



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

“El papel de la fosfatasa de fosfolípidos 3 en el desarrollo del cerebro medio y posterior.”

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Arlen Ramírez Corona

Directora De Tesis:

Dra. Diana María Escalante Alcalde

Ciudad Universitaria, CDMX, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular- UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Diana María Escalante Alcalde. El proyecto fue realizado con donativos de DGAPA-PAPIIT IN207015 y CONACYT CB-250613.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Diana María Escalante Alcalde por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo desde mi tercera rotación en la carrera y por haberme dirigido y apoyado durante la duración de este proyecto de tesis.

Agradezco también a la Dra. Ana Valeria Silva Martínez por su apoyo técnico y académico durante la realización de este proyecto.

Se les agradece de igual manera a las siguientes unidades del Instituto de Fisiología Celular:

- A la Unidad de Imagenología, a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés y al Biol. Gerardo Rodrigo Perera Murcia
- A la Unidad de Biología Molecular
- A la Unidad del Bioterio
- A la Unidad de Cómputo

Finalmente agradezco al M. en I. Gersaín Barrón Velázquez, adscrito a la Facultad de Ingeniería de la UNAM, por la creación de uno de los programas utilizado en el análisis de los datos obtenidos en este proyecto.

Contenido

1. Resumen.....	5
2. Abreviaturas.....	6
3. Introducción.....	7
3.1 Desarrollo del sistema nervioso central.....	7
3.2 Organizador de la frontera entre el mesencéfalo y romboencéfalo.....	8
3.3 Mutaciones nulas de los genes del MHB.....	13
3.4 Relaciones reguladoras entre los genes del MHB.....	16
3.5 El ácido lisofosfatídico y su papel en el desarrollo del MHB.....	18
3.6 Las fosfatasa de fosfolípidos (PLPPs).....	23
4. Justificación.....	27
5. Hipótesis.....	27
6. Objetivos.....	27
6.1 Objetivo General.....	27
6.2 Objetivos Particulares.....	27
7. Materiales y Métodos.....	27
7.1 Ratones.....	27
7.2 Extracción de embriones.....	28
7.3 Genotipificación de embriones.....	28
7.4 Fijación y almacenamiento de embriones para hibridación <i>in situ</i>	30
7.5 Transformación de bacterias y aislamiento de plásmido.....	30
7.6 Linearización y síntesis de sondas para hibridación <i>in situ</i>	30
7.7 Subclonación de fragmento de <i>Wnt1</i> en pBluescript.....	31
7.8 Hibridación <i>in situ</i>	33
7.9 Análisis de las imágenes de las hibridaciones.....	34
7.10 Inmunofluorescencia de embrión completo.....	35
7.11 Cuantificación de células fosfo Histona H3 positivas (PHH3).....	36
8. Resultados.....	37
8.1 La ausencia de PLPP3 disminuye la expresión de <i>Otx2</i>	37
8.2 La ausencia de PLPP3 disminuye la expresión de <i>Pax2</i> en el prosencéfalo y en el MHB..	39
8.3 La ausencia de PLPP3 produce un aumento en la expresión de <i>Wnt1</i> en el MHB	42
8.4 La ausencia de PLPP3 aumenta la expresión de <i>Fgf8</i> en el ANR y en el MHB.....	44
8.5 La ausencia de PLPP3 no afecta lo niveles de expresión de <i>En2</i>	47
8.6 Análisis de proliferación.....	50
8.7 Análisis de muerte celular.....	52
9. Discusión.....	53
10. Conclusiones.....	58
11. Perspectivas.....	59
12. Referencias.....	61

1. Resumen

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso secuencial donde primero se establece la placa neural a partir del ectodermo en el dominio dorsal del embrión. Posteriormente los bordes laterales se engrosan, se doblan y finalmente se fusionan en la línea media para dar origen al tubo neural. Por último, el tubo neural se diversifica al segmentarse en vesículas las cuales dan origen al prosencéfalo, al mesencéfalo y al romboencéfalo. Es en la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo que existe un tejido con la capacidad de organizar el desarrollo de esta región. Este tejido es conocido como el organizador del cerebro medio y posterior (MHB). Los factores transcripcionales como OTX2, GBX2, PAX2, y EN2, así como los morfógenos FGF8 y WNT1 son los elementos que le confieren al MHB sus capacidades inductivas y morfogenéticas.

En esta región se observa la expresión de receptores para el ácido lisofosfatídico (LPA) y de la enzima Autotaxina (ATX), la cual sintetiza al LPA. La mutación nula para *Atx* ocasiona defectos en el cierre del tubo neural y la modificación de los niveles y dominios de expresión de los genes del MHB por lo que se deduce que el lípido bioactivo LPA participa en el establecimiento y desarrollo del MHB.

Las fosfatasas de fosfolípidos (PLPPs) son enzimas que desfosforilan a lípidos bioactivos como el LPA, convirtiéndolos a sus formas inactivas y a su vez modulando las vías de señalización que estos fosfolípidos activan. De las tres isoformas del PLPPs, la PLPP3 es única que posee un patrón de expresión dinámico durante el desarrollo embrionario y su mutación nula es letal.

Dada la coincidencia en los patrones de expresión de *Plpp3*, *Atx* y receptores para el LPA en el MHB, así como la similitud de los fenotipos entre los embriones mutantes para *Atx* y *Plpp3*, en este proyecto se evaluó el papel que tiene la PLPP3 en el establecimiento del MHB y en el desarrollo del cerebro medio y posterior.

Encontramos que los niveles de expresión de los genes *Otx2* y *Pax2* disminuyeron en ausencia de la PLPP3, mientras que en el caso de *Wnt1* y *Fgf8* la ausencia de la enzima ocasiona un aumento en la región del MHB. Estas alteraciones no fueron similares a las encontradas en mutantes de *Atx* por lo que se sugiere que la PLPP3 tiene funciones adicionales a la desensibilización de receptores de LPA. También se observó que la morfología del neuroepitelio en la región adyacente al MHB en embriones carentes de la PLPP3 presentó surcos estereotípicos que no se observaron en embriones control. Estos surcos no parecen ser ocasionados por modificaciones en los índices de muerte celular o proliferación focalizadas en la región del MHB. Una posible explicación para su aparición es un defecto en la estabilidad del neuroepitelio.

2. Abreviaturas

1s	Etapa de 1 somita
ANR	Cresta Neural Anterior (<i>Anterior Neural Ridge</i>)
<i>Atx</i>	Gen de Autotaxina
Cas-3	Caspasa 3
E8.5	Día embrionario 8.5
<i>En2</i>	Gen de <i>Engrailed 2</i>
<i>Fgf8</i>	Gen del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 8 (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
<i>Gbx2</i>	Gen de <i>Gastrulation Brain Homeobox 2</i>
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPA ₁	Receptor 1 para LPA
<i>Lpar1</i>	Gen del Receptor 1 para LPA
MHB	Frontera entre el Mesencéfalo y el Romboencéfalo (<i>Midbrain Hindbrain Boundary</i>)
<i>Otx2</i>	Gen de <i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
<i>Pax2</i>	Gen de <i>Paired Box 2</i>
PHH3	Fosfo Histona H3
PLPP3	Fosfatasa de fosfolípidos 3
r1	Rombómero 1
S1P	Esfingosina 1 fosfato
<i>Wnt1</i>	Ortólogo del gen <i>wingless</i> en <i>Drosophila</i>

3. Introducción

3.1 Desarrollo del sistema nervioso central

El desarrollo embrionario en mamíferos puede ser visto como un proceso secuencial donde primero se establece un plano general del cuerpo o de la estructura en formación y posteriormente los diversos componentes que conforman a este plano se diversifican y especializan de acuerdo con su programa de destino celular (Joyner y Martin, 1987). Un ejemplo de este proceso puede observarse en el desarrollo embrionario del sistema nervioso central.

El desarrollo del sistema nervioso central en el ratón consiste en tres etapas: la inducción de la placa neural, el cierre del tubo neural, y la segmentación y regionalización del tubo neural.

Después de la gastrulación se lleva a cabo la inducción de la placa neural, una estructura epitelial embrionaria derivada del neuroectodermo, tejido ubicado en la región dorsal del embrión. Al centro de la placa neural se forma un surco en forma de 'U' llamado surco neural, el cual divide a la placa neural en el futuro lado derecho e izquierdo del embrión. En etapas posteriores los bordes de la placa neural, ubicados en ambos lados del surco, se engrosan y elevan para formar los pliegues neurales. Los pliegues neurales posteriormente se doblan hacia la línea media de la placa neural y se fusionan para formar al tubo neural (Gilbert, 2014).

El cierre del tubo neural o neurulación en ratón comienza en el día embrionario 8.5 (E8.5) alrededor de la etapa de seis a siete somitas (6s-7s), cuando aparecen de forma secuencial tres puntos de cierre ubicados en la región anterior de los pliegues neurales. Estos puntos inician y propagan la neurulación en toda la extensión del embrión (Copp, 2005). El cierre del tubo neural inicia en el punto de cierre 1, ubicado en la frontera entre el romboencéfalo y la región cervical. A continuación, en la etapa de 12s a 15s, aparecen otros dos puntos de cierre, el 2 se ubica en la frontera entre el prosencéfalo y el mesencéfalo y el 3 aparece en la región más rostral del romboencéfalo. La propagación bidireccional de la fusión de los pliegues neurales a partir de los tres puntos de cierre es lo que finalmente da origen al tubo neural.

En la última etapa, la región cefálica del tubo neural se segmenta en tres neurómeros o vesículas primarias: el prosencéfalo en la parte anterior, el mesencéfalo o cerebro medio y el romboencéfalo o cerebro posterior, el cual delimita con la médula espinal. El romboencéfalo a su vez se divide en ocho vesículas más pequeñas llamadas rombómeros (r1-r8). Más adelante en el desarrollo, alrededor de E10.5, se forman las cinco vesículas secundarias. El prosencéfalo se divide en el telencéfalo en la parte anterior y el diencefalo en la parte posterior, el mesencéfalo persiste como la misma estructura y el romboencéfalo se

divide en el metencéfalo en la parte anterior (r1), el cual dará origen al cerebelo y al puente en su dominio ventral, y en el mielencéfalo en la parte posterior (Gilbert, 2014).

3.2 Organizador de la frontera entre el mesencéfalo y romboencéfalo

Durante el desarrollo y la regionalización del tubo neural existen moléculas que son capaces de modificar y especificar el destino celular, el cual se encuentra determinado por elementos genéticos. Estas moléculas son secretadas dentro de las fronteras de regiones en el embrión conocidas como organizadores, los cuales dictan el establecimiento de patrones, identidades celulares y el modelado de nuevas estructuras. Las señales de los organizadores actúan sobre tejidos adyacentes mediante señales verticales o sobre células adyacentes, ubicadas dentro del mismo tejido que el organizador, mediante señales planares. El modelado de la placa neural rostral depende de estas señales planares y verticales para poder llevarse a cabo (Simeone, 2000).

En el neuroepitelio de la región del istmo, constricción ubicada en la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo (MHB por sus siglas en inglés), existe un anillo de tejido que posee propiedades polarizantes y morfogenéticas al ser capaz de organizar el establecimiento de patrones e identidades celulares en el tubo neural, así como inducir y estabilizar el desarrollo del mesencéfalo y del metencéfalo (Joyner, 1996; Simeone, 2000).

La capacidad que tiene el MHB de organizar el desarrollo del tubo neural anterior fue demostrada mediante la inversión rostro-caudal de injertos que contenían esta región del tubo neural en embriones de pollo (Marin y Puelles, 1994). En los experimentos donde se realizó la inversión del tejido que únicamente incluía al futuro mesencéfalo se produjo un mesencéfalo con polaridad anteroposterior normal ya que el tejido del injerto se reorientó de acuerdo con su nuevo contexto para corresponder con la dirección anteroposterior en la cual se insertó. Por otro lado, cuando se realizó la inversión del futuro mesencéfalo junto con el tejido istmocerebelar adyacente, se modificó la citoarquitectura del mesencéfalo. El extremo originalmente rostral del injerto formó estructuras caudales que limitaban con el romboencéfalo, desarrollándose de acuerdo con su nueva orientación. El extremo originalmente caudal que contenía al MHB, ahora ubicado en la región anterior del mesencéfalo, también presentó estructuras y núcleos caudales, pero con una orientación invertida con respecto al polaridad global del tubo neural. El tejido mesencefálico adyacente al MHB mantuvo su destino y orientación, aun cuando es reorientado, resultando en un mesencéfalo con configuración doble caudal. El injerto indujo también un complejo istmo-cerebelar ectópico en la región rostral del mesencéfalo del hospedero (Figura 1).

