizar los cortes en las inmunofluorescencias por flotación. En la realización de este método hubo variaciones hechas en el protocolo de la tabla 5.

Después del bloqueo se colocaron los tejidos en solución de ácido clorhídrico 2N a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, posteriormente en buffer de borato 1 M 10 minutos y al finalizar esta incubación, se colocó el anticuerpo primario  $\alpha\text{-BrdU}$  durante 40 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  (concentración 1:10 del kit Roche, cat. 11 296 736 001). Se hicieron 3 lavados con PBS y se dejó incubando toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en el anticuerpo primario para detectar ya sea NeuN o CalR. El día siguiente se colocaron los anticuerpos secundarios como se describe en la tabla 5.



**Figura 8.-** Línea temporal de las administraciones de BrdU y el tiempo de sacrificio, así como el tratamiento posterior a los cerebros.

### 6.3.-Estimación de número de células mediante estereología

Una vez que se tuvieron los cortes seriados de 50  $\mu\text{m}$  del bulbo olfatorio completo, se tomaron en una periodicidad de 6 (1 de cada 6 cortes en la serie), utilizando 6 cortes por cerebro en los cuales se hicieron las inmunofluorescencias (protocolo descrito anteriormente).

Los conteos de las células BrdU+ y BrdU+/NeuN+ en la capa granular fueron hechos en un microscopio Olympus BX51-WI con unidad de disco giratorio (DSU) que se encuentra en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Este microscopio se encuentra acoplado al software *Stereoinvestigator*, en el cual se realizan las estimaciones del volumen y número de células a través de un método semiautomático denominado disector óptico, donde se traza manualmente la zona de interés en el tejido (en este caso capa granular) y se crea una malla donde todas las zonas tengan la misma probabilidad de ser seleccionadas en el muestreo.

Para hacer los conteos se delimitó el perímetro de la zona de interés bajo un aumento de 4x utilizando el marcador nuclear Hoescht como referencia, después de lo cual se detectaron las células inmunorreactivas a BrdU o BrdU/NeuN a un aumento de 60x para colocar una marca de identificación en las células que tuvieran los marcadores mencionados. La malla de conteo fue de 400x400  $\mu\text{m}$  y tuvo una profundidad de 30  $\mu\text{m}$ , utilizando una periodicidad en las secciones de 5. Para tener datos confiables se trabajó con coeficientes de Gundersen menores a 0.1.

## **6.5.- Análisis conductual**

### **6.5.1.- Prueba de comida escondida**

Tres días antes de la prueba se colocó a los ratones un pellet de comida (un trozo de chocolate de 0.9 a 1.1 g) para observar que el alimento sea consumido por los animales y evitar que hubiera neofobia (aversión al nuevo alimento). 18 horas previas al inicio de la prueba se retiró todo el alimento de las cajas, dejando a los ratones en ayuno.

El día de la prueba se colocó a cada ratón durante 5 minutos en la caja para habituarlos al lugar de experimentación, se enterró un pellet de comida (0.9 - 1.1 g) 2 cm debajo del aserrín. Posteriormente se colocó al ratón en la caja donde se escondió la comida y se grabó el recorrido de los ratones hasta alcanzar la comida. Se registró el tiempo que los ratones tardaron en desenterrar y empezar a comer el pellet.

### **6.5.2.- Prueba de percepción olfativa**

Un día antes de la prueba olfativa, se habitó durante 5 minutos a cada ratón en una caja de 40 x 20 x 20 cm con una cama de aserrín, colocando la cámara 60 cm por encima del fondo de la caja.

El día de la prueba se hizo otra sesión de habituación durante 5 minutos y posteriormente se colocó de un lado de la caja un papel filtro impregnado con agua (control) y un papel filtro con 15  $\mu\text{l}$  de crema de cacahuete (10 % m/v disuelto en aceite), que es un odorante comúnmente utilizado en pruebas experimentales de olfato. Se empezó a grabar durante 3 minutos para registrar el número de veces que los ratones contactaron con cada papel filtro. Entre cada ratón hay cambio de guantes para evitar una posible contaminación por la previa manipulación del odorante.

Este reconocimiento está mediado en parte por eventos de atención y exaltación que frecuentemente se utilizan en experimentos de reconocimiento de objetos novedosos, sólo que en esta prueba el estímulo olfativo se presenta como la novedad.

## **6.6.- Análisis estadístico**

Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante una  $t$  de student para detectar diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental. En caso de no cumplir con una distribución normal, se utilizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Las pruebas estadísticas se realizaron en el software GraphPad Prism 6.

## 7.- Resultados

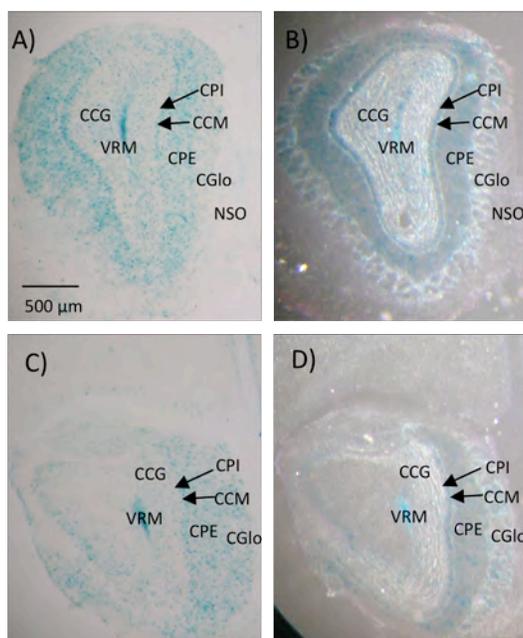
### 7.1.- DISTRIBUCIÓN DE PLPP3 EN EL BULBO OLFATORIO Y SU LOCALIZACIÓN CELULAR

#### 7.1.1- Observaciones del alelo reportero de *Plpp3* (*lacZ/+*)

En las figuras 10 y 11 se muestra la histoquímica para detectar  $\beta$ -galactosidasa, que se está expresando bajo el control de las regiones reguladoras de *Plpp3*. De las capas más externas del BO hacia las más internas, se observa lo siguiente: en la capa de neuronas sensoriales (NSO) no hay expresión del reportero, mientras que en CGlo y CPE está presente de manera abundante. La CCM, correspondiente a una hilera de neuronas, carece de la marca, mientras que en CPI es uno de los sitios de mayor expresión (Fig. 9).

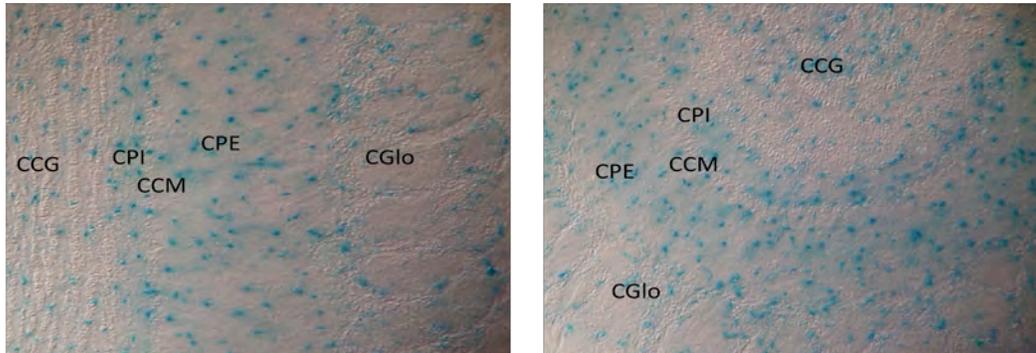
En CCG disminuye la intensidad de la tinción, pero permanece abundante. Finalmente la parte más interna del bulbo olfatorio, la VRM tiene una abundante presencia del reportero, siendo la parte con coloración más intensa y homogénea respecto a los otros estratos. Este patrón de tinción es consistente a lo largo del eje antero-posterior, lo cual se observa en las figuras 10C y D, que son fotos tomadas en una ubicación posterior del BO.

En la figura 10 se muestra a un mayor aumento de las mismas muestras, donde es posible identificar que los sitios donde hay neuronas (CCM y células agrupadas en la CCG) carecen de la expresión del reportero.



**Figura 9.-** Gen reportero que expresa  $\beta$ -gal bajo el promotor de *Plpp3* visto en microscopio estereoscópico. En A y C, se observa la presencia del reportero y en C y D se observan las capas de manera mejor definida con diferente iluminación (NSO: capa de nervios sensoriales, CGlo: Capa

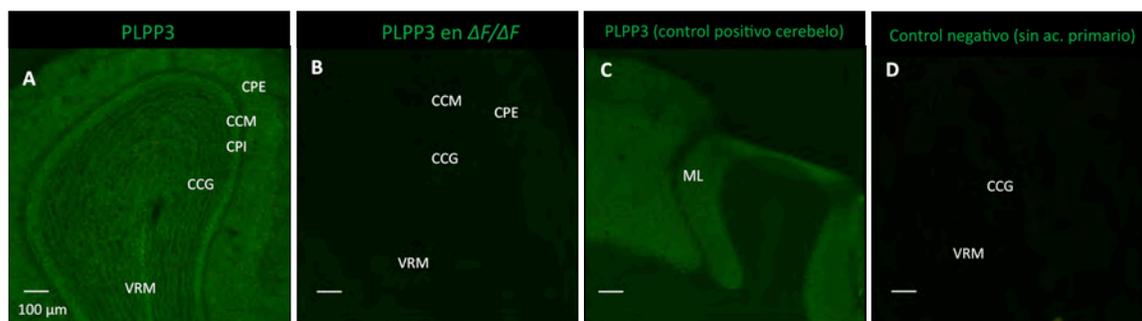
glomerular, CPE: Capa plexiforme externa, CCM: Capa de células mitrales, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de células granulares, VRM: Vía rostral migratoria).



**Figura 10.-** Se observan con óptica de Normansky las estructuras del bulbo olfatorio teñidas para la actividad de  $\beta$ -gal, donde la tinción es abundante en CPI y CPE, siendo menos abundante en CCG y CGlo. Se muestra aumento a 20x (CGlo: Capa glomerular, CPE: Capa plexiforme externa, CCM: Capa de células mitrales, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de células granulares).

### 7.1.2- Detección de PLPP3 mediante inmunofluorescencia

La presencia de PLPP3 se observó mediante inmunofluorescencia, en este caso, a diferencia del gen reportero se puede observar la proteína que ya está integrada en los compartimientos membranales. Existió consistencia con lo observado previamente en la tinción de  $\beta$ -gal, teniendo una abundante presencia en CPE y CPI, mientras que está disminuida en la CGlo (Fig. 11). Congruente con la expresión del reportero, la zona de mayor expresión se observa en VRM, zona de donde se abastece el BO de neuroblastos.

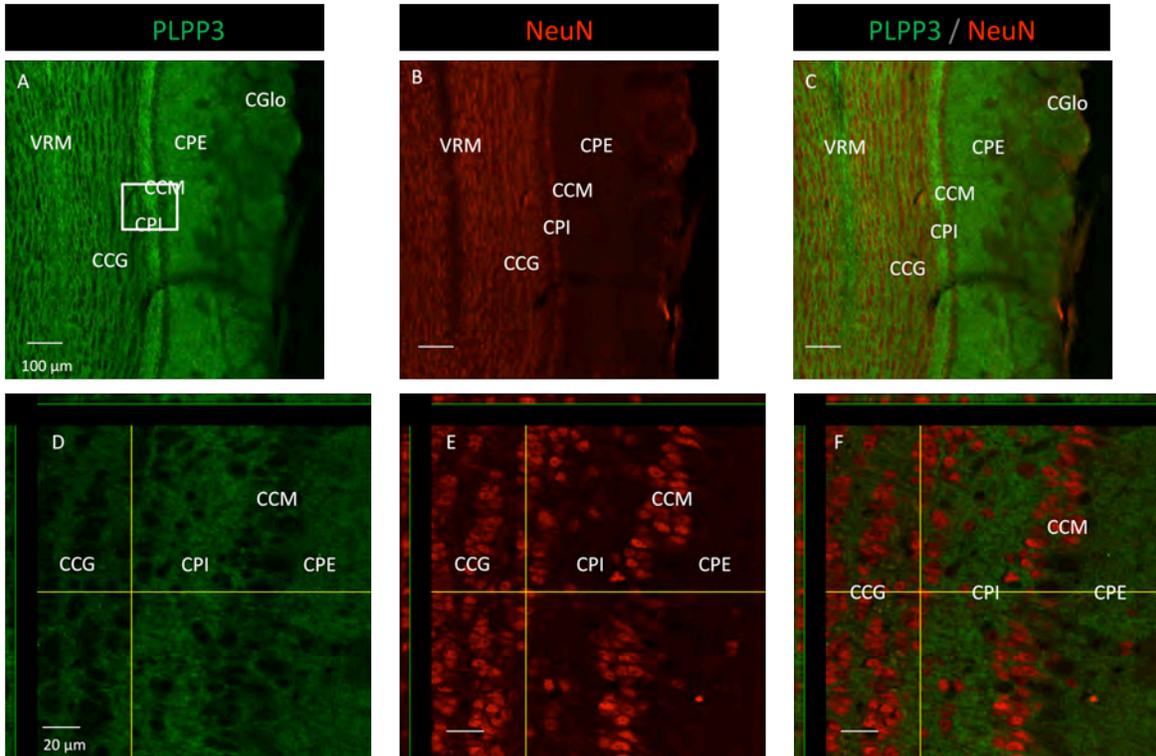


**Figura 11.-** Inmunofluorescencia para la detección de la proteína PLPP3. **A)** En BO, La expresión es abundante en CPE, CPI y VRM. **B)** Control negativo, donde se muestra la inmunofluorescencia en el cKO. **C)** Control positivo, donde se muestra la presencia de la proteína en cerebelo, tal como se ha reportado anteriormente. **D)** Control negativo sin anticuerpo primario. CGlo: Capa glomerular, CPE: Capa plexiforme externa, CCM: Capa de células mitrales, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de Células granulares, VRM: Vía rostral migratoria, ML: Capa molecular. Aumento a 10x.

### 7.1.3- PLPP3 no se expresa en neuronas maduras y tampoco en neuroblastos

#### Co-inmunotinción con NeuN

Después de determinar la localización de PLPP3 en las diferentes zonas del BO, la pregunta se encaminó acerca del tipo celular que expresa la fosfatasa. En primer lugar se observó que está ausente en las zonas que corresponden a los somas neuronales. Este hecho es particularmente evidente en los espacios vacíos que deja la marca de PLPP3 en CCM y CCG, y que son ocupados por la proteína de núcleo neuronal NeuN (Fig. 12).

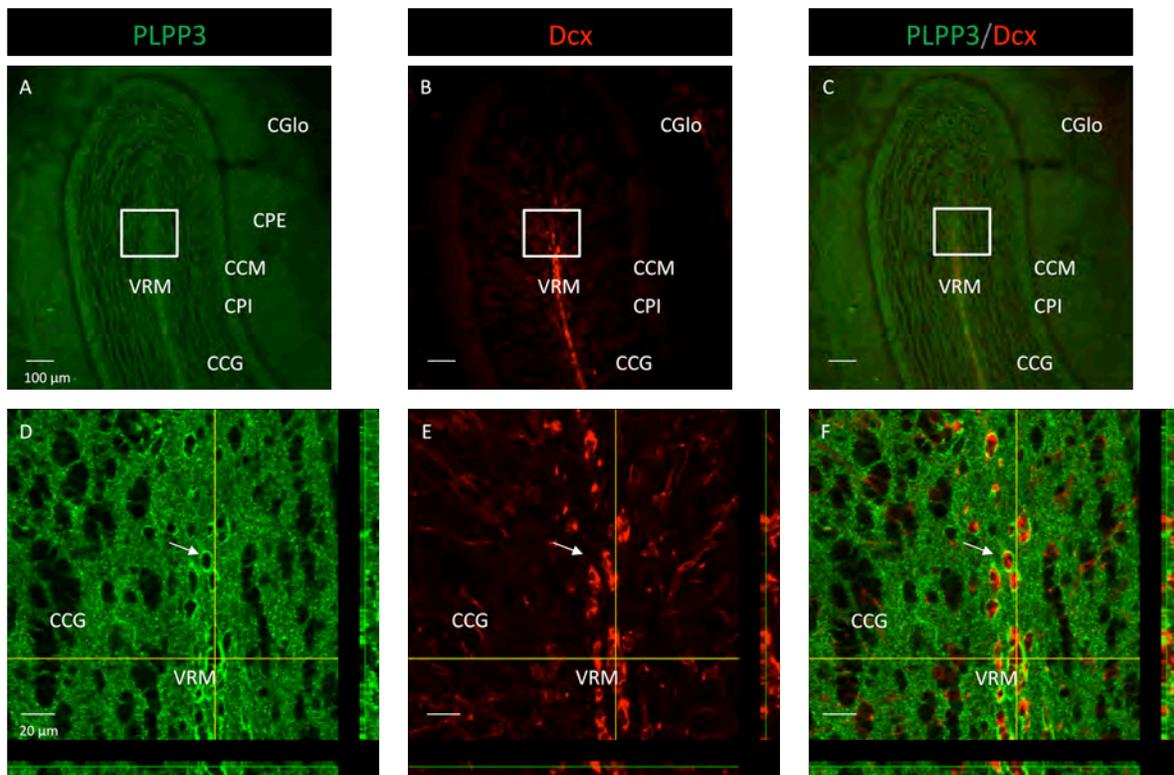


**Figura 12.-** Localización de PLPP3 en relación con los núcleos de las neuronas maduras (marcados con NeuN). En A, B y C se observa la ausencia de PLPP3 en los sitios que corresponden a las neuronas (en rojo). A 60x (D, E, F) se observa que la expresión de PLPP3 corresponde a sitios que rodean los somas neuronales.

#### Co-inmunotinción con Doble cortina (Dcx)

Una de las zonas donde PLPP3 está expresada en mayor cantidad es la VRM, zona donde los neuroblastos migran para integrarse al BO, por lo tanto se investigó si estas neuronas en desarrollo expresan PLPP3. Después de realizar la doble inmunofluorescencia se observa que la fosfatasa no se expresa en tales neuroblastos, los cuales viajan de manera ordenada y en agrupaciones, tal y como se describe en la literatura. También es posible observar neuroblastos que se han separado de la VRM para migrar de manera radial y que estos tampoco poseen PLPP3 (Fig. 13).

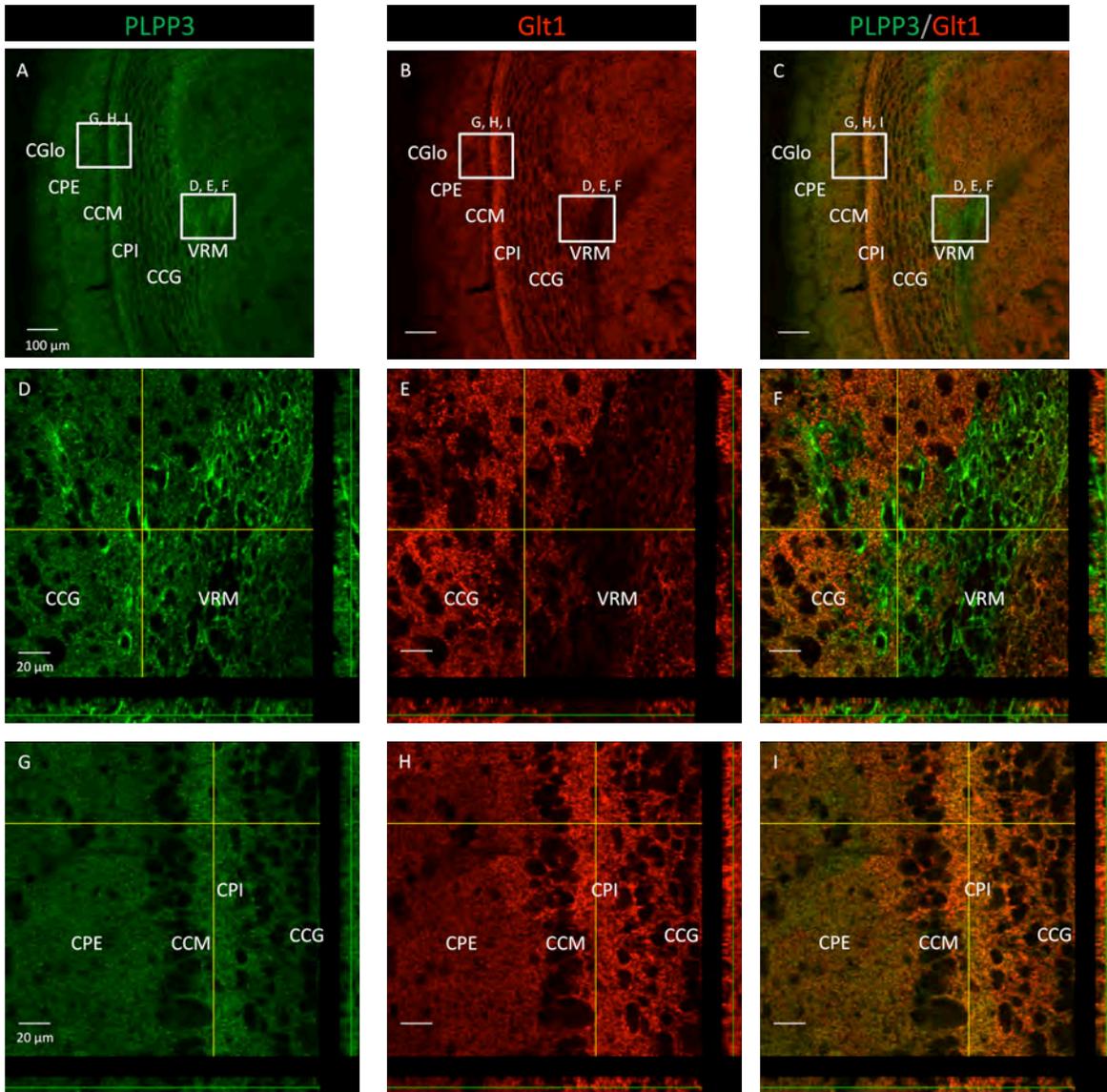
A un aumento de 60x se hace evidente que PLPP3 está expresándose de manera más abundante en un tipo celular que recubre los grupos de neuroblastos que viajan en la VRM y que corresponden a los tubos gliales (flechas en fig. 13 D y F).



**Figura 13.-** Localización de PLPP3 en relación con la proteína de neuroblastos Dcx. Se observa en A la localización característica de PLPP3 (verde) en la VRM, en B la localización de las células positivas a Dcx (rojo) y en C el traslape de imágenes. En D, E y F se muestra un aumento a 60X de la VRM donde la marca de PLPP3 está mayormente expresada alrededor de los neuroblastos (flechas), pero no dentro de estos.

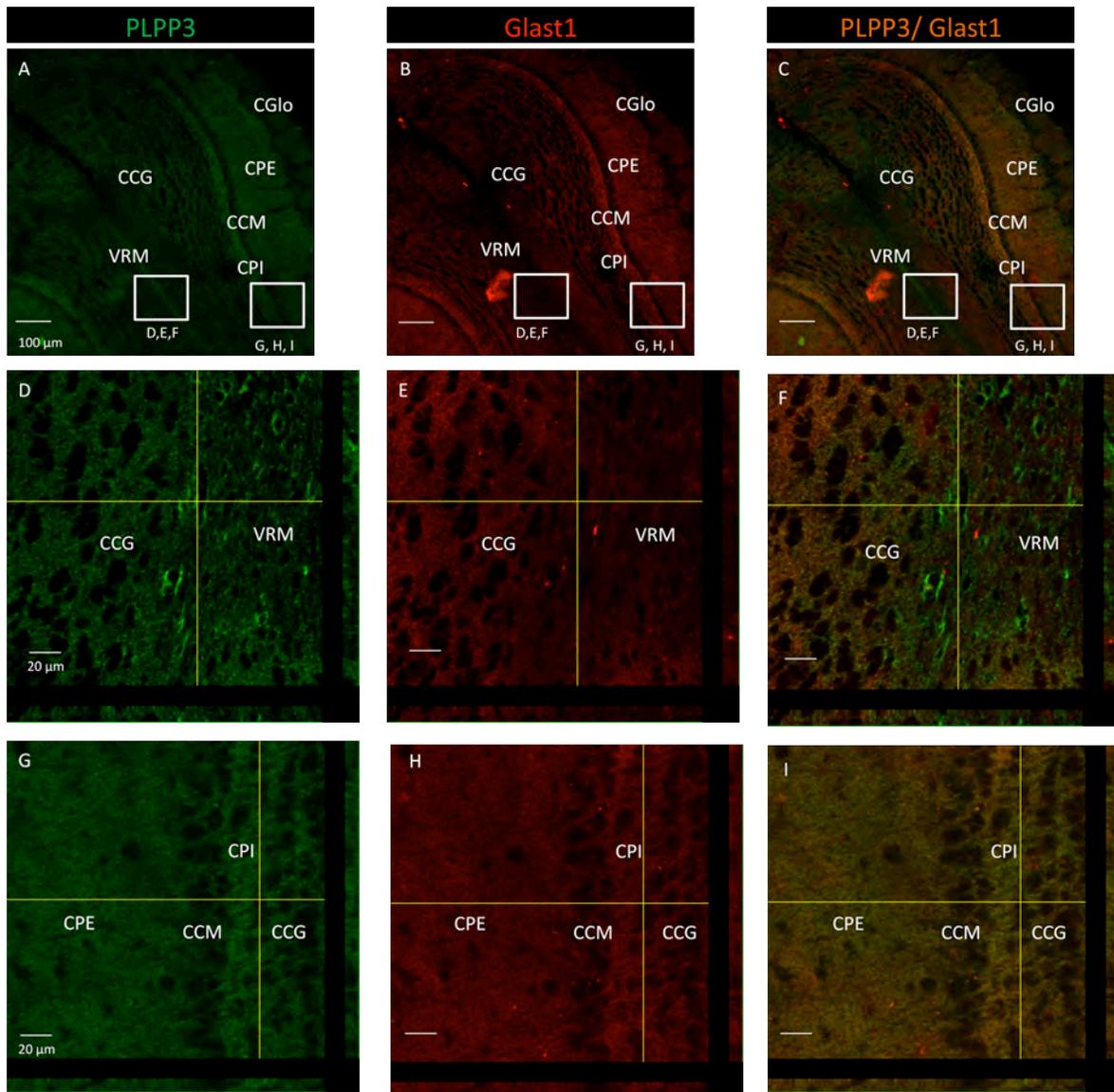
#### 7.1.4.- Plpp3 co-localiza con proteínas de membrana astrocítica

**Co-inmunomarcado con Glt1.-** Una vez que se observó que PLPP3 no está en neuroblastos y tampoco en las neuronas maduras, el siguiente aspecto fue investigar la presencia de PLPP3 en astrocitos. Fueron utilizados marcadores de proteínas membranales de astrocitos para tal efecto. La primera proteína en ser detectada fue Glt1, que es un transportador de glutamato y que tiene un patrón de expresión similar a PLPP3. Tal como es observado en la figura 14, ocurre un empalme de ambas proteínas en todas las capas, pero en VRM la proteína Glt1 está en cantidades más bajas.



**Figura 14.-** Presencia de PLPP3 en co-localización con la proteína astrocítica Glt1. En A, B y C se muestra un aumento a 10x donde se observan todas las capas, en D, E y F se observa en aumento a 60x la zona correspondiente a la VRM, mientras que en G, H e I se observa un aumento a 60x correspondiente a las capas más externas. Se muestran los planos ortogonales de los aumentos a 60x.