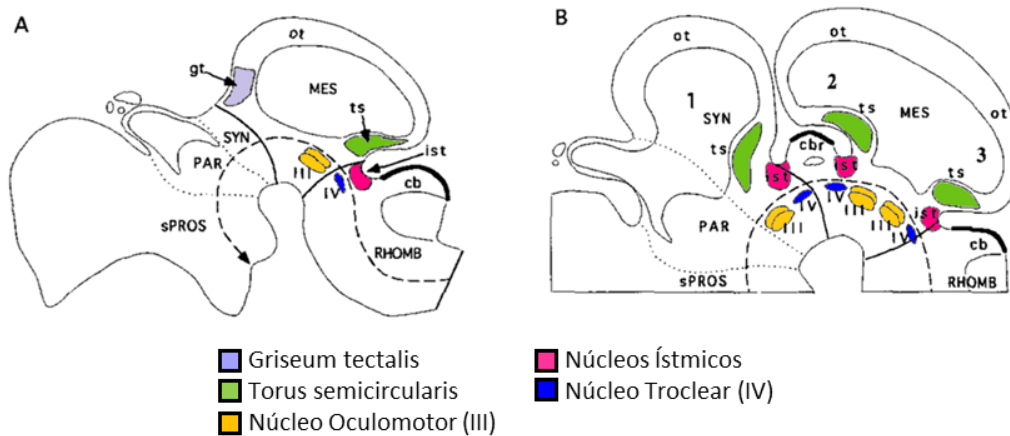


Figura 1. Experimentos de inversión del mesencéfalo. (A) Esquema de un tubo neural de pollo con 10 días de incubación mostrando las estructuras mesencefálicas y del istmo normales. El extremo rostral se muestra a la izquierda y el caudal a la derecha. La línea longitudinal discontinua marca la delimitación entre la placa alar y la basal en el eje rostrocaudal. Las líneas punteadas transversales delimitan al sinencéfalo (preteetum y región diencefálica posterior) y al parencéfalo (región talámica-diencefálica). Las líneas transversales continuas muestran los límites citoarquitectónicos del mesencéfalo. (B) Esquema de un tubo neural resultante de la inversión del mesencéfalo que contiene al tejido del istmo. El extremo rostral se muestra a la derecha y el caudal a la izquierda. Las líneas discontinuas y punteadas muestran los mismos dominios que en A. Las líneas continuas muestran el extremo rostral y caudal del neuroepitelio invertido. Existen tres estructuras istmommesencefálicas: (1) en el sinencéfalo no invertido cuyo destino fue modificado, (2) en el extremo rostral del tejido invertido y (3) en el extremo caudal del tejido invertido. Las estructuras 2 y 3 son imágenes especulares y las estructuras 1 y 2 se encuentran orientadas con referencia al cerebelo ectópico. cb; cerebelo. gt; griseum tectalis. ist; istmo. MES; mesencéfalo. ot; tectum óptico. PAR; parencéfalo. sPROS; prosencefalo. SYN; sinencéfalo. ts; torus semicircularis. RHOMB; romboencéfalo. III; núcleo oculomotor. IV; núcleo troclear. Tomado y modificado de Marin y Puelles, 1994.

Las propiedades inductivas que posee el organizador se deben a que en la región del MHB se expresa un conjunto de genes específicos, como factores transcripcionales y moléculas morfogenéticas, que son capaces de influenciar el destino celular del tejido ubicado a su alrededor. Estos genes son *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*, *Wnt1*, *Fgf8*, *En1* y *En2* (Figura 2).

Otx2* y *Gbx2

La primera regionalización de la placa neural en la porción anterior y posterior se lleva a cabo después de la gastrulación, alrededor de E7.5, en embriones de ratón. Esta regionalización se lleva a cabo tras la inducción de los factores transcripcionales *Orthodenticle Homeobox 2* (*Otx2*) y *Gastrulation Brain Homeobox 2* (*Gbx2*), genes que pertenecen a la familia de genes homeobox, los cuales especifican la identidad de segmentos corporales en el embrión (Simeone, 2000; Joyner, 2002). Es en la frontera entre los dominios de expresión de *Otx2* y *Gbx2* que se especifica la ubicación del futuro organizador del MHB en el neuroepitelio (Simeone, 2000).

Otx2 se expresa desde el prosencéfalo en la región anterior del tubo neural y tiene un límite caudal bien marcado a la altura de la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo (Simeone, 1992). Por otro lado, *Gbx2* abarca la región desde el límite rostral del romboencéfalo, donde termina la expresión de *Otx2*, hasta la región caudal del embrión. En E9.5 el dominio de *Gbx2* se retira de la región caudal del embrión y se restringe únicamente al metencéfalo (Joyner, 2002).

Pax2

El segundo gen en expresarse de forma diferencial en la región del MHB es el gen *Paired Box 2 (Pax2)* (Joyner 2002). *Pax2* codifica a un factor transcripcional con dominios pareados de unión al DNA, el cual pertenece a una familia de genes homólogos de los genes de segmentación *paired* en *Drosophila*. Los genes *paired* a su vez están involucrados en establecer la expresión de otros genes de polaridad de segmentos como *engrailed* y *wingless* (Joyner, 1996).

En el ratón existen 8 genes *Pax (Pax1 a Pax8)* y éstos tienen un patrón de expresión dinámico durante el desarrollo embrionario ya que existe una regulación espaciotemporal sobre ellos (Asano y Gruss, 1992). *Pax2* inicia su expresión desde E7.75, antes de la condensación de la primera somita, en la porción anterior del embrión. En la etapa de 1s aparece un dominio de expresión que abarca toda la región del MHB, la cual incluye al mesencéfalo caudal y al metencéfalo anterior (Rowitch y McMahon, 1995). En la etapa de 10s el dominio de *Pax2* presenta su límite anterior en el mesencéfalo, sobrepasando al dominio de expresión de *Wnt1* y en la región posterior su dominio supera a la frontera entre los dominios de *Otx2* y *Gbx2*, llegando hasta una porción de células caudales al límite de expresión de *Otx2* en el metencéfalo (Wurst and Bally-Cuif, 2001). En etapas posteriores *Pax2* también muestra expresión en la parte más rostral del prosencéfalo, en la vesícula óptica, la vesícula ótica y en el ducto mesonéfrico ubicado en la porción caudal del embrión (Dressler *et al.*, 1990; Nornes *et al.*, 1990). En E9.5 la expresión de *Pax2* se hace más restringida en la región del MHB y forma un anillo que abarca únicamente la frontera entre el mesencéfalo y romboencéfalo (Rowitch y McMahon, 1995).

Además de los factores transcripcionales, existen dos genes que codifican para proteínas secretadas en el organizador que activan distintas vías de señalización y participan en la morfogénesis de la zona. Estos genes son *Wnt1* y *Fgf8*.

Wnt1

Wnt1 es un ortólogo del gen *wingless (wg)* en *Drosophila*, gen involucrado en el desarrollo y la polaridad de segmentos al regular la expresión génica (Joyner, 1996). Las proteínas WNT están involucradas en

procesos como la proliferación, la especificación del destino celular y la diferenciación mediante la activación de las vías de señalización dependientes de los receptores Frizzled (Logan y Nusse, 2004).

En el ratón, la expresión de *Wnt1* inicia en E8 cuando se forma la primera somita. Su dominio se presenta como dos triángulos que se extienden de los bordes de la placa neural hacia la línea media. El límite anterior del dominio se encuentra en la región media del mesencéfalo y el límite caudal marca el inicio del futuro romboencéfalo (Wilkinson *et al.*, 1987; McMahon y Bradley, 1990). En la etapa de 3s aparece otro dominio de expresión en los bordes laterales de los pliegues neurales del mielencéfalo, el cual forma la línea media dorsal al fusionarse los pliegues neurales (McMahon *et al.*, 1992). Cuando el embrión tiene alrededor de 6s, el dominio de expresión anterior de *Wnt1* se restringe y se observa únicamente en los bordes laterales de los pliegues neurales del mesencéfalo y en su región más posterior, en la frontera caudal del dominio de expresión de *Otx2* (Wilkinson *et al.*, 1987; McMahon y Bradley, 1990). Por otra parte, el dominio dorsal de *Wnt1* se extiende como una línea continua desde los bordes laterales del mesencéfalo y recorre todo el tubo neural conforme éste se cierra hacia la región caudal del embrión. La continuidad de la línea se interrumpe en el r1 el cual corresponde al metencéfalo, y en ninguna etapa del desarrollo se observa la expresión de *Wnt1* en esta zona (Wilkinson *et al.*, 1987; McMahon y Bradley, 1990). En E9.5 el dominio de expresión de *Wnt1* en el MHB está conformado por un aro que envuelve las paredes internas de todo el tubo neural (Bally-Cuif *et al.*, 1992; McMahon *et al.*, 1992).

El dominio de expresión de *Wnt1* en el MHB marca la subdivisión entre el mesencéfalo y el romboencéfalo antes que el surco del istmo aparezca entre ellos. Además, en la etapa de 1s a 14s *Wnt1* es el único gen de la familia *Wnt* que se expresa en el mesencéfalo y su expresión en esta zona persiste hasta alrededor de E15 (Bally-Cuif *et al.*, 1992).

Fgf8

Fgf8 pertenece a la familia de Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs por sus siglas en inglés), una familia de proteínas secretadas que promueven la diferenciación y proliferación celular. Existen 22 genes que conforman a la familia de *Fgfs* en mamíferos, de los cuales 18 codifican para proteínas secretadas que actúan a través de la señalización de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs), los cuales activan una vía intracelular dependiente de *Ras* (Ornitz e Itoh, 2015). Todos los *Fgfs* se expresan durante el desarrollo embrionario en regiones del embrión involucradas en el crecimiento 'distal' y en el modelado de tejidos, como la cresta ectodérmica apical, el primordio de las extremidades y de la cola, el surco primitivo, el ectodermo superficial del primordio de la cara y en el MHB (Crossley y Martin, 1995).

Durante el desarrollo embrionario la expresión de *Fgf8* se observa primero en el ectodermo y endodermo visceral en la etapa de E5.75 a E6.25, antes de la formación del surco primitivo. En E7.5 se expresa en el componente epitelial del surco primitivo y en el ectodermo que lo rodea. En la placa neural en desarrollo de E8 a E8.5 *Fgf8* tiene dos dominios de expresión los cuales aparecen alrededor de la etapa de 3s. Un dominio se encuentra en el extremo rostral del prosencéfalo y el otro en el MHB, co-localizando con el dominio de *Gbx2* en la porción anterior del metencéfalo. En E8 también hay expresión de *Fgf8* en la región faríngea, de donde surgen los arcos branquiales. De E9 a E9.5 el dominio en el organizador del MHB se restringe a una banda que rodea el techo y las paredes laterales de la constricción del istmo. La expresión de *Fgf8* en el organizador del MHB persiste hasta E12.5 (Crossley y Martin, 1995).

La banda de *Fgf8* se expresa en un dominio inmediatamente caudal al dominio de expresión de *Wnt1* lo que ubica a estas dos proteínas en dominios separados dentro del MHB, uno en el mesencéfalo caudal y el otro en el romboencéfalo rostral (Crossley y Martin, 1995).

En el MHB *Fgf8* es el gen responsable de producir las cualidades polarizantes y morfogenéticas del organizador. En experimentos donde se implantaron perlas embebidas en FGF8 en el tubo neural de embriones de pollo se descubrió que esta proteína por si sola tiene la capacidad de inducir el desarrollo de un mesencéfalo y tejido cerebelar ectópicos en el mesencéfalo y prosencéfalo caudal. El FGF8 de las perlas también indujo la expresión ectópica de *Wnt1*, *En2*, *Gbx2* y *Fgf8* en la vecindad de las perlas e inhibió la expresión de *Otx2* (Crossley *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 1999). El patrón de expresión y represión de los distintos genes del organizador que se forma alrededor de las perlas parecería estar produciendo un segundo MHB inducido por la presencia de FGF8.

En2

El último gen del MBH en expresarse es *Engrailed 2 (En2)*. *En2* codifica un factor transcripcional de homeodominio que es homólogo del gen *engrailed* en *Drosophila*. Como es el caso de los genes *Wnt1* y *Pax2*, *En2* está implicado en la segmentación corporal (Joyner y Martin, 1987).

La expresión de *En2* inicia en la etapa de 5s en un dominio más extendido que el de *Pax2* y abarca al mesencéfalo caudal y al metencéfalo, las regiones que darán origen al organizador del MHB y al cerebelo (Davis *et al.*, 1988; Bally-Cuif *et al.*, 1992). En el dominio de *En2* el gen se expresa en un gradiente que disminuye al alejarse del organizador del MHB en dirección rostral y caudal. La región con la mayor intensidad de expresión de *En2* dentro del gradiente se encuentra en la frontera entre el mesencéfalo y el

romboencéfalo (Bally-Cuif *et al.*, 1992; Joyner, 2002). De E8.5 a E17.5 la única región del embrión en donde se observa la expresión de *En2* es en la región del MHB (Davis *et al.*, 1988).

En los experimentos donde se realizó la inversión de los injertos de tubo neural, la reorientación del mesencéfalo y la reorganización de su citoarquitectura es precedida por una reorientación del gradiente de *En2* (Marin y Puelles, 1994). Esto demuestra que *En2* se encuentra regulando la especificación del mesencéfalo y metencéfalo.