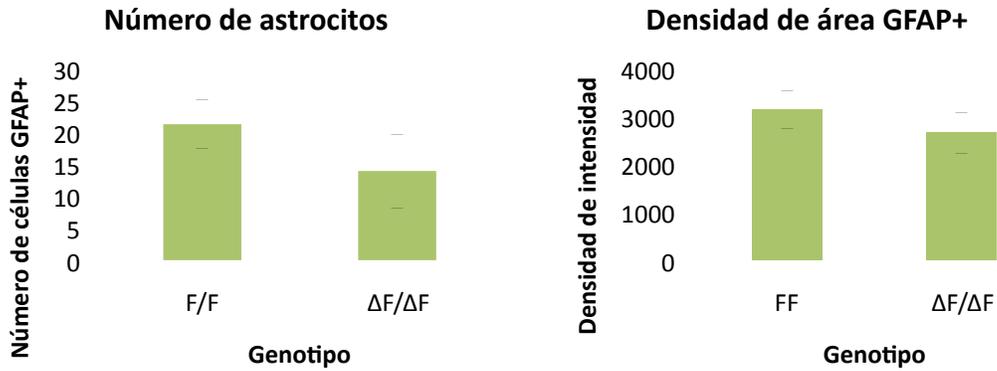
**Co-inmunomarcado con Glast.-** Otro transportador de glutamato característico de los astrocitos es Glast, que se encarga de la recaptura de glutamato. Se utilizó Glast para confirmar la presencia de PLPP3 en astrocitos mediante la presencia de esta proteína membranal. Igual que se observó con Glt1, existe la marca de Glast en los mismos sitios donde se presenta PLPP3. La marca de Glast en tubos gliales es baja en comparación con la expresión de PLPP3 (Fig. 15).



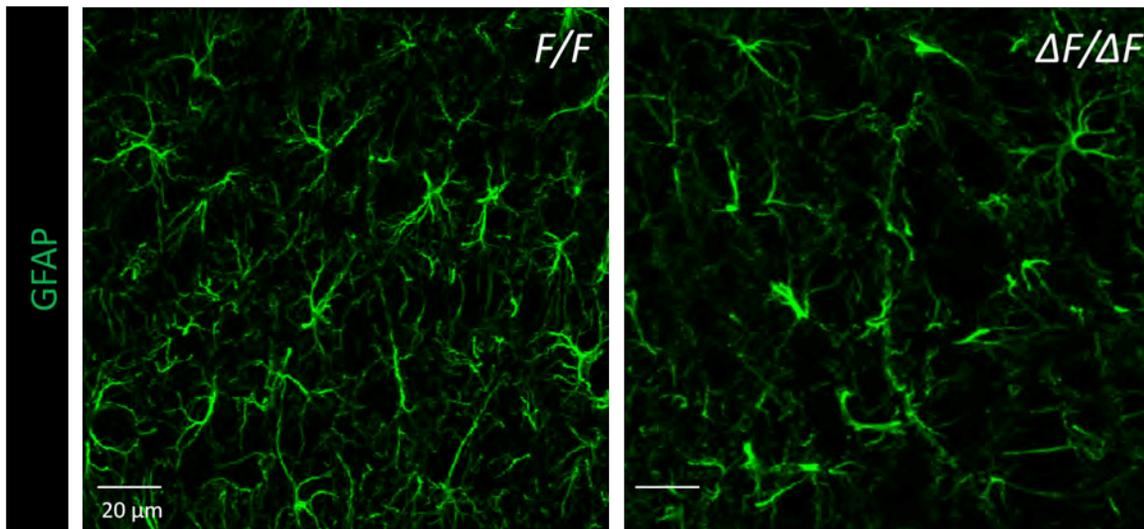
**Figura 15.-** Co-localización de PLPP3 con la proteína de astrocitos *Glact1*. En A, B y C se observa un aumento a 10x donde se observa la expresión de ambas proteínas en gran parte del BO. C, D, y E) Aumento a 60x en VRM. F, G y H) Aumento a 60x donde se observan capas más externas.

#### 7.1.5.- Número y morfología de astrocitos

Dado que PLPP3 es una proteína que se encuentra en la membrana de los astrocitos, se investigó si la deficiencia de la fosfatasa podría estar alterando sus características morfológicas o la cantidad de éstos, para lo cual se realizó el conteo de células GFAP inmunorreactivas en la capa granular. No se observaron cambios estadísticamente significativos (Figs. 16 y 17).



**Figura 16.-** A) Número de astrocitos contados en la capa granular del bulbo olfatorio (en proyecciones de 10 planos confocales), no hay diferencias significativas.  $n=3$ ,  $p=0.14$  con prueba t. B) Densidad de la intensidad cuantificada en las mismas imágenes,  $n=3$ ,  $p=0.09$  con prueba t.



**Figura 17.-** Imágenes representativas de los astrocitos, positivos a la marca GFAP en la capa granular de ratones F/F y ΔF/ΔF.

### 7.1.6.- Discusión de expresión y distribución de PLPP3 en el bulbo olfatorio y su localización celular

Por medio de dos métodos diferentes (siendo estos la actividad de un gen reportero y la inmunofluorescencia para localizar la proteína) fue posible determinar que PLPP3 está presente en todo el BO, siendo más abundante en las capas plexiformes y en la VRM. Aunque es menor, también es notoria la marca presente en otras zonas como CCG y CGlo. La localización de la expresión es también apoyada por la presencia del mRNA de *Plpp3* en BO que se observa en la base de datos del *Allen Brain Atlas* (Fig. 2).

Tal como se ha observado previamente para el cerebelo y *sustancia nigra*, PLPP3 no está presente en neuronas (López-Juárez et al., 2011; Gómez-López et al., 2016), y en este caso, tampoco en células dirigidas hacia linaje neuronal, tales como los neuroblastos. Es evidente la presencia de PLPP3 en astrocitos, pues en las diferentes capas del BO, la marca positiva a los marcadores Glast y Glt1 coincide con la marca de PLPP3 en diferentes planos focales.

En VRM la fosfatasa se encuentra de forma abundante en tubos gliales, siendo expresada de mayor manera que otros marcadores de astrocitos, como los transportadores de glutamato Glast y Glt1 (Figs. 14 y 15). La presencia de PLPP3 en tubos gliales es interesante puesto que esta proteína cuenta con un dominio RGD, que tiene interacción con integrinas y esto puede repercutir con su adhesión a los neuroblastos (Tang, *et al*, 2015). Esto tiene más relevancia observando que la VRM presenta integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 6$  (Murase y Horwitz, 2012)

Se ha demostrado que los astrocitos de zonas relacionadas con la neurogénesis (VRM y BO) son más eficientes permitiendo la migración de los neuroblastos en comparación con astrocitos de zonas no neurogénicas (*i.e.* corteza) (García-Marqués, et al. 2010). Siendo así, se despertó más el interés de postular a los lípidos bioactivos y PLPP3 como posibles moduladores del establecimiento de neuronas en el BO.

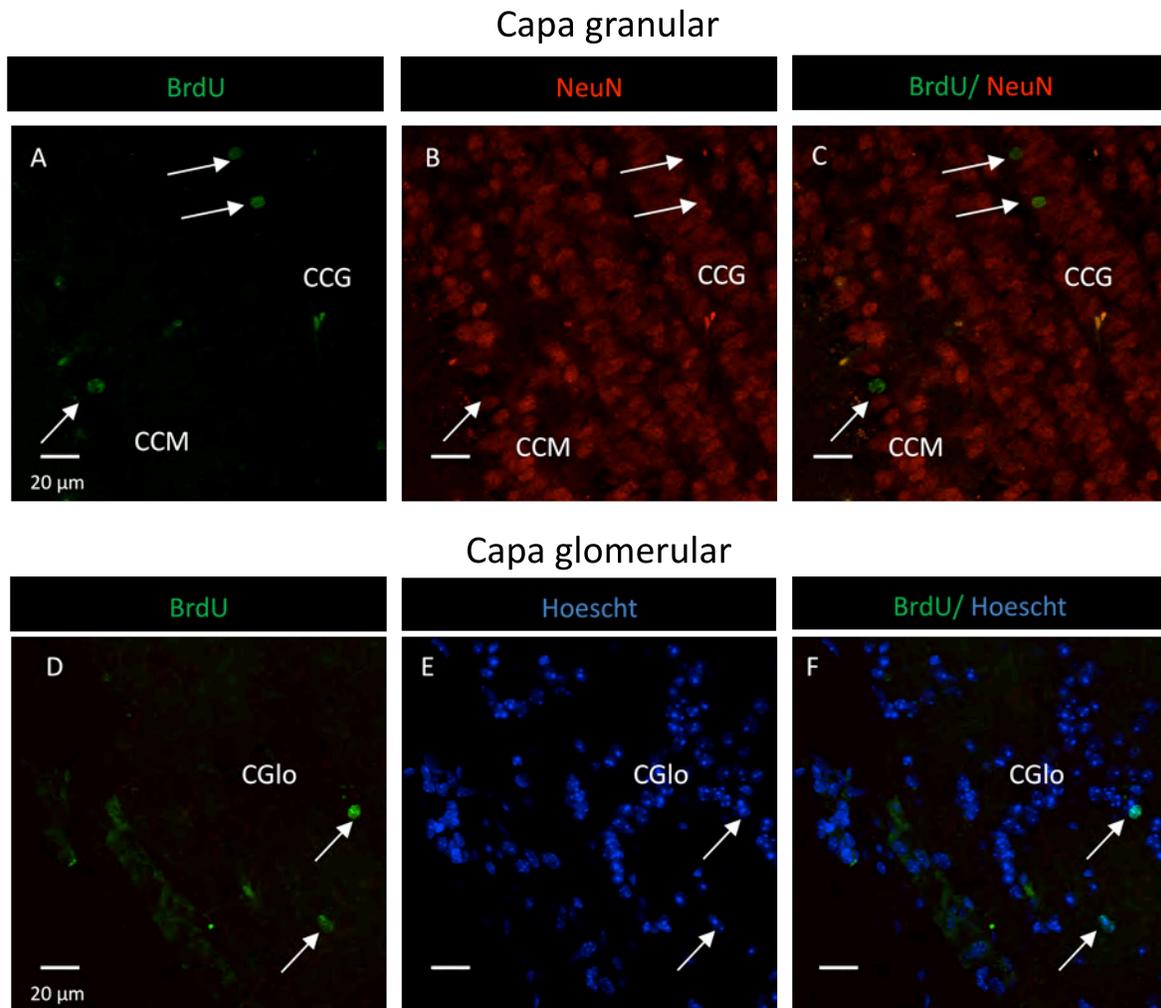
Poco se ha investigado al respecto, siendo la S1P uno de los lípidos bioactivos cuya función se ha sugerido como modulador del proceso neurogénico. Se ha reportado su relevancia en el caso de la migración radial de los neuroblastos en BO, donde S1P participa manteniendo la unión de los neuroblastos a la VRM y por lo tanto, se demostró que la disminución de uno de sus receptores ( $S1P_1$ ) en zonas anteriores de la VRM provoca la separación de los neuroblastos para el inicio de su migración radial (Alfonso et al., 2015).

Además de la neurogénesis, la presencia de PLPP3 y genes relacionados con la producción de lípidos bioactivos en el BO (Tabla 4) resulta interesante para otros procesos relevantes en SNC, tales como la regulación de la neurotransmisión, metabolismo, regulación morfológica celular, estabilidad de la barrera hematoencefálica (Schulze, *et al*, 1997), desarrollo, entre otros. La presencia del dominio RGD en PLPP3 (Tang,*et al*, 2015) también es importante para la interacción con las células que están en el entorno directo.

## 7.2.- INCORPORACIÓN DE INTERNEURONAS EN EL BULBO OLFATORIO

### 7.2.1.- Estandarización del protocolo de BrdU

Para establecer las condiciones en las cuales se trabajaron las inmunofluorescencias de BrdU/NeuN se realizaron pruebas para determinar el grosor del corte y las condiciones de la tinción. El protocolo que fue exitoso (descrito en los métodos) dio como resultado el marcaje de las neuronas en la zona granular (NeuN) y en la periglomerular, en donde se muestra la localización con Hoescht debido a que estas neuronas no son positivas para NeuN (Fig. 18).



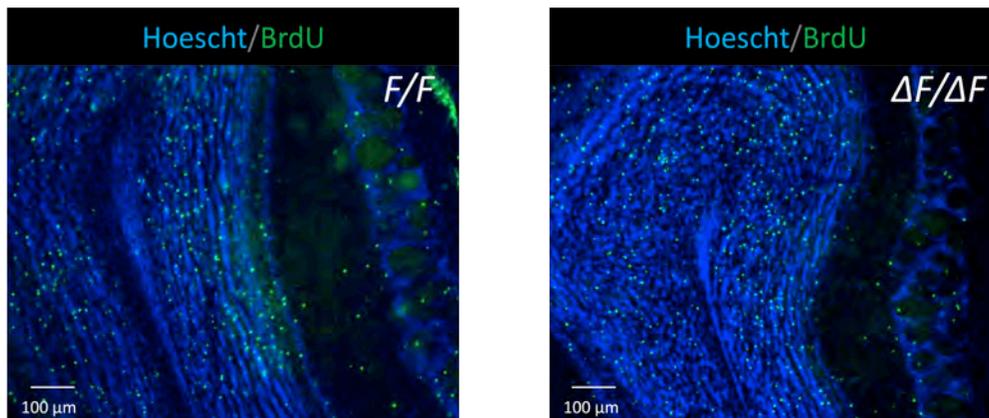
**Figura 18.-** Marcaje para BrdU (verde) presente en CCG y CGlo, donde es característica la presencia de neuronas nuevas en el individuo adulto. A-C) en CCG se muestra la co-localización con la marca de núcleo neuronal NeuN (en rojo), D-F) en CGlo se observa la marca para BrdU en las células periglomerulares.

### 7.2.2- La ausencia de PLPP3 no produce diferencias en el número de neuronas que se incorporan en la capa granular

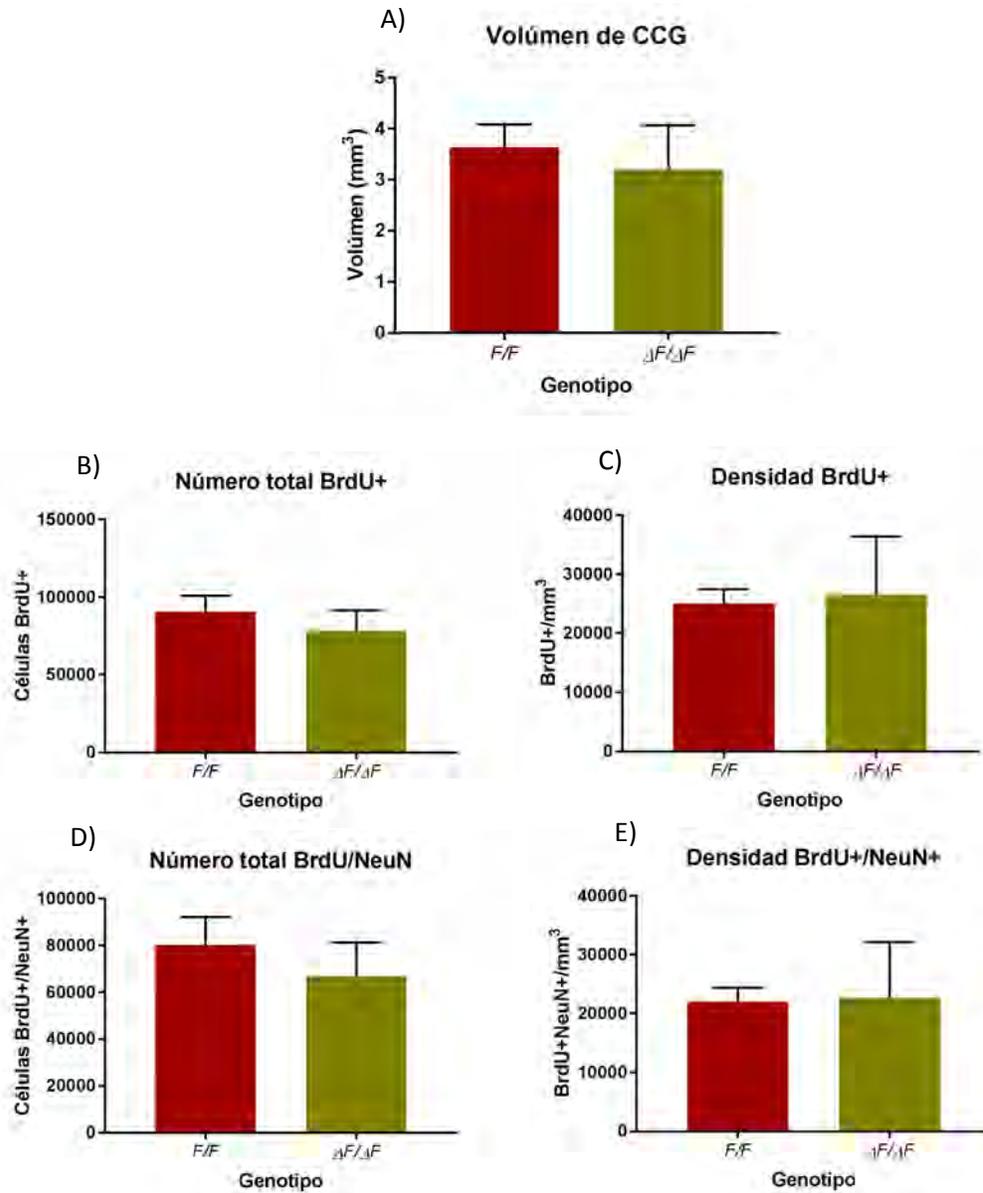
Una vez comprobada la presencia de PLPP3 en el BO, se realizó el experimento de administración de BrdU para determinar si había diferencias en la incorporación neuronal entre los ratones cKO y los controles.

Se analizó la cantidad de células que incorporaron BrdU después de 4 semanas de haber administrado el análogo de la timidina. La media total de células BrdU+ en el caso de los ratones *F/F* fue de  $87026 \pm 7145$ , mientras que en el  $\Delta F/\Delta F$  fue de  $78257 \pm 13271$  (Fig. 20 B). La densidad para los *F/F* fue de  $25023 \pm 2394$  células BrdU+/mm<sup>3</sup>, en el caso de los  $\Delta F/\Delta F$  este valor fue  $26520 \pm 9910$  (Fig. 20 C), por lo que este valor tampoco indica una diferencia significativa. La diferenciación a neuronas positivas a NeuN tampoco se vio afectada, tal como se observa en las figuras 20 D y E.

Con estos resultados se concluye que no hay diferencias significativas en la integración de interneuronas al menos en esta capa del BO. Consistente con estos resultados, el volumen de la CCG no es significativamente diferente entre estos dos genotipos (Fig. 20 E).



**Figura 19.-** Fotos representativas de células positivas para BrdU en BO después de 4 semanas de administración del análogo de la timidina. En A) se muestra el control y en B) el deficiente a la PLPP3.



**Figura 20.-** Comparación de los datos de estereología del análisis de la CCG. A) Volumen analizado de la CCG, B y C) Total y densidad de células BrdU+ y D y E) Número total y densidad de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN. Se muestran medias con desviación estándar, n=5.

### 7.2.2.- Discusión de incorporación de interneuronas

A pesar de la expresión abundante de la PLPP3 en BO, no hubo un efecto asociado a la carencia de la proteína en esta estructura y el número final de células integradas. Esto es interesante tomando en cuenta la expresión de otras proteínas relacionadas con fosfolípidos bioactivos, como S1P<sub>1</sub> (Alfonso *et al.*, 2015) y autotaxina (ver tabla 2) en el eje ZSV-VRM-BO, así como la relación que se ha establecido entre el estado quiescente de las NSC y la presencia de S1P (Codega, *et al.*, 2014). Con estos antecedentes se pensó que la deficiencia de la enzima produciría cambios en la llegada de neuronas al BO por todos los procesos involucrados.

A pesar de lo observado, no se puede descartar la posible desregulación en los procesos celulares que pueden seguir ocurriendo en el eje ZSV-VRM. Un ejemplo se puede encontrar en el trabajo de Kim y cols., 2007, donde se reporta que en un KO de la proteína pro-apoptótica Bax, no hay diferencias en el volumen del BO ni en la incorporación de interneuronas marcadas por BrdU. No obstante, las células que normalmente tendrían muerte celular, se acumulan en ZSV y VRM por mecanismos independientes de la proliferación.

Para tener el panorama completo es necesario complementar este trabajo con la observación de lo que sucede en cuanto a proliferación y migración en ZSV y VRM mediante diferentes protocolos de marcaje de BrdU y marcadores de ciclo celular, además de experimentos *in vitro*, como los que se realizan con explantes.

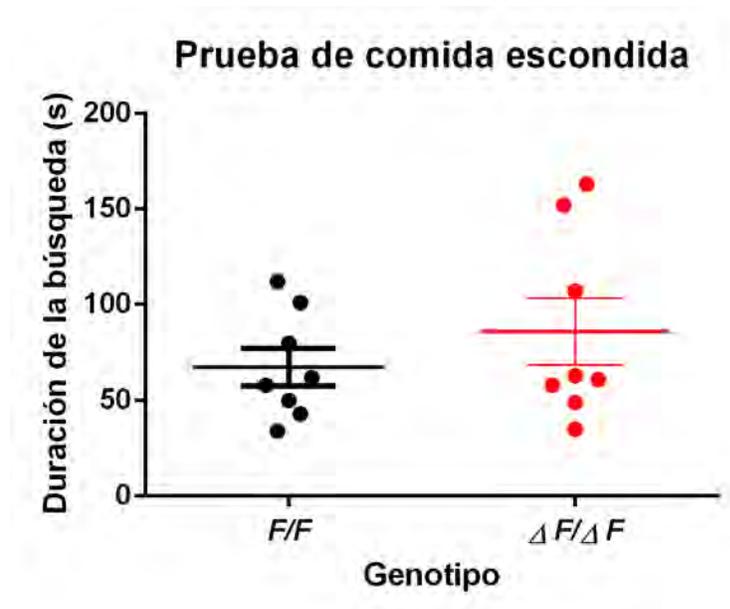
Respecto a la diferencia con lo que sucede en el GDH, donde existe un efecto en proliferación y número de células diferenciadas a linaje neuronal en respuesta a la carencia de PLPP3 (Cotzomi, 2015), en este caso hay que notar que ZSV y ZSG son nichos neurogénicos diferentes respecto a los tipos celulares que los conforman y las células troncales que responden al nicho y por lo tanto, en algunos factores presentes en el microambiente. En este caso, al menos en el número final de neuronas integradas, se puede hablar de que PLPP3 es uno de estos mecanismos diferenciales que en hipocampo sí ejercen un efecto, pero no en BO.

### 7.3.- CÓMO INFLUYE PLPP3 EN EL OLFATO

Ambas pruebas conductuales realizadas en este estudio se hicieron con el objetivo de medir la habilidad para percibir un odorante por parte de los ratones y así determinar las posibles deficiencias en este aspecto de la conducta olfatoria. La diferencia entre pruebas radica en la motivación para detectar el odorante, pues en la prueba de comida escondida, se les removió el alimento a los ratones, mientras que en la prueba de contenedores la motivación de búsqueda fue la presencia de un olor novedoso.

#### 7.3.1.-Prueba de comida escondida

Para esta prueba se cuantificó la latencia de llegada a un pellet escondido debajo del aserrín a partir del momento en el que se les colocó en la caja; como se observa en la gráfica de dispersión, no hay diferencias entre los diferentes genotipos. La mayoría de los datos se agrupan entre 40 y 60 segundos, habiendo datos que se salen de este rango (Fig. 21). Otro aspecto de esta prueba que normalmente se observa es la cantidad de alimento consumida, en este caso todos los ratones comieron cerca de 0.1 g del pellet de comida.

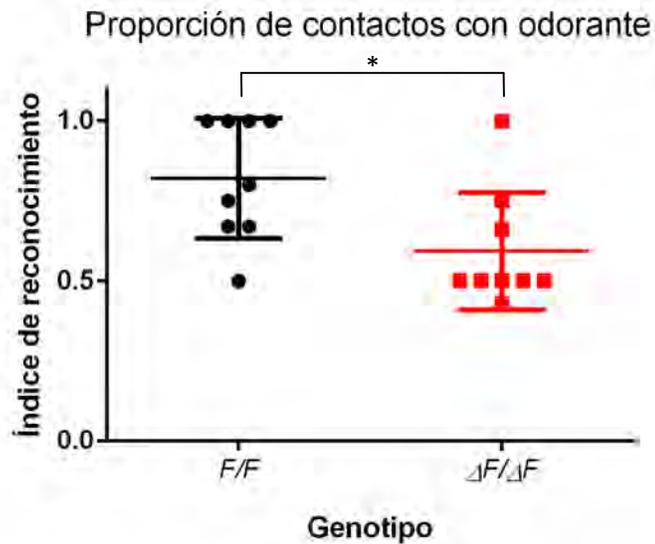


**Figura 21.-** Prueba de comida escondida. Se grafica el tiempo que tardaron los ratones en encontrar el pellet escondido tanto en el grupo control como en el mutante (Se muestran medias  $\pm$  error estándar,  $n=8$ ,  $p=0.52$  con  $t$  de student).

#### 7.3.2.- Prueba de contenedores

En esta prueba se midió el tiempo que los ratones permanecían en el contenedor que tenía un odorante a comparación de la permanencia en un contenedor que sólo tenía agua. Un número

superior a 0.5 indica preferencia por el odorante, en 0.5 se indicaría que no hay preferencia por ninguno y debajo de este número se indicaría preferencia por el contenedor sin el odorante (Fig. 22). En este experimento es posible observar que los ratones mutantes tienen una menor proporción de contactos con el contenedor que tiene el olor, que en este caso fue crema de cacahuate (Fig. 22).



**Figura 22.-** Prueba de detección de olores en contenedor. Índice de contactos con el contenedor que tenía el odorante de crema de cacahuate. Índice de reconocimiento= contactos con odorante/ (contactos con odorante/contactos no odorante) (Se muestran medias  $\pm$  desviación estándar, n=9; \*p=0.015 con prueba de Mann Whitney).

### 7.3.3.- Discusión de conducta olfativa

Con los datos que se tienen hasta el momento es posible sugerir que la función olfativa está disminuida en el aspecto de la detección de olores. Si bien la prueba de comida escondida no arroja diferencias, en la prueba de detección de contenedores con odorante hay una disminución significativa del número de contactos con el estímulo olfativo.

El factor involucrado es la motivación que impulsa la búsqueda del odorante, puesto que para buscar la comida escondida, los ratones están en ayuno, mientras que la prueba de contenedores se basa en que los ratones exploran olores novedosos. En este caso, la alternativa a un olfato deficiente, es anhedonia o falta de motivación, la cual está relacionada con depresión (Krishnan & Nestler, 2012).

Tomando en cuenta que los ratones deficientes de PLPP3 incorporan interneuronas de manera normal, es necesario observar los estudios donde las deficiencias olfativas son independientes a la neurogénesis. Este es el caso de Petit y cols en 2013, en donde ratones transgénicos que sobre-expresaban  $\alpha$ -sinucleína tenían deficiencias en el umbral de detección de odorantes, así como en memoria olfativa a corto plazo.