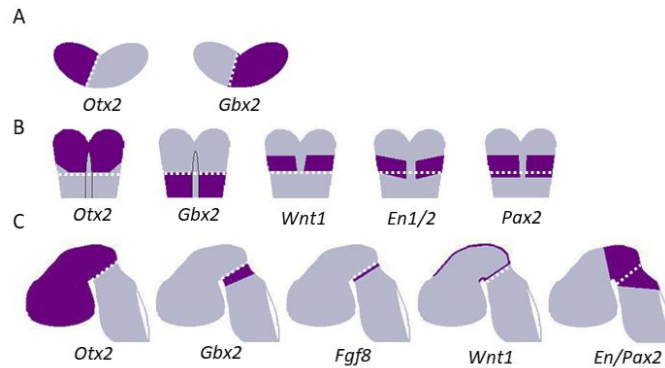


Figura 2. Dominios de los genes del organizador del istmo en distintas etapas del desarrollo. El esquema muestra los patrones de expresión de los genes en morado. Se muestra la expresión en E7.5 (A), E8.5 (B) y E9.5 (C). La línea discontinua blanca marca la región de la frontera entre el mesencéfalo y romboencéfalo. Tomado de Joyner, 2002.

3.3 Mutaciones nulas de los genes del MHB

Se han realizado numerosos trabajos investigando el papel que tienen los distintos genes que se expresan en la región del MHB en el establecimiento y mantenimiento del organizador.

La mutación nula de *Otx2* resulta en letalidad embrionaria al producir la delección total del prosencéfalo y del mesencéfalo, ya que no se lleva a cabo la inducción de la placa neural anterior después de la gastrulación. Tampoco se observa expresión de *En2* en el romboencéfalo anterior, lo que indica la posible pérdida de este tejido y defectos en la especificación del tejido anterior al r3 en la ausencia de *Otx2* (Acampora *et al.*, 1995). Otros defectos observados en estos embriones deficientes para *Otx2* son la reducción en el tamaño del embrión y retraso en el desarrollo, el corazón y las somitas presentan un tamaño reducido y éstas últimas se presentan en menor número, posicionadas de manera desorganizada y con una morfología irregular.

Por otro lado, cuando la frontera del dominio de *Otx2* se recorrió caudalmente mediante su expresión ectópica hasta abarcar al metencéfalo, se observó la inhibición de *Gbx2* en esta región, así como un recorrimiento caudal del dominio de *Pax2* y *Wnt1* y un dominio de expresión ectópico de *Wnt1* y *Fgf8* en

la pared dorsal del metencéfalo. Esto tuvo como consecuencia el reposicionamiento del organizador del MHB en el romboencéfalo, en la frontera entre el r1 y el r2 (Brocoli *et al.*, 1999).

La mutación nula de *Gbx2* resulta en un fenotipo que pareciera complementario a la mutación de *Otx2*. Hay una expansión caudal del mesencéfalo y se pierden el cerebelo y las estructuras que se desarrollan a partir del r1 y r2 (Wassarman *et al.*, 1997). En la etapa de 4s a 6s el límite caudal del dominio de expresión de *Otx2* se recorre hasta la frontera entre el r3 y r4. El dominio de expresión de *Fgf8* se expandió y también se recorrió caudalmente, abarcando del r2 al r4. Por último, el dominio de *Wnt1* en el MHB mostró una ligera expansión y se recorrió en dirección caudal, mientras que el dominio de *Wnt1* en los bordes laterales de los pliegues neurales del romboencéfalo fue continuo, ya que no se observó la región *Wnt1* negativa que corresponde al metencéfalo. Además, el dominio de expresión de *Fgf8* coincide con el de *Wnt1* y el de *Otx2* (Wassarman *et al.*, 1997; Millet *et al.*, 1999).

En un experimento inverso, si se expresa *Gbx2* en el mesencéfalo posterior de manera ectópica se recorre el borde caudal del dominio de *Otx2* en dirección anterior y se reposiciona en el mesencéfalo rostral. Los dominios de *Wnt1* y *Fgf8* en la etapa de 6s a 10s también se recorren anteriormente (Millet *et al.*, 1999).

Embriones que presentan una mutación nula para *Fgf8* mueren en etapas tempranas por defectos en la gastrulación. Para estudiar el efecto que tiene la ausencia de *Fgf8* únicamente en el organizador y evitar la letalidad embrionaria se utilizó un alelo de *Fgf8* con inactivación condicional mediada por la recombinasa Cre, la cual se expresó en toda la región que abarca al mesencéfalo y al metencéfalo (Chi *et al.*, 2003). Embriones portadores de esta delección condicional de *Fgf8* presentan un aumento en la muerte celular ectópica en el MHB. La muerte celular aumenta en la etapa de 7s a 9s y presenta su mayor incremento en la etapa de 11s a 13s. Para la etapa de 19s a 20s el incremento en la muerte celular causa la pérdida total del mesencéfalo. Para la etapa de 30s, se pierde el tejido cerebelar. La ausencia de *Fgf8* en la etapa de 7s también causa la pérdida de la expresión de *Wnt1* y de *Gbx2* en la región del organizador. Esto indica que *Fgf8* está implicado en el desarrollo del mesencéfalo y el romboencéfalo anterior y en el mantenimiento de *Wnt1* y *Gbx2*.

Por otro lado, si se promueve la expresión ectópica de *Fgf8* en el mesencéfalo bajo los elementos regulatorios de *Wnt1* se produce la hiperplasia del mesencéfalo y el diencefalo caudal. Este fenotipo es ocasionado por un aumento en precursores neurales, un aumento en la proliferación y la inhibición de la diferenciación. Esta expresión ectópica de *Fgf8* también induce la expresión de *En2* en el dominio dorsal del mesencéfalo y un dominio de expresión ectópico en el mielencéfalo rostral (Lee *et al.*, 1997). Este

resultado revela que *Fgf8* está implicado en el establecimiento del gradiente normal de *En2* en el mesencéfalo, en el metencéfalo y en la región del MHB.

Los ratones mutantes para los genes *Pax2*, *Wnt1* y *En2* presentan un fenotipo similar donde el mesencéfalo y el metencéfalo se ven afectados.

La mutación nula de *Pax2* ocasiona un aumento en los niveles de muerte celular en mesencéfalo y romboencéfalo anterior en la etapa de 12s, lo que resulta en la pérdida del mesencéfalo y del cerebelo en etapas posteriores (Favor *et al.*, 1996; Bouchard *et al.*, 2005).

En los embriones *Pax2*^{-/-} también se afecta la transcripción de genes característicos del MHB. La expresión del gen de *Fgf8*, la cual se induce alrededor de la etapa de 3s, no se inicia nunca en el romboencéfalo anterior en ausencia de *Pax2*. La ausencia de *Fgf8* no permite el correcto desarrollo del MHB y esto a su vez resulta en la pérdida del mesencéfalo y cerebelo (Chi *et al.*, 2003). Por otro lado, la expresión ectópica de *Pax2* es suficiente para iniciar la expresión de *Fgf8* (Ye *et al.*, 2001). La expresión del factor transcripcional *En2* tampoco se observó en embriones evaluados desde la etapa de 5s, cuando se induce *En2*, y hasta la etapa de 8s (Bouchard *et al.*, 2005).

Los embriones con la mutación nula para *Wnt1* tienen un desarrollo normal de la etapa de 1s a 5s, pero posteriormente en la etapa de 7s y 8s el tejido en la región del MHB empieza a degenerarse por la aparición de muerte celular ectópica, predominantemente en el tejido dorsal del mesencéfalo, lo que coincide con la distribución de la expresión de *Wnt1*. El mesencéfalo se pierde en la etapa de 14s y en la etapa de 26s a 28s en E9.5 se pierde todo el metencéfalo, impidiendo el subsecuente desarrollo del cerebelo. Es por esta pérdida del tejido neural que la mutación de *Wnt1* produce letalidad en el primer día postnatal (McMahon y Bradley, 1990). El fenotipo observado indica que hay una señal proveniente del mesencéfalo la cual es necesaria antes de E9.5 para el desarrollo del romboencéfalo anterior y que controla el desarrollo de esta estructura y de sus derivados.

Por otra parte, aun cuando la ausencia de *Wnt1* ocasiona la pérdida del tejido mesencefálico, no se observan defectos en los componentes derivados de la cresta neural que surge de esta región, la cual se establece en la etapa de 4s a 7s (McMahon y Bradley, 1990).

En los embriones *Wnt1*^{-/-} también se observan modificaciones en los niveles de expresión de los genes del MHB *En2* y *Fgf8*. En la etapa de 5s hay una disminución en la expresión de *En2* y alrededor de la etapa de 7s su expresión se pierde por completo en la región del MHB. En E9.5 toda expresión de ambos factores *En* se pierde totalmente, lo que a su vez produce la falta del cerebelo (McMahon *et al.*, 1992). En el caso

de *Fgf8*, su expresión es normal en la etapa de 3s a 6s en ausencia de *Wnt1*. En la etapa de 9s hay una disminución significativa y para la etapa de 14s la expresión de *Fgf8* se abate por completo en el metencéfalo (Lee *et al.*, 1997).

La mutación nula del factor transcripcional *En2* produce un mesencéfalo un tercio más pequeño que el mesencéfalo de embriones silvestres y malformaciones en la foliación del cerebelo (Millen *et al.*, 1994).

3.4 Relaciones reguladoras entre los genes del MHB

Una vez formado y establecido el organizador del MHB, existe un asa de retroalimentación entre los factores transcripcionales y las proteínas secretadas que mantiene sus propiedades morfogenéticas (Wittmann *et al.*, 2009). Estas relaciones reguladoras entre factores se ilustran en el siguiente esquema (Figura 3):

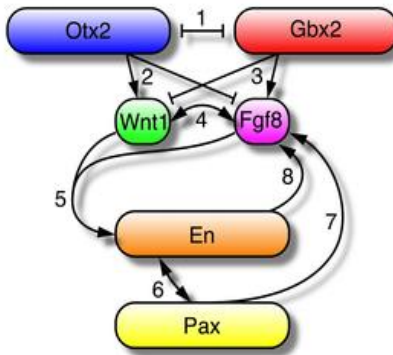


Figura 3. Red de regulación entre genes del MHB. Líneas con punta de flecha indican interacciones de activación y líneas con remate plano indican interacciones de inhibición. El orden en el que aparecen los genes no representa el orden temporal en el que se expresan en el MHB. Tomado de Wittmann *et al.*, 2009.

Existe un asa de retroalimentación negativa entre los factores transcripcionales *Otx2* y *Gbx2* donde hay una mutua represión entre ellos (Figura 3 [1]), generando una frontera muy marcada entre sus dominios de expresión (Broccoli *et al.*, 1999; Millet *et al.*, 1999). Es en esta frontera que se especifica en el neuroepitelio el sitio donde se establecerá el organizador (Joyner *et al.*, 2000; Martínez-Barbera *et al.*, 2001). Además, las mutaciones nulas y la expresión ectópica de *Otx2* y *Gbx2* revelan que, aunque estos factores no se requieren para la inducción inicial de los demás genes del organizador, se necesitan para su correcto posicionamiento, especialmente en el caso de *Fgf8* y *Wnt1*, y para el posicionamiento del MHB en la interface entre los dos dominios de expresión (Acampora *et al.*, 1995; Wassarman *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1999; Millet *et al.*, 1999).

La segunda relación reguladora (Figura 3 [2]) ilustra que *Otx2* tiene un efecto positivo sobre *Wnt1* al promover su expresión en la frontera caudal del mesencéfalo y un efecto negativo sobre *Fgf8*, inhibiendo su expresión más allá de la frontera rostral del romboencéfalo (Acampora *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1999; Rhinn *et al.*, 1999). Por otro lado, *Gbx2* tiene una relación inversa con los genes de las proteínas secretadas (Figura 3 [3]), ya que *Gbx2* favorece la expresión de *Fgf8* en el metencéfalo e inhibe la expresión de *Wnt1* más allá de la frontera caudal del mesencéfalo (Wassarman *et al.*, 1997; Millet *et al.*, 1999; Liu y Joyner, 2001).

También existe una relación de regulación positiva entre *Fgf8* y *Wnt1* (Figura 3 [4]). Tras la inducción de ambas proteínas, *Fgf8* participa en el mantenimiento de la expresión de *Wnt1* en el mesencéfalo caudal. Al mismo tiempo, la mutación nula de *Wnt1* provoca la pérdida de la expresión de *Fgf8* en etapas posteriores a su inducción, por lo que *Wnt1* participa en el mantenimiento, mas no en la inducción, de la expresión de *Fgf8* en el metencéfalo (Lee *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 2003; Wittmann *et al.*, 2009).

Wnt1 y *Fgf8* participan de forma conjunta en el mantenimiento de *En2* en el MHB (Figura 3 [5]). Existe una relación espaciotemporal entre *Wnt1* y *En2*, ya que alrededor de 6 horas después de que inicia la expresión de *Wnt1* se induce la expresión de *En2* en el MHB y su nivel de expresión más alto correlaciona con el dominio de expresión de *Wnt1*. Por otro lado, injertos de tejido que contienen *Wnt1* en el prosencéfalo inducen la expresión ectópica de *En2* (Bally-Cuif *et al.*, 1992). Finalmente, la mutación nula de *Wnt1* es suficiente para provocar la pérdida de la expresión de *En2* en el MHB (Bally-Cuif *et al.*, 1992; McMahon *et al.*, 1992). Este resultado demuestra que *Wnt1* participa en el mantenimiento de la expresión del factor *En2* en el MHB, pero no es necesario para su inducción inicial. En el caso de *Fgf8*, además de existir una relación espaciotemporal entre *En2* y este gen, los experimentos en donde se realizó el injerto de perlas embebidas de FGF8 y la expresión ectópica de *Fgf8* revelan que este gen es suficiente para inducir la expresión de *En2* en dominios ectópicos en el tubo neural anterior (Crossley *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999).

Pax2 y *En2* también comparten un asa de retroalimentación positiva (Figura 3 [6]). La expresión de *Pax2* precede la expresión del gen *En2*, el cual es blanco del factor transcripcional PAX2. La presencia de PAX2 es necesaria para el inicio de la transcripción de *En2* en la región del MHB, ya que *En2* posee sitios de unión para PAX2 y en ausencia de PAX2 se abate su expresión (Song *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 2005). Por otro lado, EN2 también tiene un efecto sobre el mantenimiento de la expresión de los genes *Pax* (Liu y Joyner, 2001).

En el caso de la relación reguladora entre *Fgf8* y *Pax2* (Figura 3 [7]), la expresión de *Pax2* también precede la expresión de esta proteína y promueve su expresión en el prosencéfalo y en el metencéfalo (Chi *et al.*, 2003). Además, la expresión ectópica de *Pax2* en el tubo neural produce una expresión también ectópica de *Fgf8* (Ye *et al.*, 2001).

Finalmente, *En2* participa en regular positivamente el mantenimiento de la expresión de *Fgf8* (Figura 3 [8]), ya que este gen posee sitios de unión al factor transcripcional *En2*, los cuales se encuentran en regiones reguladoras de su transcripción (Gemel *et al.*, 1999).

En el MHB, además de los factores transcripcionales y las proteínas secretadas, existen otros elementos que afectan su correcto desarrollo y mantenimiento. Estos elementos son los fosfolípidos, particularmente el ácido lisofosfatídico.

3.5 El ácido lisofosfatídico y su papel en el desarrollo del MHB

LPA

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un lisofosfolípido bioactivo simple compuesto por un grupo fosfato, una molécula de glicerol y un ácido graso alifático con longitud y saturación variable. El LPA funciona como una molécula de señalización extracelular implicada en la regulación de numerosos procesos en distintos tipos celulares durante el desarrollo embrionario y en el adulto, como la proliferación, migración, adhesión, muerte y cambios en la morfología celular (Choi *et al.*, 2010).

Receptores para LPA

El LPA actúa a través de la señalización mediada por receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs por sus siglas en inglés). Estos receptores se asocian con las proteínas $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/O}$, $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha 12/13}$ y activan distintas cascadas de señalización. Los receptores LPA_1 , LPA_2 y LPA_3 pertenecen a la familia de genes de diferenciación endotelial (EDG por sus siglas en inglés), mientras que LPA_4 , LPA_5 y LPA_6 pertenecen a una familia de receptores de purinas. La activación de estos receptores y sus vías de señalización afectan la regulación de distintos procesos celulares como la proliferación, la migración y la supervivencia, las cuales están involucradas procesos como la vasculogénesis y angiogénesis, el tráfico de linfocitos, el desarrollo del sistema nervioso, la inflamación, el crecimiento de cáncer y la metástasis (Mirendil *et al.*, 2013).

Durante el desarrollo embrionario hay una expresión diferencial y dinámica de los genes que codifican para los receptores LPA₁ a LPA₅ en distintos tejidos y regiones del embrión (Figura 4) (Ohuchi *et al.*, 2008).

En E8.5 la expresión del gen que codifica para el receptor LPA₁, *Lpar1*, es claramente visible en los pliegues neurales de la región cefálica, somitas y mesodermo presomítico (Figura 4A). Tras el giro axial del embrión la expresión en los pliegues neurales disminuye, pero se intensifica en la región del prosencéfalo (Figura 4B). En el MBH, *Lpar1* se expresa en toda la región dorsolateral en un dominio que abarca todo el neuroepitelio hasta antes de los márgenes laterales de los pliegues neurales, donde se encontrarían las células de la cresta neural (Figura 4C). En E9.5 se observa expresión en el mesénquima lateral de la cabeza, en las somitas y en el mesodermo presomítico. La mutación nula de *Lpar1* causa anomalías craneofaciales, así como irregularidades en la conducta para amamantarse relacionadas a problemas olfatorios (Contos *et al.*, 2000).

Lpar2 se expresa en E8.5 en el prosencéfalo rostral y en el romboencéfalo (Figura 4D). En E9.5 su expresión se observa en los procesos maxilares, el primer y segundo arco branquial y en los primordios de las extremidades. Ratones mutantes para *Lpar2* no muestran afectaciones aparentes (Mirendil *et al.*, 2013).

La expresión de *Lpar3* comienza en el corazón en E8.5 (Figura 4E) y persiste hasta etapas más tardías como E12.5. La delección dirigida de *Lpar3* resulta en una reducción en el tamaño de las camadas, la cual se atribuye a un retraso en el tiempo de implantación de los embriones, así como defectos en su espaciamiento dentro del útero. Ambos fenómenos ocasionan un retraso en el desarrollo, placentas hipertróficas compartidas entre varios embriones y letalidad embrionaria (Ye *et al.*, 2005).

Lpar4 se expresa específicamente en la región del neuroepitelio donde se establece la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo (Figura 4F). *Lpar4* se expresa también en los bordes de los pliegues neurales, los cuales formarán la línea media dorsal del tubo neural, desde el romboencéfalo rostral hasta el prosencéfalo (Figura 4G). En E9.5, la expresión de *Lpar4* se observa en la vecindad del organizador del MHB, en el romboencéfalo, en los procesos maxilares y en el primer arco branquial. La mutación nula para *Lpar4* ocasiona letalidad prenatal por defectos en el desarrollo de vasos sanguíneos y hemorragias (Sumida *et al.*, 2010).

Por último, la expresión de *Lpar5* en E8.5 se observa en los pliegues neurales anteriores. Después del giro axial del embrión, *Lpar5* se expresa en el prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo (Figura 4H). La mayor intensidad de expresión se observa en el prosencéfalo, el mesencéfalo rostral y en los márgenes de

los pliegues neurales (Figura 4I). De E9.5 en adelante la expresión de *Lpar5* se observa de manera ubicua en todo el embrión.

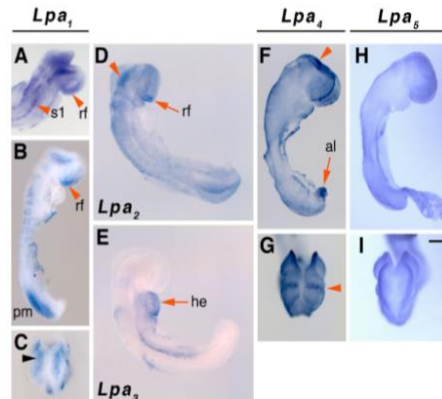


Figura 4. Patrones de expresión de los genes para los receptores de LPA en embriones en E8.5. (A) Vista dorsolateral. (B, D–F, H) Vistas laterales. (C, G, I) Vistas dorsales. El extremo anterior se muestra hacia arriba de la figura. (A–C) Expresión de *Lpar1* (*Lpa₁*) en distintas regiones del embrión. La cabeza de flecha negra en C muestra la expresión de *Lpar1* (*Lpa₁*) en la región dorsolateral, limitando con los márgenes de los pliegues neurales. (D) Cabeza de flecha muestra la expresión de *Lpar2* (*Lpa₂*) en el romboencéfalo rostral. (E) Se observa expresión de *Lpar3* (*Lpa₃*) en el corazón en desarrollo. (F, G) Cabezas de flecha muestran expresión de *Lpar4* (*Lpa₄*) en la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo. (H, I) Expresión de *Lpar5* (*Lpa₅*) se observa en el prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. al: alantoides; he: corazón; pm: mesodermo presomítico; rf: prosencéfalo rostral; s1: primera somita; so: somitas. Barra de escala=250 μ m. Tomado y modificado de Ohuchi *et al.*, 2008.

El LPA se produce intracelularmente o extracelularmente a partir de fosfolípidos de membrana y existen varias vías para su biosíntesis. En el espacio intracelular el LPA funciona como un fosfolípido estructural o como intermediario en la biosíntesis de otros fosfolípidos. Una vía de síntesis intracelular de LPA es dependiente de la actividad secuencial de las enzimas fosfolipasa D (PLD) y de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). En esta vía se sintetiza LPA a partir de la hidrólisis del ácido fosfatídico proveniente de la membrana plasmática. En otra de las vías intracelulares, la síntesis se lleva a cabo por la acilación del glicerol-3-fosfato por actividad de la glicerofosfato aciltransferasa (GPAT) y la subsecuente fosforilación por la acción de la monoacilglicerol cinasa. En el espacio extracelular el LPA funciona como una molécula de señalización y es sintetizado a partir de la lisofosfatidilcolina por la actividad de lisofosfolipasa D de la autotaxina (ATX/ENPP2) (Mirendil *et al.*, 2013).

ATX

La autotaxina (ATX) es una enzima secretada que posee dos actividades catalíticas distintas. Pertenece a la familia de pirofosfatasas/fosfodiesterasas de nucleótidos y posee la capacidad de hidrolizar nucleótidos. Por otra parte, tiene actividad de lisofosfolipasa D para sintetizar al LPA. Originalmente fue identificada

como un factor de motilidad celular en células de melanoma humano, pero su actividad también se encuentra relacionada con procesos como el desarrollo vascular, activación de plaquetas, regulación de la respuesta inmune, cicatrización, cáncer y en el desarrollo embrionario (Mirendil *et al.*, 2013).

La expresión de *Atx* durante la embriogénesis del ratón es muy dinámica y se observa en muchas regiones y tejidos dentro y fuera del embrión (Figura 5).

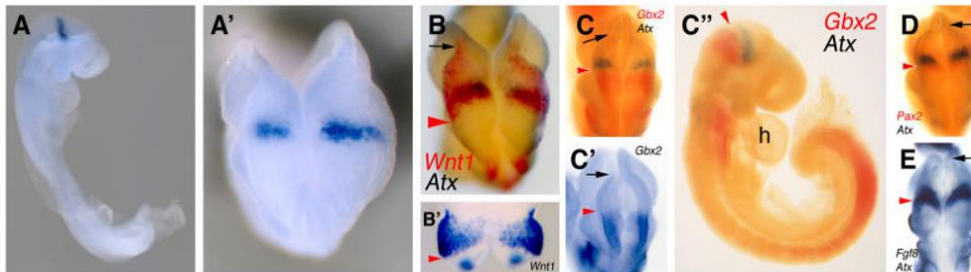


Figura 5. Patrón de expresión de autotaxina (*Atx*) durante el desarrollo neural del ratón. Embriones de E8.5 a E8.75 (A–B') y de E8.75 a E9.0 (C–E). La región anterior de los embriones se encuentra hacia arriba de la figura. Las cabezas de flecha rojas muestran la frontera entre el mesencéfalo y romboencéfalo. Las flechas negras de B a E indican la frontera entre el prosencéfalo y el mesencéfalo, donde inicia el segundo punto de cierre del tubo neural. (A) Vista lateral del embrión, mostrando en azul una banda delgada de expresión de *Atx* en los pliegues neurales cefálicos. (A') Vista dorsal del mismo embrión que A. (B–D) Hibridaciones *in situ* de doble color o de un color. *Wnt1* (B), *Gbx2* (C) y *Pax2* (D) se muestran en rojo y *Atx* en negro. Vista lateral del mismo embrión en C se muestra en C''. Hibridación sencilla para *Wnt1* (B') y *Gbx2* (C') en azul. (B–C', D) Vista dorsales. (E) Vista dorsal de hibridación *in situ* de un mismo color para *Atx* y *Fgf8*. h: corazón. Tomado y modificado de Ohuchi *et al.*, 2007.

En E7.5 *Atx* se expresa en las membranas extraembrionarias de manera difusa. En E7.5 se observa expresión en el saco vitelino y en el proceso cefálico anterior. En E8.5 *Atx* se expresa en los pliegues neurales del mesencéfalo posterior en un dominio similar al de *Lpar4* (Figura 5A, A'), limitando inmediatamente con el romboencéfalo en la región del MHB (Koike *et al.*, 2011). En E8.75, después del giro axial, la banda de expresión de *Atx* casi co-localiza con el límite posterior de expresión de *Wnt1* en el mesencéfalo (Figura 5B) y se encuentra anterior al dominio de expresión de *Gbx2*, *Pax2* y *Fgf8* y en el romboencéfalo (Figura 5C–E). Entre los dominios de *Atx* y *Gbx2*, existe una delgada banda de neuroectodermo que no expresa ninguno de los dos genes (Figura 5C''). Para E9.0, la expresión de *Atx* disminuye en la vecindad del MHB y para E9.5 la expresión es casi nula (Ohuchi *et al.*, 2007).