Previamente se ha reportado que los ratones deficientes en PLPP3 tienen fallas en la liberación de dopamina en estriado (Gómez-López *et al.*, 2016), por lo que esta característica podría estar afectada también en las neuronas dopaminérgicas del BO. Ya se ha observado que la inhibición de estas neuronas produce fallos en la conducta olfativa, particularmente en la discriminación de odorantes (Escanilla, *et al.* 2010).

Además de la dopamina, puede haber otros neurotransmisores que cuya desregulación podría estar afectada, como glutamato y GABA, cuya liberación se ha visto facilitada por fosfolípidos bioactivos como S1P1 (Kajimoto *et al.*, 2007). El aspecto de la neurotransmisión es interesante sobretodo observando que las capas plexiformes, donde hay abundante expresión de PLPP3, son sitios de muchos contactos sinápticos, procedentes tanto de CCG como de corteza (Revisado en Matsutani & Yamamoto, 2008).

Se ha reportado la presencia de receptores de LPA en la glía olfatoria envolvente (Yan *et al.*, 2003), por lo cual una desregulación del ligando podría alterar las condiciones de este estrato.

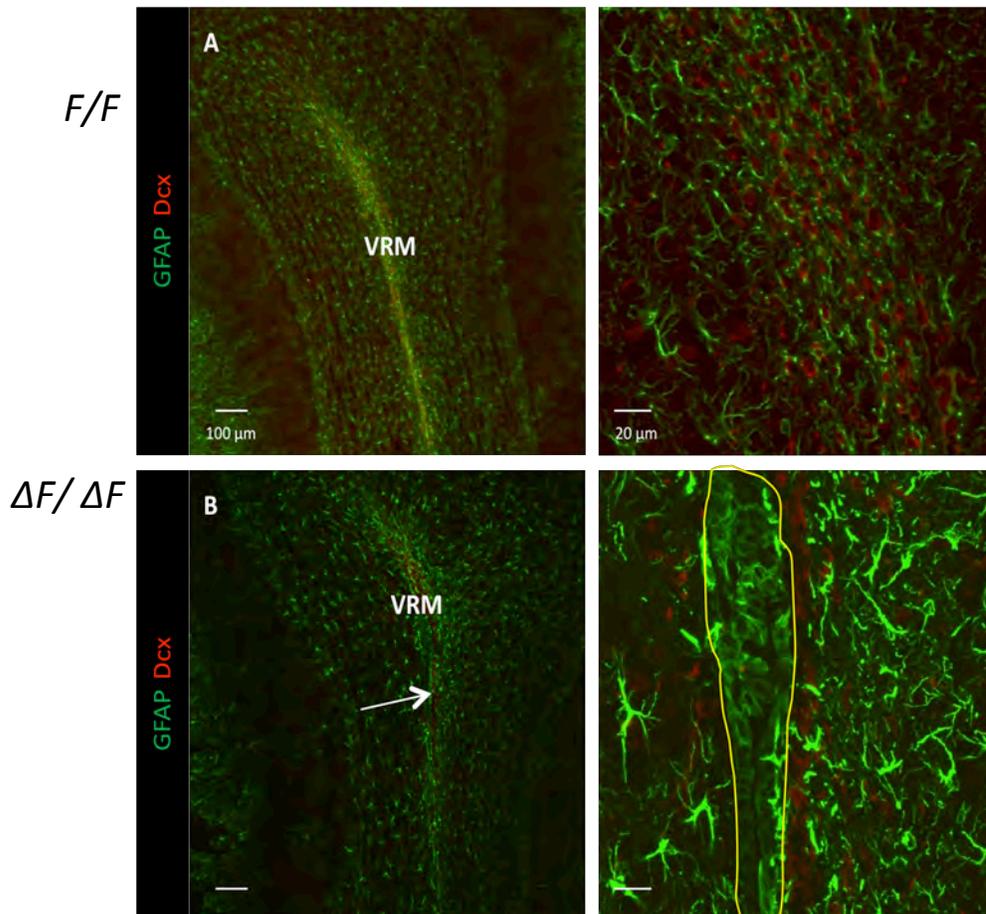
## 7.4.- PERMANENCIA DE VENTRÍCULOS OLFATORIOS EN LA VÍA ROSTRAL MIGRATORIA DE ANIMALES DEFICIENTES EN PLPP3

### 7.4.1- Ventrículos olfatorios en los ratones mutantes

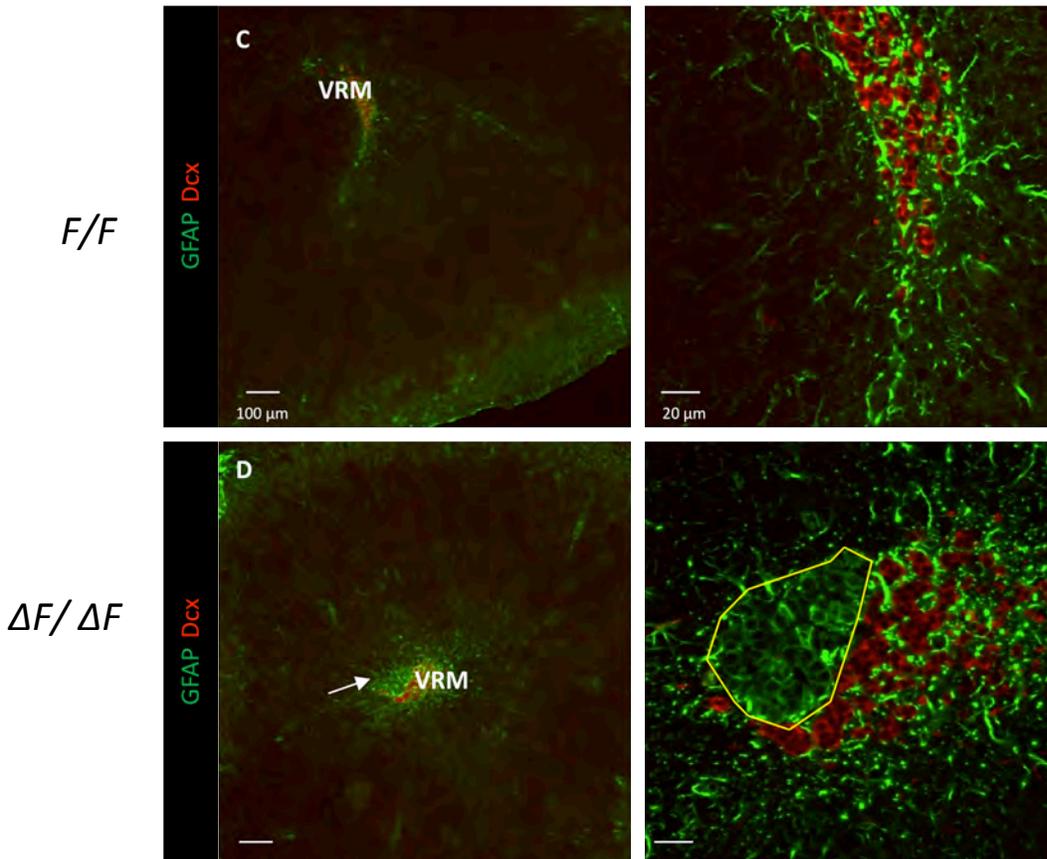
Mientras se realizaban observaciones del marcaje de neuroblastos en la VRM, se notó que a diferencia de los ratones control, los mutantes presentaron huecos carentes de neuroblastos (pues carecían de marca Dcx+) acompañando a la VRM. Las estructuras mencionadas contenían células inmunopositivas para el marcador astrocítico GFAP, que a diferencia de los tubos gliales, tenían una conformación organizada en un tejido epitelial cúbico simple y que asemejaba una cavidad (Fig. 23 regiones rodeadas de una línea amarilla).

Este tejido presente sólo en los mutantes, se distribuyó a lo largo de todo el eje antero-posterior del BO y en zonas anteriores (Fig. 23 C y D), con lo que se sugiere que esta estructura corresponde a una continuidad con los ventrículos laterales.

### BO anterior



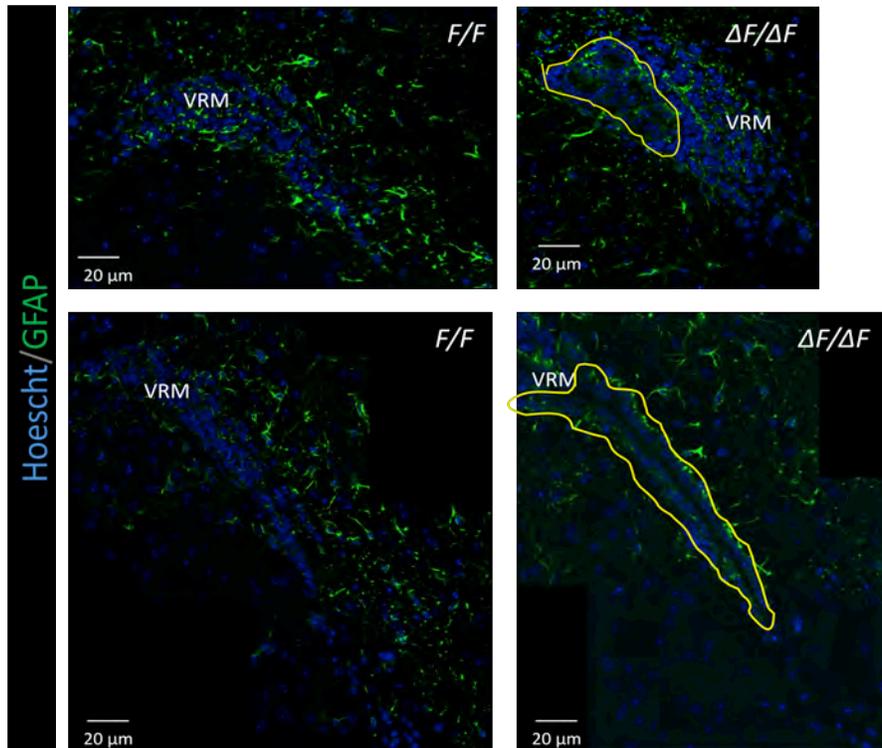
## Zona posterior al BO



**Figura 23.-** VRM de los *cKO* presenta una estructura epitelial cúbica positiva a GFAP. En A y B se muestran la condición control (*F/F*) y mutante ( $\Delta F/\Delta F$ ) en una zona anterior del BO. En B y D se muestra la VRM en regiones posteriores del BO, en perímetro amarillo se distingue la estructura epitelial. Las estructuras epiteliales positivas a la marca de GFAP son visibles en un aumento de 10x (flechas) y en aumento de 60x se distingue su morfología ( $n=8$ ).

### Ventrículo extendido en VRM (antes de entrar al BO)

Para determinar si el ventrículo del BO en ratones  $\Delta F/\Delta F$  es una continuidad de los ventrículos laterales, se realizaron cortes coronales en zonas posteriores al BO. En todos los cortes tomados en estas zonas, se observó que la VRM tenía asociada el ventrículo mencionado (Fig. 24), lo cual sugiere que esta estructura es una continuidad con los ventrículos laterales.

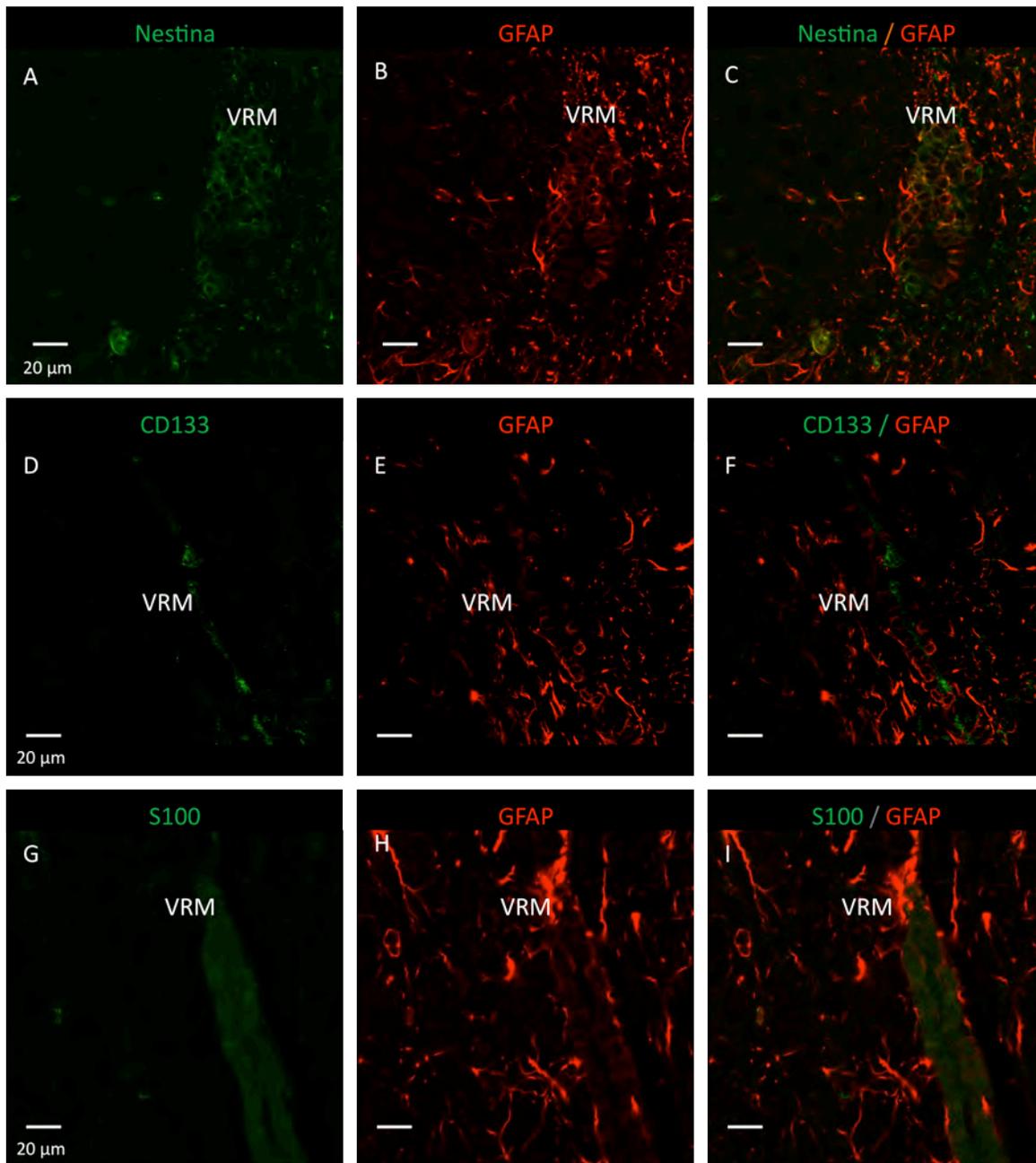


**Figura 24.-** El ventrículo olfatorio (flechas) presente en los mutantes está siempre adyacente a la VRM, desde las regiones más posteriores al BO, por lo que potencialmente es una extensión de los ventrículos laterales.