Se sabe que ATX posee un papel importante en el desarrollo embrionario y en el establecimiento del organizador del MHB. Modelos murinos para la delección o sobreexpresión de la enzima revelaron que los embriones mueren durante el desarrollo temprano, alrededor de E9.5 a E10.5, y presentan una serie de defectos en diversos tejidos y estructuras. La formación de vasos sanguíneos y la angiogénesis en el saco vitelino se ven afectados, el alantoides se compacta y no contacta al corion, los embriones presentan un

retraso en el desarrollo, no realizan el giro axial de forma correcta y existen defectos en la morfología y función del corazón (Tanaka *et al.*, 2006; Yikura *et al.*, 2015).

El desarrollo y la morfología del tubo neural en embriones con modificaciones en *Atx* también se ven afectados. Durante el desarrollo embrionario normal el proceso de cierre del tubo neural comienza alrededor de la etapa de 6s a 7s en E8.5. Existen tres puntos de cierre en la región anterior de los pliegues neurales que inician y propagan la neurulación (Copp, 2005). El cerrado inicia en el punto de cierre 1, ubicado en la frontera entre el romboencéfalo y la región cervical. A continuación, en la etapa de 12s a 15s, aparecen otros dos puntos de cierre, el 2 se ubica en la frontera entre el prosencéfalo y el mesencéfalo y el 3 aparece en la región más rostral del romboencéfalo. La propagación bidireccional del cierre de los pliegues neurales a partir de los puntos de cierre es lo que da origen finalmente al tubo neural.

En los embriones *Atx*^{-/-} el cierre del tubo neural no se lleva a cabo de manera correcta. Los pliegues neurales anteriores son asimétricos, el tubo neural muestra ondulaciones aberrantes en el eje anteroposterior, la proliferación en el neuroepitelio se ve disminuida y aumenta la muerte celular en el tubo neural (Fotopoulou *et al.*, 2010). La notocorda también es ondulada en la región cefálica, especialmente en el dominio que abarca desde el mesencéfalo hasta el romboencéfalo (Koike *et al.*, 2011). En esta región la neurulación entre los puntos de cierre 2 y 3 no se lleva a cabo y los pliegues neurales persiste abiertos. Este defecto se puede deber a que el cierre del tubo neural depende de procesos como la migración celular, la proliferación y muerte celular, procesos modulados por LPA (Choi *et al.*, 2010). En ausencia de *Atx*, los niveles de LPA disminuyen y los procesos que este fosfolípido modula se afectan.

En relación con el MHB, la delección de *Atx* afecta la expresión de los genes del organizador (Figura 6), modificando tanto sus dominios como sus niveles de expresión (Koike *et al.*, 2011).

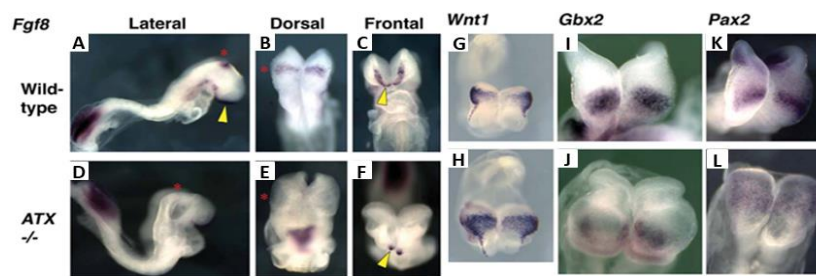


Figura 6. Patrón de expresión de *Fgf8*, *Wnt1*, *Gbx2*, y *Pax2* en embriones silvestres y *Atx*^{-/-} en E8.0 y E8.5. El dominio anterior de los embriones se muestra en la parte superior de la figura. Asteriscos indican la posición del MHB. Las puntas de flecha indican la ubicación de los pliegues neurales anteriores (ANR). (A-C) Expresión de *Fgf8* en el MHB, ANR y surco primitivo en embrión silvestre. (D, E) En embriones *Atx*^{-/-}, *Fgf8* casi no se observa en el MHB. (F) Dominio de expresión del ANR no se expande lateralmente en embriones *Atx*^{-/-}. (G) Dominio de expresión de *Wnt1* en embrión silvestre. (H) El dominio de expresión de *Wnt1* es más amplio en embriones *Atx*^{-/-}. (I) Expresión de *Gbx2* en embrión silvestre. (J) La expresión se observa disminuida en embriones *Atx*^{-/-}. (K) Expresión de *Pax2* en el MHB de embriones silvestres. (L) En embriones *Atx*^{-/-} la expresión disminuye y el dominio es más amplio. Tomado y modificado de Koike *et al.*, 2011.

La expresión de *Fgf8* en el MHB en algunos embriones *Atx*^{-/-} disminuye y de igual manera se afecta la expresión en la cresta neural anterior (ANR por sus siglas en inglés), donde se observan disminuciones en la intensidad, así como la restricción de su dominio de expresión (Figura 6A-F). El dominio de expresión de *Wnt1* en E8.0 es más amplio en la región del MHB (Figura 6G, H) y tanto *Gbx2* (Figura 6I, J) como *Pax2* (Figura 6K, L) también presentan dominios más amplios, pero sus niveles de expresión se encuentran disminuidos.

Estos resultados revelan que, aun cuando se está formando el organizador, su establecimiento y su correcto funcionamiento se ven afectados en embriones deficientes de la actividad de ATX y esto podría estar ocasionando los defectos observados relacionados con el cierre del tubo neural.

Debido a la relevancia que tiene el LPA y otros lípidos bioactivos en el desarrollo, hay una estricta regulación de su concentración creando un balance entre las distintas vías de síntesis y degradación. La biotransformación del LPA se lleva a cabo por varias enzimas como la LPA aciltransferasa (LPAAT), las fosfatasas de fosfolípidos (PLPPs) y otras lisofosfolipasas, las cuales convierten al LPA en ácido fosfatídico, lo hidrolizan o lo convierten nuevamente en monoacilglicerol (MAG) (Mirendil *et al.*, 2013).

3.6 Las fosfatasas de fosfolípidos (PLPPs)

Las fosfatasas de fosfolípidos (PLPPs por sus siglas en inglés) son enzimas integrales de membrana pertenecientes a la familia de fosfatasas/fosfotransferasas. En mamífero existen tres isoformas: PLPP1, PLPP2 y PLPP3 codificadas por los genes *Plpp1*, *Plpp2* y *Plpp3* respectivamente. Estos genes eran previamente conocidos como *Ppap2A/Lpp1*, *Ppap2C/Lpp2*, y *Ppap2B/Lpp3* (Tang *et al.*, 2015).

La estructura de las PLPPs consiste en 6 dominios transmembranales compuestos por α -hélices, tres asas extracelulares y dos intracelulares y sus dominios amino y carboxilo terminales se ubican dentro del citosol. El sitio catalítico se encuentra, generalmente, en el espacio extracelular y está conformado por tres dominios conservados entre las 3 isoformas, ubicados en la segunda y tercera asas extramembranales (Zhang *et al.*, 2000). El dominio C1 del sitio catalítico se encarga del reconocimiento de los substratos mediante los aminoácidos lisina y arginina mientras que el C2 y C3 poseen la actividad de fosfatasa con los aminoácidos catalíticos histidina y arginina en el C2 e histidina y aspartato en el C3 (Sigal *et al.*, 2005). Por otra parte, la segunda asa extracelular también posee un sitio de N-glicosilación (Tang *et al.*, 2015).

Al ser proteínas transmembranales, las PLPPs también se pueden encontrar en membranas intracelulares, como en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, con el sitio catalítico orientado hacia el lumen

del organelo (Barilà *et al.*, 1996; Kai *et al.*, 1997). Es también por la ubicación de su sitio catalítico que las PLPPs regulan la concentración de fosfolípidos en el espacio extracelular y dentro de organelos.

Como ya fue mencionado, estas enzimas se encargan de convertir lípidos bioactivos como el LPA, la esfingosina 1 fosfato (S1P), el ácido fosfatídico (PA) y la ceramida 1 fosfato (C1P) a sus formas desfosforiladas que son el MAG, la esfingosina (Esf), el diacilglicerol (DAG) y la ceramida (Cer) respectivamente. Las PLPPs participan en la regulación de procesos celulares como supervivencia y proliferación, apoptosis, migración y diferenciación al modular los niveles de fosfolípidos y sus productos desfosforilados y, en consecuencia, las vías de señalización que estas moléculas activan o inhiben (Goetzl y An, 1998; Tang *et al.*, 2015).

Plpp3

De las tres isoformas de PLPPs, en humano la PLPP3 es la única que, además de la actividad catalítica, posee un dominio de arginina-glicina-aspartato (RGD) que es capaz de unir a integrinas como la $\alpha_v\beta_3$ y la $\alpha_5\beta_1$ (Humtsoe *et al.*, 2003). Esta cualidad hace que la función de la PLPP3 no sea redundante a la de las otras dos isoformas. En ratón la PLPP3 posee un dominio arginina-glicina-glutamato (RGE) que también une integrinas (Humtsoe *et al.*, 2005) (Figura 7).

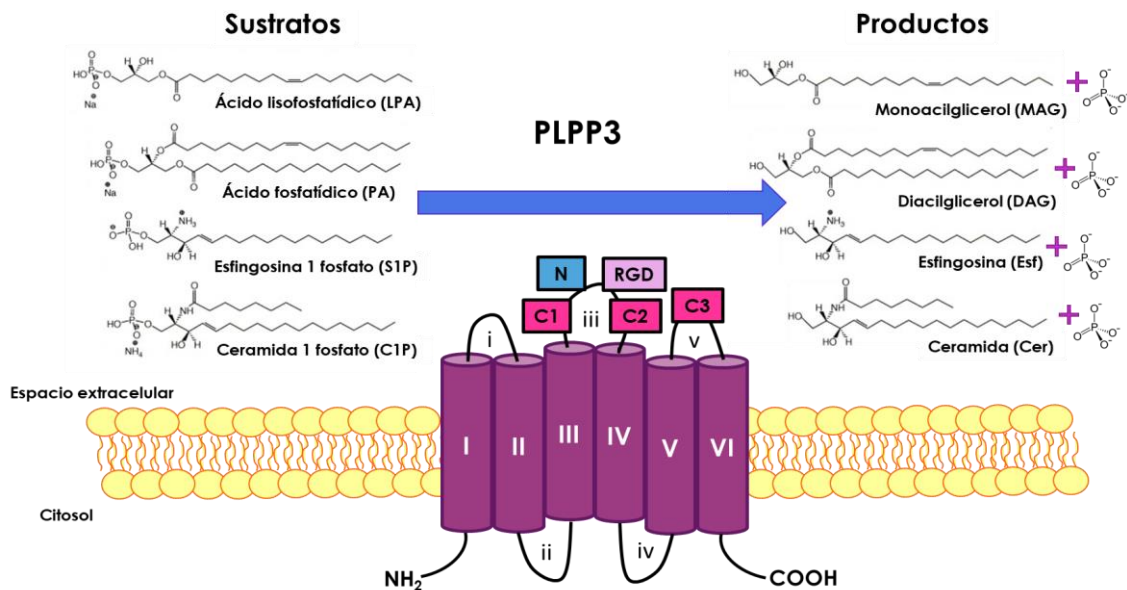


Figura 7. Estructura y función de la PLPP3. Se muestran los seis pases transmembranales (I-IV) y las 5 asas extramembranales (i-v). Los tres dominios conservados que componen al sitio catalítico se muestran en rosa (C1, C2, C3), el recuadro azul indica el sitio de N-glicosilación y el recuadro en morado ilustra el dominio RGD. En ratón el dominio es RGE y es funcional. La PLPP3 desfosforila lípidos bioactivos como el ácido lisofosfatídico (LPA), el ácido fosfatídico (PA), la esfingosina-1-fosfato (S1P) y la ceramida-1-fosfato (C1P) convirtiéndolos a sus formas inactivas: monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), esfingosina (Esf) y ceramida (Cer). Modificado de Kok *et al.*, 2012 y McDermott *et al.*, 2006.

En ratón se ha visto que las PLPPs se expresan en una gran cantidad de tejidos, tanto en embriones como en adultos, con diferentes dominios e intensidades. En E9.5 durante el desarrollo embrionario, la PLPP1 se expresa de forma uniforme y ubicua en todo embrión, así como la PLPP2, aunque ésta se expresa con una menor intensidad (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003). La PLPP3 por otra parte presenta un patrón de expresión muy dinámico durante el desarrollo embrionario temprano y sus dominios varían de acuerdo con la etapa del desarrollo de E8.5 a E13.5.

Para observar la expresión de *Plpp3*, en el laboratorio se creó un ratón con un alelo nulo reportero para la actividad de la β -galactosidasa (β -gal) de bacteria, al cual nos referiremos como *Plpp3^{lacZ}* (Escalante-Alcalde *et al.*, 2009). El gen de la β -gal fue insertado en el exón 3 de *Plpp3* mediante recombinación homóloga en células troncales embrionarias (ESC) de ratón. Este alelo, aparte de ser reportero, es nulo ya que interrumpe la secuencia de la proteína entre el dominio C1 y C2, los cuales son esenciales para su actividad catalítica y generan una PLPP3 no funcional. Los ratones heterocigos para *Plpp3^{lacZ}* son viables y fértiles.

Mediante ensayos para la actividad de β -gal (Figura 8) se analizaron los patrones de expresión de *Plpp3* en etapas embrionarias tempranas (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003; Escalante-Alcalde *et al.*, 2009).

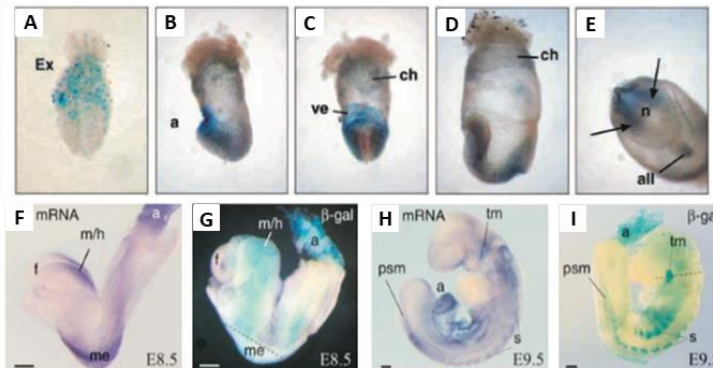


Figura 8. Expresión de PLPP3 en embriones de E6.5 a E9.5. Expresión de PLPP3 visto por actividad del reportero de β -gal en embriones heterocigos para el alelo *Plpp3^{lacZ}* en E6.5 (A), E7.5 (B, C) y E8.5 (D, F). 'a' denota expresión en la región anterior del embrión (B) y flechas denotan expresión alrededor del nodo (E). Hibridación *in situ* (F, H) o tinción de actividad de β -gal (G, I) en embriones de en E8.5 (F, G) y E9.5 (H, I). a, all: alantoides; ch: corion; Ex: ectodermo extraembrionario; f: prosencéfalo; me: mesodermo; m/h: region del mesencéfalo/romboencéfalo; n: nodo; psm: mesodermo presomítico; s: somitas; tm: futura membrana timpanica; ve: endodermo visceral. Barras de escala 100 μ m en F-I. Tomado y modificado de Escalante-Alcalde *et al.*, 2003 y Escalante-Alcalde *et al.*, 2009.

Se encontró que en E6.5 la PLPP3 se expresa en el ectodermo extraembrionario (Figura 8A) y en E7.5 se expresa en el endodermo visceral y en las membranas extraembrionarias (Figura 8B-C). En E8.0 la expresión se restringe a la punta del alantoides y alrededor del nodo en la parte ventral del embrión (Figura 8D, E). En E8.5 la expresión abarca todo el alantoides, la notocorda, el intestino primitivo, el canal pericardio-peritoneal y las somitas (Figura 8G). La expresión también es abundante en el mesodermo

paraxial, el cervical y el de la cabeza. También en esta etapa se puede observar mediante hibridación *in situ* un amplio dominio de expresión en el neuroepitelio que abarca la región del futuro mesencéfalo y romboencéfalo, así como en la región ventral del tubo neural (Figura 8F). Para E9.5 la expresión de PLPP3 se sostiene en el alantoides que ahora conforma el cordón umbilical, en la futura membrana timpánica, en las somitas, en el tejido paraxial en la región cervical, en la cavidad celómica y en los primordios de las extremidades (Figura 8H, I).

Modelos de ratones deficientes para la *Plpp1* y *Plpp2* generan ratones viables y fértiles y no muestran algún fenotipo característico durante el desarrollo (Zhang *et al.*, 2000; Tomsig *et al.*, 2001). Por otro lado, la inactivación del gen *Plpp3* causa severos defectos en el desarrollo temprano que llevan a la letalidad embrionaria (Figura 9) (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

La mutación nula de *Plpp3* ocasiona un retraso en el desarrollo de 12 a 24 horas en embriones *Plpp3^{DeltaO3/DeltaO3}* comparados con embriones heterocigos y silvestres de la misma camada (Figura 9B, D). Los embriones homocigos mueren alrededor del día E9.5 por defectos en la formación del plexo vascular del saco vitelino (Figura 9A, C), la falta de una fusión corioalantoidea y en algunos casos, defectos en la gastrulación y en el establecimiento del eje anteroposterior. En los embriones que alcanzan desarrollarse hasta E9.5 y E10.5 se observan defectos en el cierre del tubo neural a la altura de los puntos de cierre 1 y 3, ya que en esta región los pliegues se mantienen abiertos y muestran un tubo neural ondulado (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003). En el laboratorio encontramos que además de la persistencia en la apertura del tubo neural, los pliegues neurales poseen una morfología anormal, al presentar tanto en la superficie como en los bordes laterales una textura irregular y sinuosa.

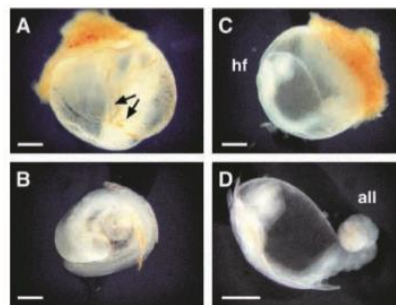


Figura 9. Fenotipo de embriones deficientes de *Plpp3*. Embrión en E9.5 mostrando la vascularización del saco vitelino (A, flechas) y la morfología de un embrión con desarrollo normal en esta etapa (B). El embrión ha realizado la rotación axial y el alantoides (all) se ha fusionado con el corion. Embrión homocigo para el alelo *Plpp3^{DeltaO3}* de la misma camada que el silvestre (C, D). Las membranas extraembrionarias carecen de vasos grandes (C). El embrión muestra un retraso en el desarrollo, no ha realizado la rotación axial y presenta un tamaño reducido (D). El defecto morfológico más evidente es el desarrollo anormal del alantoides (all). Barra de escala: 0.5 mm. Tomado y modificado de Escalante-Alcalde *et al.*, 2003.

El patrón de expresión dinámico que tiene *Plpp3* sumado a las consecuencias que presenta su mutación revela que, además llevar a cabo funciones no redundantes con respecto a las otras dos isoformas de PLPPs, la PLPP3 tiene un papel esencial en el desarrollo embrionario.

4. Justificación

Dada la coincidencia en los patrones de expresión de *Plpp3*, *Atx* y algunos de los receptores para LPA, como el *Lpar4*, en la región del MHB, además de las similitudes fenotípicas que presentan las mutaciones nulas de *Plpp3* y *Atx* en el tubo neural, en este trabajo decidimos evaluar la participación de la PLPP3 en el establecimiento del MHB y en el desarrollo cerebro medio y posterior.

5. Hipótesis

La falta de la PLPP3 durante el desarrollo temprano ocasionará defectos en el establecimiento del MHB, afectando la expresión y regionalización de los genes específicos de esta zona.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Caracterizar la función que tiene la PLPP3 durante el desarrollo embrionario en la formación y en el mantenimiento del organizador del límite entre el mesencéfalo y romboencéfalo.

6.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar los dominios y los niveles de expresión de los marcadores *En2*, *Fgf8*, *Otx2*, *Pax2* y *Wnt1* en etapas con equivalencia somítica en el MHB de embriones silvestres, heterócigos y homócigos (*Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ}) mediante hibridaciones *in situ*.
2. Evaluar los niveles de proliferación en el neuroepitelio a la altura del MHB en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ}.
3. Evaluar los niveles de muerte en el neuroepitelio a la altura del MHB en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ}.

7. Materiales y Métodos

7.1 Ratones

Para este trabajo se utilizaron ratones de la cepa CD1 que son portadores heterocigos del alelo *Plpp3^{lacZ}* (CD1.*Plpp3^{+/lacZ}*). Los ratones se mantuvieron en un fotoperiodo de luz y oscuridad normales y con agua y comida *ad libitum*.

Todas las manipulaciones y procedimientos utilizados en este proyecto fueron realizados de acuerdo con el protocolo DAA3914, aprobado por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular.

7.2 Extracción de Embriones

Se realizaron cruces de hembras de la cepa CD1.*Plpp3^{+/lacZ}* en edad reproductiva con machos del mismo genotipo. Se tomó por E0.5 al día en el que se encontró un tapón seminal en la vagina de la hembra tras realizarse la cópula durante la noche. Las hembras fueron sacrificadas mediante dislocación cervical en los días E8.5 y E9.5 para extraer a los embriones en dichas etapas como se ha descrito previamente (Nagy *et al.*, 2003). Brevemente, se expone el útero de la hembra mediante una incisión transversal en el abdomen y se extraen las deciduas de ambos cuernos uterinos. La extracción se realiza manteniendo a las deciduas y embriones en medio L15 frío (Gibco 11415064) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco 16000044) y la separación de los embriones de las membranas extraembrionarias se realizó bajo el estereoscopio utilizando agujas de jeringa de insulina y pinzas de disección. Se colocó un embrión por pozo en cajas de cultivo de 48 pozos con 200 µl de medio L15 en hielo. Cada embrión fue fotografiado con una cámara Nikon Coolpix montada en el estereoscopio para tener registro del fenotipo de cada embrión.

7.3 Genotipificación de Embriones

Durante la extracción de los embriones se aisló el saco vitelino el cual se lavó varias veces en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂HPO₄ 2 mM, pH 7.4 [J.T. Baker]). El saco se colocó en un tubo eppendorf de 200 µl con 10 µl de H₂O Milli Q estéril y 10 µl de solución de lisis compatible con PCR 2X (KCl 50 mM, Tris pH 8.3 10 mM, MgCl₂ 2 mM, Gelatina 0.1 mg/ml, NP-40 0.45% y Tween-20 0.45%) adicionado con Proteinasa K 100 µg/ml (Roche 3115844001). Las muestras se lisaron para obtener el DNA a 56°C en un Thermoblock con agitación de 850 rpm durante 2 horas. La Proteinasa K se inactivó calentando a 94°C con agitación de 850 rpm por 10 minutos. Las muestras se usaron de inmediato o se almacenaron a -20°C. Para genotipificar a los embriones se realizó una reacción de PCR en tubos eppendorf de 200 µl con un volumen total de 13.05 µl para amplificar tanto la banda del alelo mutante como la del alelo silvestre. La reacción se preparó con 10 µl de H₂O Milli Q estéril, 1.25 µl de amortiguador 10x de PCR suplementado con MgCl₂ a 50 mM (Sigma P2192), 0.25 µl de Taq polimerasa, 0.25 µl de dNTP's (Roche 11814362001),

0.1 μ l de los oligonucleótidos Neo Down, LacZ Reverse y LacZ Forward (Invitrogen) y 1 μ l de DNA de las muestras lisadas por tubo. Como control positivo se empleó DNA extraído de cola de hembras CD1.*Plpp3^{+/lacZ}* y como control negativo se utilizó 1 μ l de H₂O Milli Q. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados son las siguientes:

Neo Down: 5'-TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG TTC-3'

LacZ Forward: 5'-CTG TGC CAT TAG CCA GTC CTT CAC-3'

LacZ Reverse: 5'-TAG TTC TGA ATG TAG CCC TCG GAG-3'

La combinación de oligonucleótidos Neo Down y LacZ Reverse amplifican al alelo mutado produciendo una banda de alrededor de 700 pb y la combinación de LacZ Forward con LacZ Reverse amplifican al alelo silvestre el cual produce una banda de 128 pb.

Se utilizó el termociclador Flexigene (Techne) y se amplificó el DNA por 30 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 2 minutos a 94°C y posteriormente 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. La terminación tuvo una duración de 1 minuto a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X (Trizma Base 45 mM, ácido bórico 44 mM y EDTA 1 mM) con 40 μ l/L de bromuro de etidio a 10 mg/ml. Los geles se corrieron en TBE 0.5X a 50V y se tomaron fotografías de los geles en un transiluminador de luz UV con una cámara digital Canon PowerShot G6 y los colores de las imágenes fueron invertidos usando el programa Image J.

Los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* mutantes presentan una única banda de 700 pb, los embriones *Plpp3^{+/lacZ}* presentan dos bandas, una de 700 pb y otra de 128 pb y los *Plpp3^{+/+}* presentan una única banda de 128 pb (Figura 10).

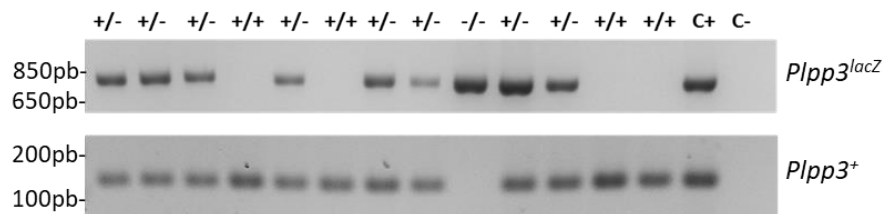


Figura 10. Genotipificación de embriones obtenidos en E9.5 de la cruce entre adultos CD1.*Plpp3^{+/lacZ}*. PCR de muestras de saco vitelino de una camada de embriones en E9.5. El alelo mutante *Plpp3^{lacZ}* que presenta la inserción del gen de β -gal se muestra como una banda de 700pb mientras que el alelo silvestre se observa como una banda de 128pb. Embriones silvestres muestran una única banda de 128pb, embriones *Plpp3^{+/lacZ}* una banda de 128pb y otra de 700pb y los *Plpp3^{lacZ/lacZ}* muestran una sola banda de 700pb. C+: control positivo; C-: control negativo.