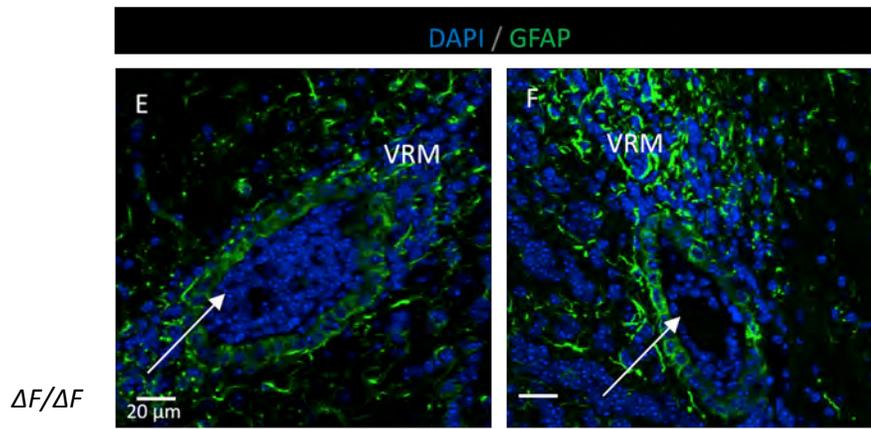
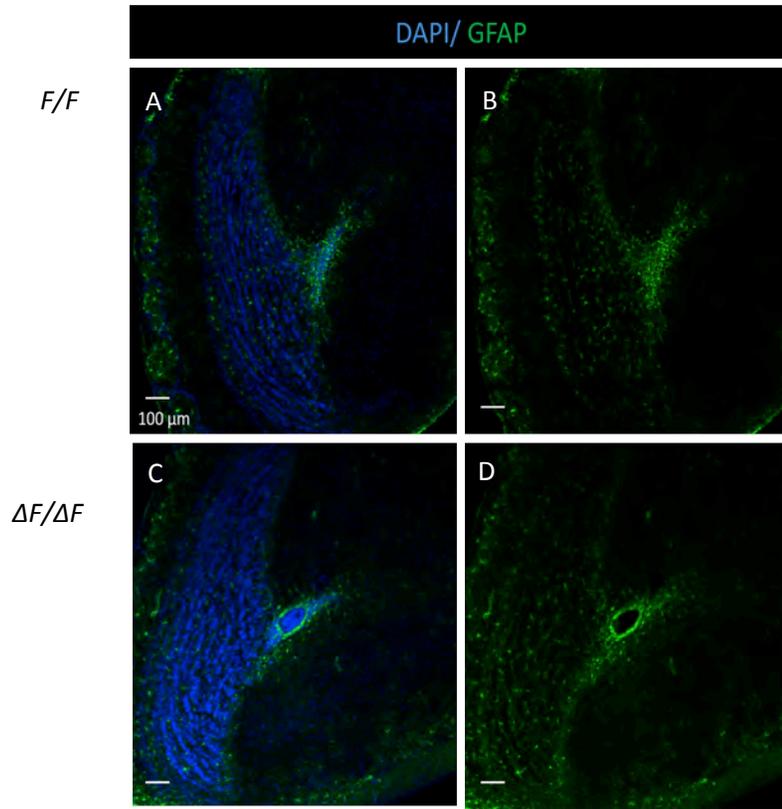
#### 7.4.2.- Naturaleza epéndimo-astrocítica del epitelio ventricular del BO

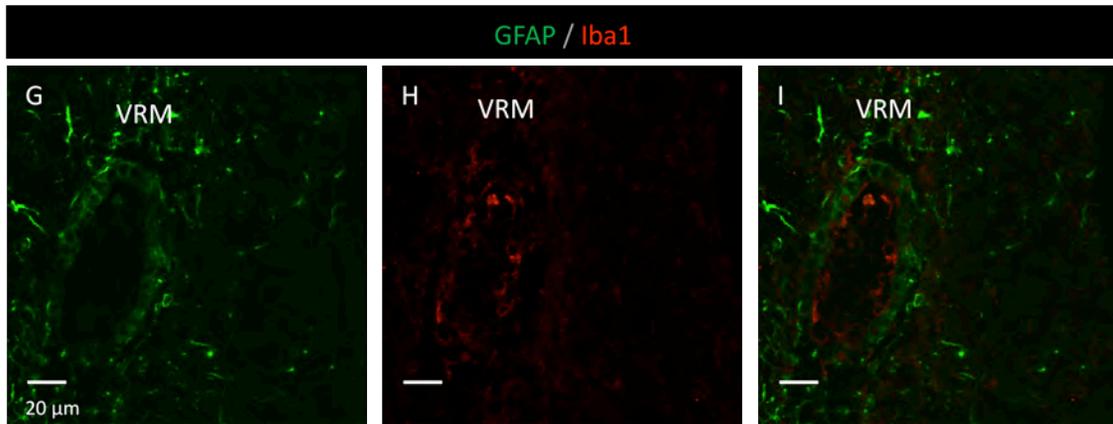
Habiendo observado que los ratones mutantes presentaron una estructura ventricular, se utilizaron marcadores de células ependimales, que son las células que bordean los ventrículos cerebrales. Se han encontrado marcadores como GFAP, nestina, S100 y prominina (CD133) (Tabla 7, Fig. 25), lo cual indica un fenotipo ependimal, pero con la peculiaridad de que expresa un marcador astrocítico como lo es GFAP. La prominina particularmente, evidencia la presencia de cilios en la parte apical de las células cuboidales, tal como sucede con las células ependimales.

Este epitelio presenta a lo largo del eje antero-posterior diferentes formas que evidencian plegamiento de la estructura. En algunos casos hay células encapsuladas al interior de estas cavidades (Fig. 25 flechas). Estas células son positivas en su periferia por el marcador de microglía Iba1, cuya búsqueda se hizo tomando en cuenta que existe un reporte que menciona que este tipo celular participa en el cierre de los ventrículos olfatorios en etapas embrionarias (Mestres & Rascher, 1981).



**Figura 25.-** Marcadores endodiales en las células que bordean el ventrículo olfatorio de los mutantes en *PLPP3*, A-C: Presencia de nestina y GFAP, D-F: CD133, marcador de cilios en la parte apical de las células cúbicas positivas para GFAP. G-I: Marcaje para la proteína S100 característica de células endodiales y astrocitos maduros. A-F: Aumento a 60x, G-I: Aumento a 63x.





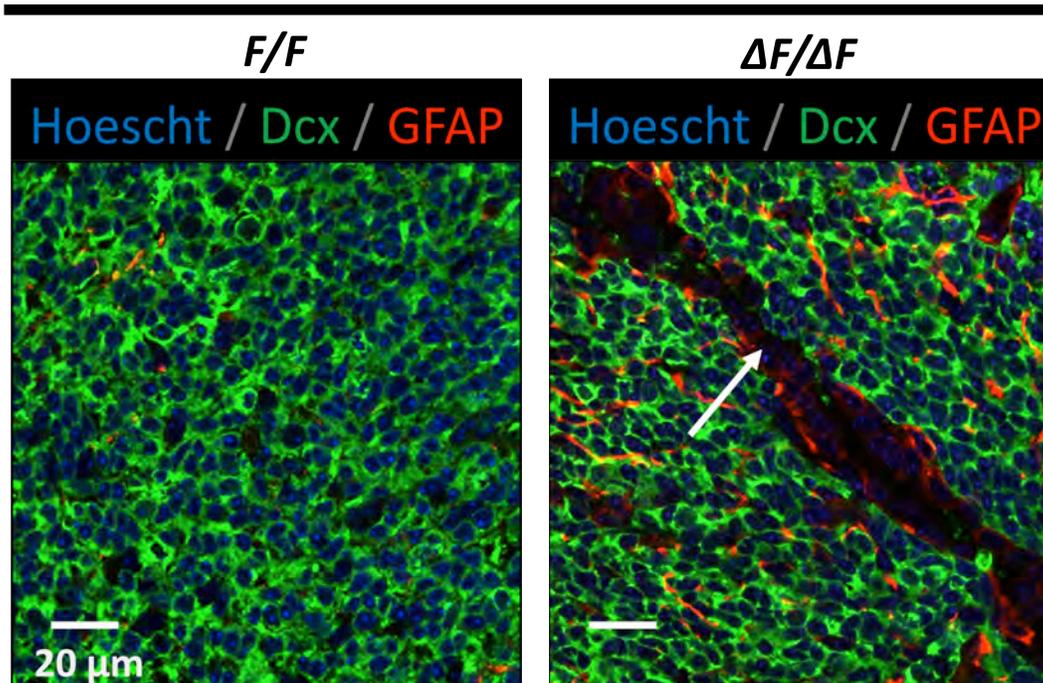
**Figura 26.-** En el mutante de PLPP3.-se ven en algunos casos conglomerados celulares dentro de los ventrículos asociados a la VRM. A y B) Ratones control, donde la VRM se observa como una continuidad, mientras en C y D) hay un ventrículo adyacente a tal estructura, aumento a 10x. E-F) Conglomerados de células (flechas) al interior de las cavidades que se observaron en algunos casos, visualizadas en aumento 60x. G-H) Células positivas para el marcador de microglía Iba1 (rojo) dentro del ventrículo olfatorio delimitado por las células epiteliales positivas para GFAP (verde).

**Tabla 7.-** Lista de marcadores utilizados en la caracterización de la estructura epitelial cúbica encontrada en la VRM.

Marca	Positivo	Negativo
GFAP	X	
Nestina	X	
CD133	X	
S100	X	
Doblecortina		X
BrdU (pulso de 2 hrs)		X

#### 7.4.3.- Presencia del ventrículo olfatorio en el día posnatal 5

Para comprobar que el ventrículo olfatorio es un defecto del desarrollo, se realizaron inmunofluorescencias en BOs de ratones en etapa posnatal 5 (P5), etapa donde normalmente ya debió haber cerrado esta zona ventricular. En los BOs de los  $\Delta F/\Delta F$ , existe una cavidad bordeada por células epiteliales positivas al marcador astrocítico GFAP (Fig. 27B, flecha), misma que en los controles no está presente.



**Figura 27.-** VRM en BO de ratones en el día posnatal 5. A) La VRM se observa como una zona con una abundante densidad de neuroblastos (en verde), B) en el mutante esta estructura presenta una apertura bordeada por células GFAP+. Aumento a 40x.

#### 7.4.4.- Discusión de ventrículos olfatorios inducidos por la deficiencia de PLPP3

En las observaciones hechas en los ratones deficientes a PLPP3 fue evidente la existencia de una estructura positiva para GFAP, marcador de astrocitos, y para marcadores de epéndima, formando un epitelio simple cúbico y que forma una cavidad adyacente a la VRM. Este epitelio es común a todos los ratones mutantes examinados hasta el momento y no está en los controles. La importancia de este hallazgo radica en que el cerebro adulto del ratón carece de ventrículos olfatorios, pues la zona ventricular en esta parte del cerebro se termina de cerrar aproximadamente en el día 3 posnatal (Ponti, *et al.*, 2011; Peretto, *et al.* 2005; Puche & Shipley, 2001).

La extensión de los ventrículos laterales hasta el bulbo olfatorio se observa en varias especies de mamíferos como el cuy, el conejo y el cerdo (Jara, *et al.* 2016; Brunjes, *et al.* 2016; Ponti, *et al.* 2011), pero no en ratón. En el caso del cuy, el ventrículo olfatorio es bordeado por un epitelio cúbico positivo a GFAP (Jara, *et al.* 2016), ocurriendo lo mismo con cerdos (Brunjes *et al.*, 2016).

En ratones, las células ependimales tienen marca de GFAP sólo en etapas posnatales tempranas; presentándose en la transición de glía radial a células ependimales maduras (Spassky *et al.*, 2005),

por lo que se podría pensar que estas células tipo ependimal son el producto de un desarrollo incompleto. El marcaje con GFAP también se encuentra en células que están reparando la epéndima después de haber recibido un estímulo nocivo, la expresión del marcador astrocítico es debido a que se propone que las células que reparan la epéndima son astrocitos (Luo et al., 2009; Kuo et al., 2006).

Respecto al origen de este ventrículo anormal, es posible determinar que esta estructura proviene de un defecto en el desarrollo. Esto se afirma debido a que ratones mutantes analizados en día posnatal 5 (etapa donde ya debió cerrar esta zona ventricular) mantienen la estructura ventricular en el BO a diferencia de los controles, donde ya no hay tal formación.