7.4 Fijación y almacenamiento de embriones para hibridación *in situ*

Una vez que se separaron a los embriones de sus membranas extraembrionarias y se aislaron en las cajas de cultivo se retiró el medio utilizando una pipeta de transferencia y se incubaron toda la noche a 4°C en 200 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS pH 7.4. Posteriormente se realizaron 2 lavados en PBS con Tween-20 al 0.5% (PBT) preparado con agua Milli Q tratada con DEPC. Los embriones se deshidrataron con una serie gradual de metanol en PBT de 25%, 50%, 75% y 100%. Todos los lavados se llevaron a cabo a temperatura ambiente con duración de 5 minutos. Los embriones se almacenaron a -20°C en tubos eppendorf de 600 µl con metanol al 100% hasta ser utilizados.

7.5 Transformación de bacterias y aislamiento de plásmido

Bacterias *E. coli* competentes por el protocolo de cloruro de calcio (Sambrook, 2001) fueron transformadas con 20 ng de los plásmidos que contienen las secuencias para *En2*, *Fgf8*, *Otx2* y *Pax2*. Los plásmidos fueron donados por el Dr. Mark B. Lewandoski del National Cancer Institute, Estados Unidos. Brevemente, se descongelaron las alícuotas de 100 µl de bacterias en hielo y se agregaron los 20 ng de plásmido. Se incubaron en hielo 30 minutos y después se indujo el choque térmico incubando 30 segundos a 42°C. Tras incubar en calor se incubaron por 2 minutos en hielo. Se agregaron 200 µl de medio SOC y se incubaron una hora y media a 37°C con agitación de 350 rpm. Las bacterias fueron sembradas en cajas de Petri con agar preparado con ampicilina (100 mg/ml) y se incubaron a 37°C toda la noche. Para amplificar el plásmido se picaron colonias transformadas y se inocularon 5ml de medio LB con ampicilina para hacer Mini Preps y 100 ml para realizar Maxi Preps y se aisló el plásmido por el protocolo de lisis alcalina y centrifugación con columnas (Roche 1175477001 y Qiagen 12163). Se enviaron los plásmidos a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular para conocer la orientación del fragmento de los genes con respecto a la orientación del plásmido y corroborar las secuencias.

7.6 Linealización y síntesis de sondas para hibridación *in situ*

Una vez que los plásmidos fueron aislados y secuenciados se realizaron las digestiones correspondientes de linealización. La reacción de digestión se preparó con 5 µg de plásmido, 1 µl de enzima de restricción, 5 µl de amortiguador 10X y agua Milli Q para llevar la reacción a 50 µl. Los plásmidos se linealizaron utilizando las siguientes enzimas de restricción y sus correspondientes amortiguadores:

Plásmido	Sonda Antisentido	Amortiguador	Marca	Sonda Sentido	Amortiguador	Marca
<i>En2</i>	<i>EcoR I</i>	NEBuffer for <i>EcoRI</i>	New England R0101S	<i>Sac II</i>	NEBuffer 4	New England R0157S
<i>Fgf8</i>	<i>Sma I</i>	Buffer T	Invitrogen 15228018	<i>Xho I</i>	NEBuffer 4	New England R0146S
<i>Otx2</i>	<i>BamH I</i>	Buffer K	Invitrogen 15201049	<i>Xho I</i>	NEBuffer 4	New England R0146S
<i>Pax2</i>	<i>BamH I</i>	Buffer K	Invitrogen 15201049	<i>EcoR I</i>	NEBuffer for <i>EcoRI</i>	New England R0101S

Una vez linealizados los plásmidos se purificaron utilizando el protocolo de fenol cloroformo. La reacción se llevó a 100 µl con H₂O Milli Q, se agregaron 50 µl de fenol y 50 µl de cloroformo/isoamílico (49:1) y se agitó en el vortex. Se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se aisló la fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Se agregaron 100 µl de cloroformo/isoamílico y se agitó en el vortex. Se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se volvió a aislar la fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Se estimó el volumen y se agregó 1/25 de NaCl 5 M y etanol absoluto a -20°C y se agitó en el vortex. El DNA se dejó precipitando toda la noche a -70°C. Se centrifugó el DNA a 13,000rpm por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante con cuidado de no tirar la pastilla de DNA en el fondo. Se hizo un lavado con etanol al 70% y se centrifugó el DNA a 13,000rpm por 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para que se evaporara el etanol. Finalmente, se resuspendió el DNA en 50 µl de H₂O Milli Q tratada con DEPC.

La reacción de transcripción de las sondas antisentido y sentido se preparó con 1µg de plásmido linealizado, 4 µl de amortiguador 5X Transcription optimized buffer (Promega P1181), 2 µl de Dig RNA Labeling Mix 10X (Roche 11277073910), 1 µl de RNAsin Plus RNase Inhibitor (Promega N2611), 1 µl de DTT 100 Mm (Promega P1171), 1 µl de RNAPol T7 o T3 (Promega P2075 y P2083) y agua Milli Q tratada con DEPC para llevar la reacción a 20 µl. La reacción fue preparada con las siguientes RNA polimerasas para cada plásmido:

Plásmido	Sonda Antisentido	Sonda Sentido
<i>En2</i>	T7	T3
<i>Fgf8</i>	T7	T3
<i>Otx2</i>	T3	T7
<i>Pax2</i>	T3	T7

La reacción se incubó por 2 horas a 37°C y se purificaron las sondas con las columnas Quick Spin Columns for Radiolabeled Probes (Roche 11273965001). Finalmente, se agregó 1 µl de RNAsin a la sonda purificada y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.7 Subclonación de fragmento de *Wnt1* en pBluescript

Para poder sintetizar sonda sentido y antisentido para *Wnt1* se hizo la digestión del plásmido original que contenía al fragmento de *Wnt1* donado también por el Dr. Lewandoski, así como del plásmido pBluescript con las enzimas de restricción *Xma I* (New England R0180S) y *Xba I* (New England R0145S). La reacción de digestión de *Wnt1* se preparó con 3 µg de plásmido, 1 µl de *Xma I*, 1 µl de *Xba I*, 5 µl del amortiguador NEBuffer 4 10X y 0.50 µl de BSA (New England B9001S). La reacción de digestión del plásmido se preparó con 1 µg de plásmido, 1 µl de *Xma I*, 1 µl de *Xba I*, 5 µl de amortiguador NEBuffer 4 10X, 0.50 µl de BSA y 41.5 µl de H₂O Milli Q. El plásmido linealizado y el fragmento de *Wnt1* se corrieron en geles de agarosa al 0.7% en TAE 1X (Trizma Base 40mM y EDTA 1mM) con 40 µl/L de bromuro de etidio. Los geles se corrieron en TAE 1X a 50V y se visualizaron las bandas en un transiluminador con luz UV. Con un bisturí se cortaron las secciones del gel con las bandas de 3000 pb del plásmido pBluescript digerido y de 447 pb de *Wnt1*. Las secciones de gel fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml y el DNA fue purificado con el protocolo del QIAquick PCR Gel Extraction Kit (Qiagen 28704). La reacción de ligación se realizó con el plásmido y el fragmento de *Wnt1* en una proporción de 1:2 y 1:3, 1 µl de amortiguador 10x T4 DNA Ligase buffer adicionado con 10 mM de ATP (New England Biolabs M020L), 0.1 µl de T4 DNA Ligase (New England Biolabs B020S) y H₂O Milli Q para llevar la reacción a 10 µl. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente toda la noche (Sambrook, 2001).

Se transformaron bacterias *E. coli* competentes y se extrajo plásmido con el protocolo previamente descrito. El plásmido se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular para corroborar la inserción del fragmento de *Wnt1*, la dirección de la secuencia en relación con la dirección del plásmido, las enzimas que se necesitaban para digerir el plásmido y los promotores que transcribían la sonda sentido y antisentido.

Se digirió el plásmido y se sintetizaron las sondas con el protocolo previamente descrito. Para la sonda antisentido se cortó con la enzima *Xba I* y se transcribió con T3 y para obtener la sonda sentido se cortó con *EcoR I* y se transcribió con T7 (Figura 11).

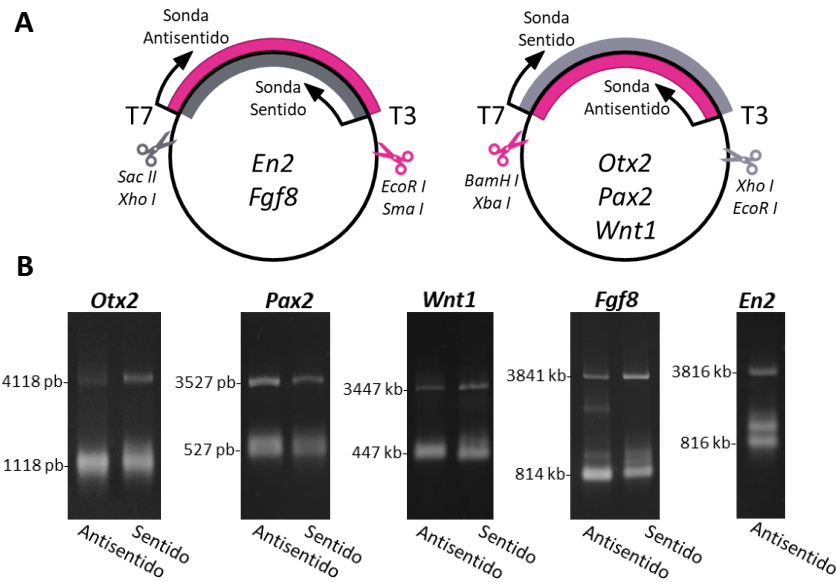


Figura 11. Síntesis de sonda para hibridación *in situ*. (A) Esquemas muestran los promotores con los que realizaron las transcripciones de las sondas antisentido y sentido y las enzimas con las que se linealizan los plásmidos. (B) Fotografías muestran bandas superiores correspondientes al plásmido linealizado con el inserto del gen y bandas inferiores correspondientes al mRNA sintetizado a partir del inserto. Peso molecular de las bandas se muestra a la izquierda de las imágenes.

7.8 Hibridación *in situ*

Todas las soluciones fueron preparadas con H₂O Milli Q tratada con DEPC (1 ml por cada litro), la cual se dejó toda la noche con agitación y posteriormente se inactivó el DEPC por autoclave.

Se rehidrataron los embriones con una serie gradual de metanol en PBT al 75%, 50% y 25% en hielo con dos lavados de 5 minutos por solución. Se hicieron dos lavados rápidos con PBT en hielo y se blanquearon por una hora en H₂O₂ al 2% en PBT. Se hicieron 3 lavados rápidos y se permeabilizaron con Proteínasa K a 10 mg/ml en PBT por 3 minutos para embriones en E8.5. Se hizo un lavado de 10 minutos con glicina a 2 mg/ml en PBT para detener la reacción de la Proteínasa K. Se hicieron dos lavados rápidos con PBT y se postfijaron los embriones en paraformaldehído al 4% en PBS (Gibco 10010023) con glutaraldehído al 0.2% por 15 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron 4 lavados rápidos con PBT y se incubaron los embriones con solución de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X pH 4.5, SDS 1%, tRNA de levadura 50 µg/ml [Sigma R5636] y heparina 5 mg/µl en agua Milli Q tratada con DEPC) a 70°C con agitación constante por dos horas. Se preparó la sonda de hibridación en 100 µl de solución de hibridación con 500 ng RNA marcado previamente cuantificado utilizando el espectrofotómetro Nanodrop.