Los mecanismos que promueven el cierre del ventrículo olfatorio en etapas embrionarias tardías es un tema que se desconoce, teniendo evidencia indirecta para poder dar una explicación al respecto. Entre los aspectos que podrían estar interviniendo está la desregulación de fosfolípidos bioactivos debido a la deficiencia de PLPP3. Se ha reportado por ejemplo, la importancia del LPA en la morfogénesis ventricular, siendo que un exceso de esta molécula en los ventrículos laterales de ratones embrionarios (E13.5) induce hidrocefalias, lo cual es mediado por los receptores 1 y 2 de LPA (Yung et al., 2011).

Un evento celular relacionado con el cierre del ventrículo olfatorio es la presencia de conjuntos celulares que se ubican en los bordes del ventrículo que se retrae para madurar. Estos grupos de células se identificaron mediante microscopía electrónica como microglía (Mestres & Rascher, 1981), por lo tanto este puede ser un aspecto interesante para investigar en los días iniciales posnatales.

Queda pendiente comprobar que esta estructura ventricular forma una continuidad con los ventrículos laterales, que significaría el paso de fluido cerebroespinal hacia la zona. Esto se puede realizar con una inyección de un colorante que difunda por los ventrículos para observar si se integra en las paredes del ventrículo del bulbo olfatorio en los mutantes. La comparación con las células ependimales se puede hacer por microscopía electrónica para observar similitudes en la ultraestructura, visto que hay similitudes en marcadores moleculares.

Se descarta que puedan ser tumores ependimales (ependimomas), pues a pesar de que esta estructura comparte características morfológicas (rosetas) y moleculares (presencia de GFAP, nestina y S100) con los mismos (Aizawa et al., 2011; Taylor et al., 2005), la falta de actividad proliferativa (Fig. anexa 1) contradice la posibilidad.

## 8.5.- Discusión final

Uno de los temas más interesantes en el estudio de la neurogénesis adulta es la investigación de los factores que permiten que una neurona nueva se integre en un órgano cuyos circuitos están formados en su mayor parte. Es por esto que PLPP3, proteína que regula de manera importante fosfolípidos bioactivos (Kok et al., 2012) y que tiene influencia en la neurogénesis del hipocampo (Cotzomi, 2015), surgió como un potencial candidato en la modulación de la neurogénesis del BO.

La localización celular de PLPP3 coincide con estudios previos donde se reporta a PLPP3 como una proteína astrocítica en cerebelo y en *sustancia nigra* (López-Juárez, et al. 2011; Gómez-López, 2016). PLPP3 en los astrocitos puede estar influyendo ya sea de manera autónoma en los astrocitos, o bien de manera no autónoma en las neuronas u oligodendrocitos, modulando moléculas relacionadas con neurotransmisión, metabolismo, inflamación y señalización (Chalfant & Spiegel, 2005; Mitroi et al., 2016; Kajimoto, et al, 2007; Amaral, et al, 2013)

En este estudio se observó un fenotipo que sugerentemente tiene una olfacción disminuida, lo cual ocurre independientemente de la neurogénesis en capa granular, por lo que quedan otras posibilidades. Una de ellas es un defecto asociado a neurotransmisión, puesto que la falta de PLPP3 en SNC induce una deficiente liberación de dopamina (Gómez-López et al., 2016). Ya que en la CGlo del BO hay neuronas dopaminérgicas (Sequerra, 2014), podría ocurrir algo similar en esta estructura.

Otra función que no se analizó en este estudio y que podría ser afectada, es la incorporación de neuronas periglomerulares, ya sea en su número o ubicación. Esto se propone además observando que los mutantes tienen un ventrículo que podría funcionar como barrera para la distribución adecuada de los neuroblastos.

La permanencia de un ventrículo olfatorio en los ratones deficientes a PLPP3 es interesante tomando en cuenta que en ratones la estructura ventricular del BO se cierra en los primeros días posnatales (Ponti, et al, 2011; Peretto, et al. 2005; Puche & Shipley, 2001). Debido a la falta de antecedentes que reporten este fenotipo en ratones, no se conoce su relevancia para la función olfativa.

La observación de células tipo endodimal en el borde del ventrículo olfatorio de los mutantes es otro aspecto importante de este descubrimiento. Esto permitirá indagar la participación de fosfolípidos bioactivos en la diferenciación endodimal. La relación se puede proponer observando que FoxJ1, factor de transcripción importante en diferenciación endodimal, participa en la regulación de la expresión del gen de la autotaxina (*Enpp2*), enzima productora de LPA (Jacquet et al., 2009).

## 9.- Bibliografía

- Aizawa, T., Hasegawa, K., Ohkumo, T., Haga, S., Ikeda, K., & Yoshikawa, K. (2011). Neural stem cell-like gene expression in a mouse ependymoma cell line transformed by human BK polyomavirus. *Cancer Science*, *102*(1), 122–129. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01775.x>
- Alfonso, J., Penkert, H., Duman, C., Zuccotti, A., & Monyer, H. (2015). Downregulation of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Promotes the Switch from Tangential to Radial Migration in the OB. *Journal of Neuroscience*, *35*(40), 13659–13672. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1353-15.2015>
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(4), 287–93. <http://doi.org/10.1038/35067582>
- Amaral, A. I., Meisingset, T. W., Kotter, M. R., & Sonnewald, U. (2013). Metabolic aspects of Neuron-Oligodendrocyte-Astrocyte interactions, *4*(May), 1–5. <http://doi.org/10.3389/fendo.2013.00054>
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., & Fishell, G. (2008). The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(15), 3966–3975. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5625-07.2008>
- Boutin, C., Hardt, O., de Chevigny, A., Coré, N., Goebbels, S., Seidenfaden, R., ... Cremer, H. (2010). NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(3), 1201–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0909015107>
- Bovetti, S., Hsieh, Y.-C., Bovolín, P., Perroteau, I., Kazunori, T., & Puche, A. C. (2007). Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(22), 5976–5980. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0678-07.2007>
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M. R., & Saghatelian, A. (2009). Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(48), 15245–15257. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3606-09.2009>
- Brindley, D. N., & Pilquill, C. (2008). Lipid phosphate phosphatases and signaling. *The Journal of Lipid Research*, *50*(Supplement), S225–S230. <http://doi.org/10.1194/jlr.R800055-JLR200>
- Brunjes, P. C., Feldman, S., & Osterberg, S. K. (2016). The pig olfactory brain: A primer. *Chemical Senses*, *41*(5), 415–425. <http://doi.org/10.1093/chemse/bjw016>
- Chalfant, C. E., & Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate:

- expanding roles in cell signaling. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 20), 4605–4612. <http://doi.org/10.1242/jcs.02637>
- Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, a, Rougon, G., & Cremer, H. (2000). Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4), 1446–1457.
- 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(3), 545–559. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.039>
- Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. a, Kaushal, D., & Chun, J. (2000). Requirement for the IpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13384–13389. <http://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13384>
- Cotzomi, I. (2015). *Efectos de la deficiencia de Lpp3 en la neurogénesis adulta del hipocampo*.
- Doetsch, F., & Alvarez-Buylla, a. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14895–14900. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895>
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, a. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 5046–5061.
- Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H.-S., Jr-Gang-Cheng, ... Stewart, C. L. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development (Cambridge, England)*, 130, 4623–4637. <http://doi.org/10.1242/dev.00635>
- Escalante-Alcalde, D., Sanchez-Sanchez, R., & Stewart, C. (2007). Generation of a Conditional Ppap2b/Lpp3 Null Allele. *Genesis*, 45, 465–469. <http://doi.org/10.1002/dvg>
- Escanilla, O., Yuhas, C., Marzan, D., & Linster, C. (2010). Dopaminergic modulation of olfactory bulb processing affects odor discrimination learning in rats, 123(4), 828–833. <http://doi.org/10.1037/a0015855>.Dopaminergic
- Farooqui, A., & Horrocks, L. (2007). Lysophosphatidic Acid and its Metabolism in Brain. In *Glycerophospholipids in the Brain* (pp. 219–237).
- Fuentealba, L. C., Rompani, S. B., Parraguez, J. I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C. L., & Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161(7), 1644–1655. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.041>

- Fukushima, N., Weiner, J. a, & Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Developmental Biology*, 228(1), 6–18. <http://doi.org/10.1006/dbio.2000.9930>
- García-Marqués, J., De Carlos, J., Greer, C., & López-Mascaraque, L. (2010). Different Astroglia Permissivity Controls the Migration of Olfactory Bulb Interneuron Precursors. *Glia*, 58(2), 417–428. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1237430>.Imprinting
- Gheusi, G., & Lledo, P.-M. (2014). *Adult neurogenesis in the olfactory system shapes odor memory and perception*. *Progress in brain research* (1st ed., Vol. 208). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-63350-7.00006-1>
- Gómez-López, S., Martínez-Silva, A. V., Montiel, T., Osorio-Gómez, D., Bermudez-Rattoni, F., Massieu, L., & Escalante-Alcalde, D. (2016). Neural ablation of the PARK10 candidate Plpp3 leads to dopaminergic transmission deficits without neurodegeneration. *Scientific Reports*, 6(24028).
- Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., & Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(11), 755–769. <http://doi.org/10.1038/nrn3586>
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., & Cremer, H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 5(10), 939–945. <http://doi.org/10.1038/nn923>
- Hannun, Y. a, & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 139–150. <http://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Jacquet, B. V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J. D., Dykstra, M., ... Ghashghaei, H. T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development (Cambridge, England)*, 136(23), 4021–31. <http://doi.org/10.1242/dev.041129>
- Jara, N., Cifuentes, M., Martínez, F., Salazar, K., & Nualart, F. (2016). Cytoarchitecture, Proliferative Activity and Neuroblast Migration in the Subventricular Zone and Lateral Ventricle Extension of the Adult Guinea Pig Brain. *Stem Cells*. <http://doi.org/10.1002/stem.2430>
- Kajimoto, T., Okada, T., Yu, H., Goparaju, S. K., Jahangeer, S., & Nakamura, S. (2007). Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Biology*, 27(9), 3429–3440. <http://doi.org/10.1128/MCB.01465-06>
- Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J. Y., ... Sawamoto, K. (2010). New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67(2), 213–23.

<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.018>

- Kim, W. R., Kim, Y., Eun, B., Park, O. -h., Kim, H., Kim, K., ... Sun, W. (2007). Impaired Migration in the Rostral Migratory Stream But Spared Olfactory Function after the Elimination of Programmed Cell Death in Bax Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, 27(52), 14392–14403. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3903-07.2007>
- Kok, B. P. C., Venkatraman, G., Capatos, D., & Brindley, D. N. (2012). Unlike two peas in a pod: Lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases. *Chemical Reviews*, 112, 5121–5146. <http://doi.org/10.1021/cr200433m>
- Krishnan, V., & Nestler, E. (2012). Animal models of depression: Molecular perspectives. *Current Topics Behavioural Neuroscience*, 7(Prager 2009), 121–147. <http://doi.org/10.1007/7854>
- Kuo, C. T., Mirzadeh, Z., Soriano-Navarro, M., Rašin, M., Wang, D., Shen, J., ... Jan, Y. N. (2006). Postnatal Deletion of Numb/Numbl-like Reveals Repair and Remodeling Capacity in the Subventricular Neurogenic Niche. *Cell*, 127(6), 1253–1264. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.041>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 563–571. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>
- Lledo, P.-M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3), 179–93. <http://doi.org/10.1038/nrn1867>
- Lledo, P.-M., Merkle, F. T., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends in Neurosciences*, 31(8), 392–400. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, a. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145–1148. <http://doi.org/10.1126/science.8178174>
- Lois, C., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, a. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5251), 978–981. <http://doi.org/10.1126/science.271.5251.978>
- López-Juárez, A., Morales-Lázaro, S., Sánchez-Sánchez, R., Sunkara, M., Lomelí, H., Velasco, I., ... Escalante-Alcalde, D. (2011). Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. *Glia*, 59(January), 577–589. <http://doi.org/10.1002/glia.21126>
- Luo, J., Shook, B. A., Daniels, S. B., & Conover, J. C. (2009). Subventricular Zone-Mediated Ependyma Repair in the Adult Mammalian Brain. *J Neurosci*, 28(14), 3804–3813. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0224-08.2008>
- Manning, T. J., Rosenfeld, S. S., & Sontheimer, H. (1998). Lysophosphatidic acid stimulates

- actomyosin contraction in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 53(3), 343–352. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980801\)53:3<343::AID-JNR8>3.0.CO;2-A](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980801)53:3<343::AID-JNR8>3.0.CO;2-A)
- Matsutani, S., & Yamamoto, N. (2008). Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anatomical Science International*, 83(4), 218–227. <http://doi.org/10.1111/j.1447-073x.2007.00223.x>
- Mencarelli, C., & Martinez-Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: When a slight tilt is enough. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(2), 181–203. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1038-x>
- Merkle, F. T., Fuentealba, L. C., Sanders, T. a, Magno, L., Kessarar, N., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature Neuroscience*, 17(2), 207–14. <http://doi.org/10.1038/nn.3610>
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5836), 381–384. <http://doi.org/10.1126/science.1144914>
- Mestres, P., & Rascher, K. (1981). Supraependymal cell clusters in the rat brain. *Cell Tissue Res*, 218, 41–58.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell*, 3(3), 265–278. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>
- Mitroi, D. N., Deutschmann, A. U., Raucamp, M., Karunakaran, I., Glebov, K., Hans, M., ... Swandulla, D. (2016). Sphingosine 1-phosphate lyase ablation disrupts presynaptic architecture and function via an ubiquitin- proteasome mediated mechanism. *Nature Publishing Group*, (November), 1–15. <http://doi.org/10.1038/srep37064>
- Mitsutake, S., Yokose, U., Kato, M., Matsuoka, I., Yoo, J. M., Kim, T. J., ... Igarashi, Y. (2007). The generation and behavioral analysis of ceramide kinase-null mice, indicating a function in cerebellar Purkinje cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 519–524. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.010>
- Mullershausen, F., Craveiro, L. M., Shin, Y., Cortes-Cros, M., Bassilana, F., Osinde, M., ... Dev, K. K. (2007). Phosphorylated FTY720 promotes astrocyte migration through sphingosine-1-phosphate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 102, 1151–1161. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04629.x>
- Murase, S., & Horwitz, A. F. (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), 3568–3579. <http://doi.org/20026349>
- Ng, K., Li, J., Cheng, M., Leslie, F., Lee, A., & Zhou, Q. (2005). Dependence of Olfactory Bulb

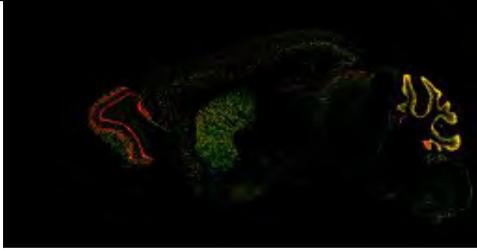
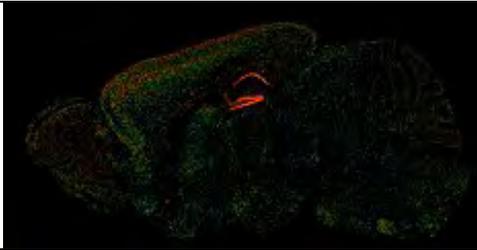
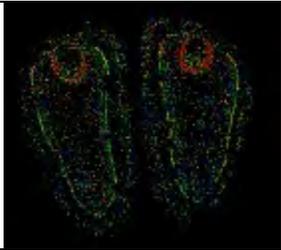
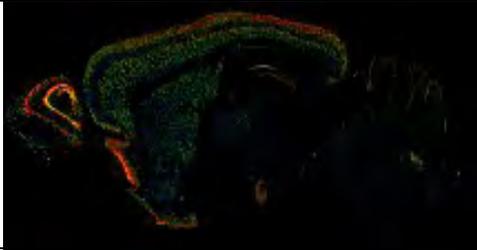
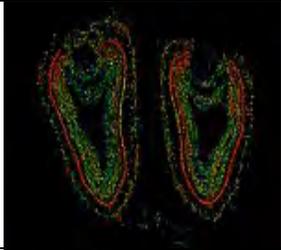
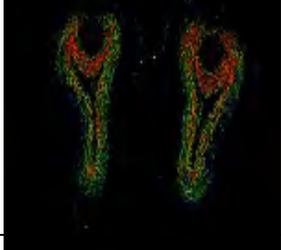
- Neurogenesis on Prokineticin 2 Signaling. *Science*, 308(5730), 1923–1927.  
<http://doi.org/10.1126/science.1112103>
- Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C., & Chédotal, A. (2004). Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(6), 1497–1506.  
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4729-03.2004>
- Park, C., Kang, D.-S., Shin, G.-H., Seo, J., Kim, H., Suh, P.-G., ... Shin, J.-H. (2015). Identification of novel phosphatidic acid-binding proteins in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 595, 108–113. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.012>
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M., Erdelyi, F., Szabo, G., & Puche, A. (2007). Quantitative Analysis of Neuronal Diversity in the Mouse Olfactory Bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 501, 825–836. <http://doi.org/10.1002/cne>
- Petit, G. H., Berkovich, E., Hickery, M., Kallunki, P., Fog, K., Fitzer-Attas, C., & Brundin, P. (2013). Rasagiline Ameliorates Olfactory Deficits in an Alpha-Synuclein Mouse Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE*, 8(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060691>
- Petreanu, L., & Alvarez-buylla, A. (2002). Maturation and Death of Adult-Born Olfactory Bulb Granule Neurons : Role of Olfaction. *The Journal of Neuroscience*, 22(14), 6106–6113.
- Ponti, G., Luzzati, F., Peretto, P., & Bonfanti, L. (2011). Neurogenesis in the Adult Rabbit: From olfactory system to cerebellum. In *Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology* (pp. 319–337).
- Puche, A. C., & Shipley, M. T. (2001). Radial Glia Development in the Mouse Olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 12(August 2000), 1–12.
- Saghatelian, A., de Chevigny, A., Schachner, M., & Lledo, P.-M. (2004). Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(4), 347–356. <http://doi.org/10.1038/nn1211>
- 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. *Developmental Dynamics*, 241(April), 953–964. <http://doi.org/10.1002/dvdy.23779>
- Schulze, C., Smales, C., Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1997). Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 68, 991–1000. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68030991.x>
- Sequerra, E. B. (2014). Subventricular zone progenitors in time and space: generating neuronal diversity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(December), 434.  
<http://doi.org/10.3389/fncel.2014.00434>
- Spassky, N., Merkle, F., Flames, N., Tramonitn, A., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla,

- A. (2005). Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *Journal of Neuroscience*, 25(1), 10–18. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005>
- Spiegel, S., Cuvillier, O., Fuior, E., & Milstien, S. (1997). Sphingosine-1-Phosphate: member of a new class of lipid second messengers. In *Sphingolipid-mediated signal transduction* (pp. 121–135).
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(May), 397–407. <http://doi.org/10.1038/nrm1103>
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2011). The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 403–415. <http://doi.org/10.1038/nri2974>
- Tang, X., Benesch, M. G. K., & Brindley, D. N. (2015). Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *Journal of Lipid Research*, 56, 2048–2060. <http://doi.org/10.1194/jlr.R058362>
- Taylor, M. D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., ... Gilbertson, R. J. (2005). Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell*, 8(4), 323–335. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.001>
- Watanabe, H., Yamazaki, M., Miyazaki, H., Arikawa, C., Itoh, K., Sasaki, T., ... Kanaho, Y. (2004). Phospholipase D2 functions as a downstream signaling molecule of MAP kinase pathway in L1-stimulated neurite outgrowth of cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), 142–51. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02308.x>
- Watanabe, H., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Miyazaki, H., Sasaki, T., Maehama, T., ... Kanaho, Y. (2004). Essential role for phospholipase D2 activation downstream of ERK MAP kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth from PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37870–37877. <http://doi.org/10.1074/jbc.M402610200>
- Yan, H., Lu, D., & Rivkees, S. a. (2003). Lysophosphatidic acid regulates the proliferation and migration of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia*, 44(1), 26–36. <http://doi.org/10.1002/glia.10265>
- Young, K. M., Fogarty, M., Kessar, N., & Richardson, W. D. (2007). Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(31), 8286–8296. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0476-07.2007>
- Yung, Y. C., Mutoh, T., Lin, M.-E., Noguchi, K., Rivera, R. R., Choi, J. W., ... Chun, J. (2011). Lysophosphatidic Acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Science Translational Medicine*, 3(99), 99ra87. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002095>

- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H., & Chun, J. (2015). Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron*, 85(4), 669–682.  
<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.009>
- Zeng, W., & Zhang, Z. (2007). Lysophosphatidic acid induces astrocyte proliferation in hippocampus slices partially through activating extracellular signal-regulated kinases. *Research on Chemical Intermediates*, 33(6), 567–577.  
<http://doi.org/10.1163/156856707782565859>

## Información anexa.-

Tabla anexa 1.- Transcritos de genes cuya expresión es importante en la integración de neuronas al bulbo olfatorio (hibridaciones in situ del Allen Brain Atlas: <http://www.brain-map.org/>).

Transcrito	Imagen sagital	Imagen coronal	Su participación se observó en:
Reelina			(Hack et al., 2002)
Tenascina R			(Saghatelian et al., 2004)
Netrina 1	No detectada	No detectada	(Murase & Horwitz, 2002)
Integrina $\alpha 5$			(Murase & Horwitz, 2002)
Lrp8			
Slit1			(Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004)

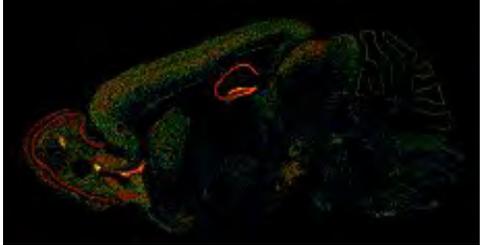
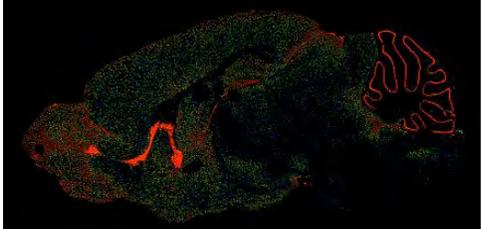
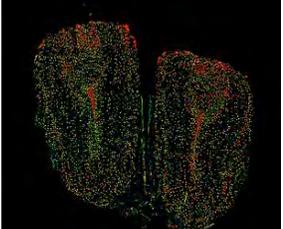
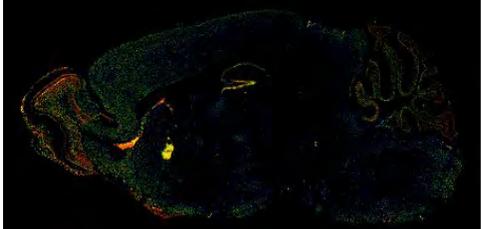
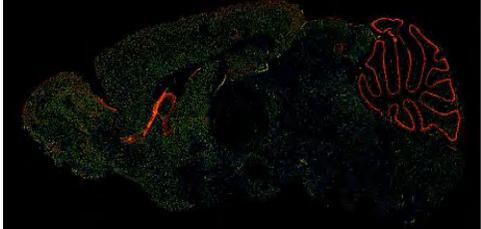
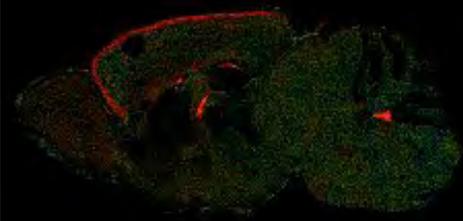
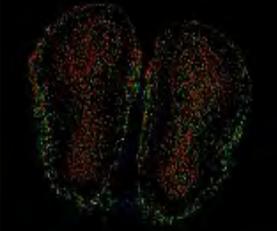
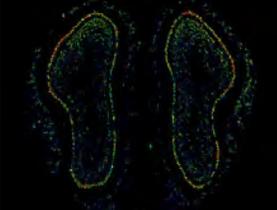
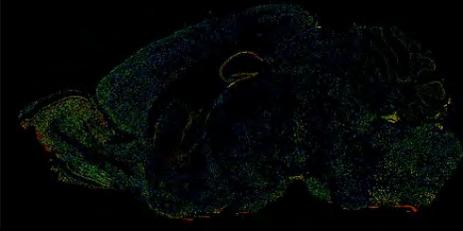
Robo2			(Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004)
-------	---	--	----------------------------------

Tabla anexa 2.- Transcritos de genes relacionados con síntesis y degradación de lípidos fosfatados, así como algunos receptores (Plpp3: Fosfatasa de fosfolípidos, Sphk2: cinasa de esfingosina 2, S1P<sub>1</sub>: Receptor 1 de esfingosina fosfato, Sgpp1: fosfatasa de esfingosina fosfato-1, Sgpl1: Liasa de esfingosina fosfato-1, LPA<sub>2</sub>: Receptor 2 de ácido lisofosfatídico, CerK: cinasa de ceramida).

Transcrito	Imagen sagital	Imagen coronal
Plpp3		
Sphk2		
S1P <sub>1</sub>		
Sgpl1		

LPAr2			
Autotaxin			
Lpaat3			
Lcat			
Pld2			
Cerk			

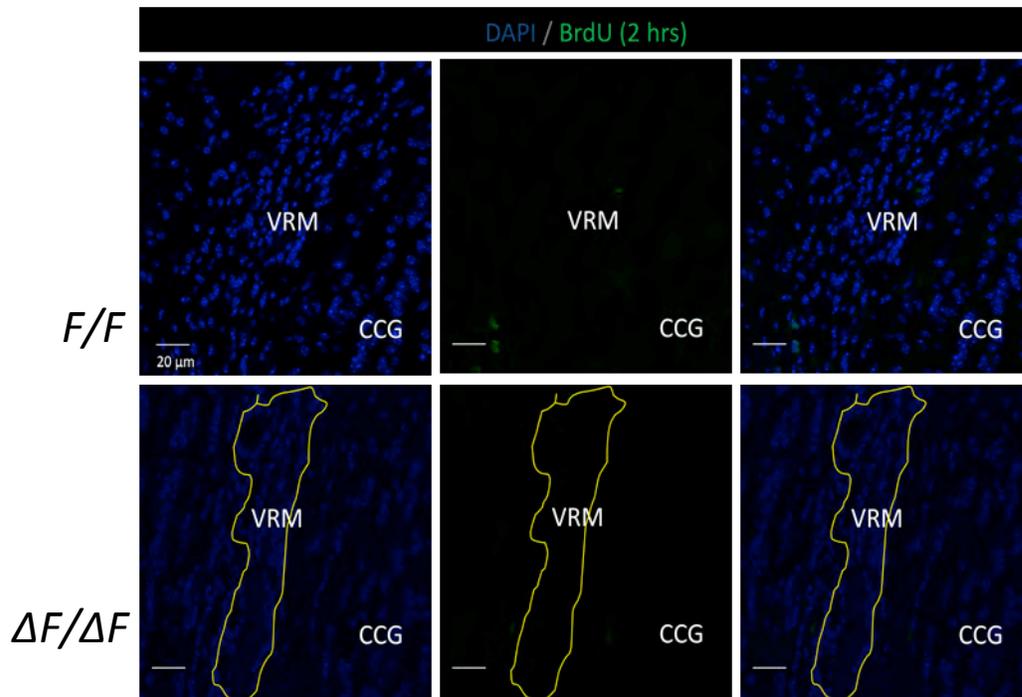


Figura anexa 1.- Ratones administrados con BrdU y sacrificados 2 horas después para observar la marca positiva al análogo de la timidina (verde) en el ventrículo (dentro del perímetro amarillo) adyacente a la VRM. Aumento a 60x.