Las sondas se calentaron por 5 minutos a 70°C en el Termoblock. Se agregó la sonda a los embriones y se incubaron toda la noche a 70°C con agitación constante. Después de la incubación se hicieron 3 lavados

de 10 minutos con solución de hibridación a 70°C con agitación constante. Se hicieron 3 lavados de 30 minutos con la solución de lavados 1 (Formamida 50%, SSC 5X pH 4.5 y SDS 1% en agua Milli Q tratada con DEPC) a 70°C con agitación constante y 3 lavados de 30 minutos con la solución de lavados 2 (Formamida 50% y SSC 2X pH 4.5 en agua Milli Q tratada con DEPC) a 70°C con agitación constante. Posteriormente se hicieron 3 lavados rápidos con TBST (Tris 25mM pH 7.5, NaCl 0.234 g y KCl 0.02 g en agua Milli Q tratada con DEPC) a temperatura ambiente. Se incubaron los embriones en Blocking Reagent (Roche 1096176) al 1% en PBT por 2 horas 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Tras el bloqueo se incubaron los embriones toda la noche a 4°C con agitación constante con Blocking Reagent al 1% en PBT adicionado con anticuerpo Anti-Digoxigenina-AP (Roche 1093274) a una concentración de 1:2000. Después de la incubación se hicieron 3 lavados rápidos con TBST y después se hicieron 5 lavados de 1 hora 30 minutos, todos a temperatura ambiente y agitación constante. Se hizo un lavado toda la noche a 4°C y con agitación constante. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos con solución de detección para la AP (NaCl 100mM, Tris pH 9.5 100mM, Tween 1% y Levamisol 2 mM en agua Milli Q tratada con DEPC). Se incubaron los embriones en solución de tinción protegidos de la luz a temperatura ambiente hasta que se reveló la marca morada (5 ml de solución de detección para la AP, 25 µl de NBT y 18.75 µl de BCIP). Se hicieron dos lavados rápidos con PBT y se lavaron 2 veces con solución de frenado de la actividad de la AP (Tris 100 mM y EDTA 1 mM en agua Milli Q tratada con DEPC). Se les hizo una fijación posterior a los embriones en PFA al 4% en PBS por una hora a temperatura ambiente y se hizo una deshidratación rápida con una serie gradual de metanol en PBT de 25%, 50%, 75% y 100% seguida por una rehidratación rápida con la misma serie. Cada embrión fue fotografiado con una cámara Nikon montada en el estereoscopio sobre una cama de agarosa al 1% en PBS. Posteriormente los embriones fueron almacenados en PBT o en glicerol al 50% en PBS a 4°C.

7.9 Análisis de las imágenes de las hibridaciones

Para cuantificar las variaciones en los niveles de expresión de los distintos genes del MHB entre los embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* se utilizó el programa FIJI (versión actualizada de Image J). Para realizar el análisis de las imágenes se seleccionó el área deseada, ya sea manualmente o con el umbral de saturación de color (Threshold) para el código de colores RGB. Posteriormente se convirtió la imagen a escala de grises (8-bit) y finalmente se invirtieron los colores. Los valores que fueron medidos por el programa fueron el área del dominio seleccionado dada en pixeles y la densidad integrada del color gris dentro de esa área, dada en unidades arbitrarias (UA). Por cada imagen se tomó una región del embrión de 57x57 pixeles negativa a la señal del gen y su densidad integrada sirvió como blanco.

Para obtener el valor de la densidad integrada del dominio de expresión del gen siendo analizado, se realizó la siguiente operación:

Densidad integrada del gen X

$$= \left(\frac{\text{Densidad integrada del dominio}}{\text{Área del dominio}} \right) - \left(\frac{\text{Densidad integrada del blanco}}{\text{Área del blanco}} \right)$$

Una vez obtenidos los datos se realizó el análisis estadístico U de Mann-Whitney (prueba de t de Student no paramétrica) con la finalidad de verificar si las diferencias observadas entre los distintos genotipos en la intensidad de expresión de los genes del MHB era significativa. En todos los análisis se consideró una $P < 0.05$ como diferencia significativa.

Para analizar la circularidad de los dominios de expresión de los genes evaluados por hibridación *in situ* se utilizó el programa Arlen 1.0, aplicación desarrollada por el M. en I. Gersaín Barrón Velázquez, adscrito a la Facultad de Ingeniería de la UNAM. La aplicación es una compilación de varias técnicas de procesamiento de imagen y programación orientada a objetos usando la paquetería OpenCV. Los datos obtenidos de la segmentación manual del área deseada están dados en píxeles.

El coeficiente de circularidad cuantifica la diferencia entre el dominio seleccionado y un círculo teórico. Este coeficiente puede ser calculado por medio de la ecuación:

$$c := 4 \cdot \pi \cdot \frac{|A|}{P^2}$$

Dónde:

- **A**: Área proyectada
- **P**: Perímetro

El coeficiente de circularidad es adimensional y tiene valores entre 1 y 0. La circularidad se aproxima a 1 en objetos redondeados y es cercana al 0 en objetos muy alargados.

Nuevamente se realizó el análisis estadístico U de Mann-Whitney para evaluar si las diferencias observadas en la circularidad de los dominios de expresión genes del MHB entre los distintos genotipos era significativa. En todos los análisis se consideró una $P < 0.05$ como diferencia significativa.

7.10 Inmunofluorescencia de embrión completo

Se extrajeron los embriones con el protocolo previamente mencionado y se fijaron con PFA al 4% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron tres lavados de 10 minutos con PBS.

Todas las incubaciones y lavados se realizaron con agitación. Primero se permeabilizaron los embriones con Tritón X-100 al 0.5% en PBS por 15 minutos. Posteriormente se hicieron tres lavados de 10 minutos con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Se bloqueó con BSA al 5% (Roche 10735086001) en PBS con Tritón X-100 al 0.1% por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Se hicieron 3 lavados de 20 minutos con Tritón X-100 al 0.5% en PBS. Los anticuerpos secundarios se incubaron en solución de bloqueo por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 20 minutos con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Se tiñeron los núcleos con 1 mg/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes H1399) diluido 1:1000 en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente se hicieron tres lavados de 20 minutos con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Los embriones fueron montados en portaobjetos utilizando Vectashield (Vector H-1000).

Se utilizó a la Fosfo Histona H3 como marcador de células en proliferación y a la Caspasa 3 activa como marcador de muerte celular. Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron:

- Anticuerpos primarios
 - Fosfo Histona H3, 1:100 (Conejo; Cell Signaling 9701)
 - Caspasa 3 activa, 1:1000 (Conejo; Cell Signaling 96615)
- Anticuerpos secundarios
 - Alexa Fluor 488 Chicken anti Rabbit 1:500 (Invitrogen A21441)

El anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 tiene una longitud de onda de excitación máxima de 490 nm y una longitud de onda de emisión máxima de 519 nm. Las células positivas a PHH3 o Cas-3 se observan en verde en las inmunofluorescencias.

7.11 Cuantificación de células fosfo Histona H3 positivas (PHH3)

Las fotografías de las inmunofluorescencias de embrión completo fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss de la Unidad de Imagenología del IFC con el apoyo de la Dra. Yazmín Ramiro Cortés y del Biol. Gerardo Rodrigo Perera Murcia. Se tomaron proyecciones en Z del neuroepitelio cefálico en la región del MHB con un grosor de 5 μ m por cada corte óptico.

Las imágenes posteriormente fueron analizadas con el programa FIJI. Se contaron las células fosfo Histona H3 positivas con la extensión del programa Cell Counter en cada corte óptico y se midió el área del

neuroepitelio en pixeles en el mismo corte. Con la escala de las fotografías se hizo la conversión de pixeles a μm^2 y se dividió el número total de células entre el área analizada. El número de células observadas se expresa en términos de células/100 μm de neuroepitelio. Se realizó la prueba de t de Student para evaluar si existían diferencias en los niveles de proliferación entre los genotipos. Se consideró una $P < 0.05$ como diferencia significativa.

8. Resultados

Se evaluó la expresión de los genes *Otx2*, *Pax2*, *Wnt1*, *Fgf8* y *En2* en embriones completos mediante ensayos de hibridación *in situ*.

8.1 La ausencia de PLPP3 disminuye la expresión de *Otx2*

Con la sonda antisentido para *Otx2* se evaluó su expresión en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} alrededor de la etapa de 8s, extraídos en E8.5 (Figura 12). La sonda sentido se utilizó como control negativo y no se observó marca en los embriones utilizados (n=6).

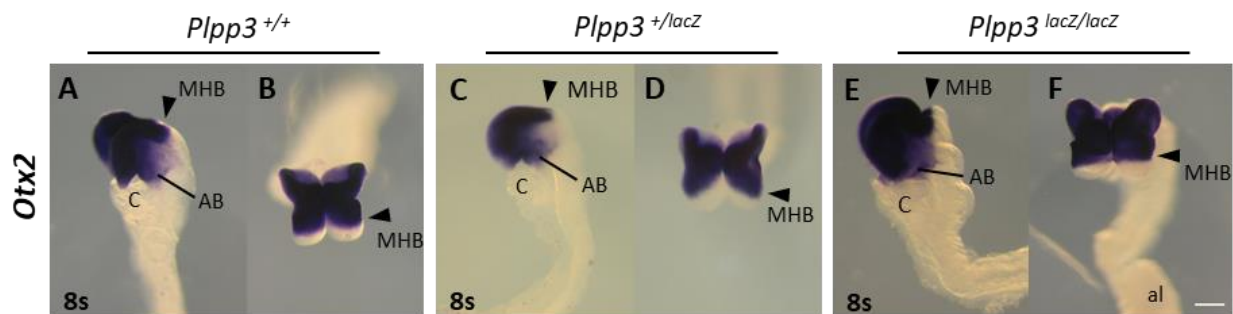


Figura 12. Expresión de *Otx2* en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} en 8 somitas (8s). Imágenes muestran vista lateral (A, C, E) y dorsal (B, D, F) del dominio de expresión de *Otx2* en el prosencéfalo, el mesencéfalo y en el primer arco branquial. Puntas de flecha muestran la ubicación del MHB. *Plpp3*^{+/+} (n=12), *Plpp3*^{+/lacZ} (n=9) y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} (n=13). AB; arco branquial. al; alantoides. C; corazón. Barra de escala: 200 μm .

Todos los embriones *Plpp3*^{+/+} (n=12) presentaron expresión de *Otx2* en la región de los pliegues neurales anteriores, correspondientes al prosencéfalo y al mesencéfalo y en el primer arco branquial (Figura 12A, B). El límite caudal del dominio de expresión mostró una frontera bien definida que marca la frontera del mesencéfalo y el inicio del romboencéfalo (Figura 12B).

Los embriones *Plpp3*^{+/lacZ} (n=9) no mostraron variaciones en dominio ni en los niveles de expresión de *Otx2* con respecto a los embriones silvestres (Figura 12C, D). Se observó señal en la región anterior de los pliegues neurales con una frontera bien marcada en el límite caudal del mesencéfalo y también se encontró la expresión de *Otx2* en el primer arco branquial.

En el caso de los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$, 11/13 embriones presentaron una expresión normal de $Otx2$ en los pliegues neurales anteriores. Aunque el dominio pareció ser un poco más corto en dirección anteroposterior a comparación del dominio en los embriones $Plpp3^{+/+}$ y $Plpp3^{+/lacZ}$, esto se debió a que la morfología de la región cefálica en los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ se encuentra afectada, ya que los pliegues son irregulares y más pequeños (Figura 12E). La frontera caudal del dominio de expresión de $Otx2$ en el mesencéfalo se encontró bien definida y no presentó recorrimientos rostrales ni caudales en ningún embrión (Figura 12F). La expresión de $Otx2$ en el primer arco branquial también se observó en los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ (Figura 12E).

Aun cuando a simple vista no se apreció una diferencia en los niveles de expresión entre los genotipos, el análisis de la densidad integrada del dominio de expresión de $Otx2$ reveló que hay una ligera disminución estadísticamente significativa en su intensidad en embriones $Plpp3^{+/lacZ}$ y $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ en comparación de los embriones silvestres (Figura 13).

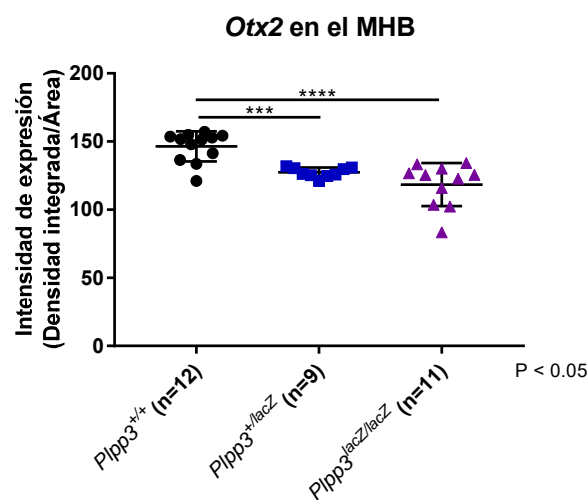


Figura 13. Disminución en la intensidad de la expresión de $Otx2$ en embriones $Plpp3^{+/lacZ}$ y $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de $Otx2$ en el MHB. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). ****= $P < 0.0001$. ***= $P < 0.0007$.

La intensidad promedio de $Otx2$ en embriones de $Plpp3^{+/lacZ}$ es de 127.4 UA y en embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ es de 118.5 UA, mientras que en el control es de 146.4 UA. La prueba estadística de Mann-Whitney reveló que la diferencia de expresión de $Otx2$ en embriones $Plpp3^{+/+}$ y $Plpp3^{+/lacZ}$ es estadísticamente significativa, así como la diferencia entre embriones $Plpp3^{+/+}$ y $Plpp3^{lacZ/lacZ}$.

Estos resultados sugieren que tanto una ausencia parcial como una total en la función de la PLPP3 es suficiente para ocasionar una disminución significativa en los niveles de expresión de $Otx2$ en los pliegues neurales anteriores.

8.2 La ausencia de PLPP3 disminuye la expresión de *Pax2* en el prosencéfalo y en el MHB

La expresión de *Pax2* se evaluó utilizando la sonda antisentido en embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/-lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (Figura 14). La sonda sentido se utilizó como control negativo y no se observó señal en ninguno de los embriones tratados (n=6).

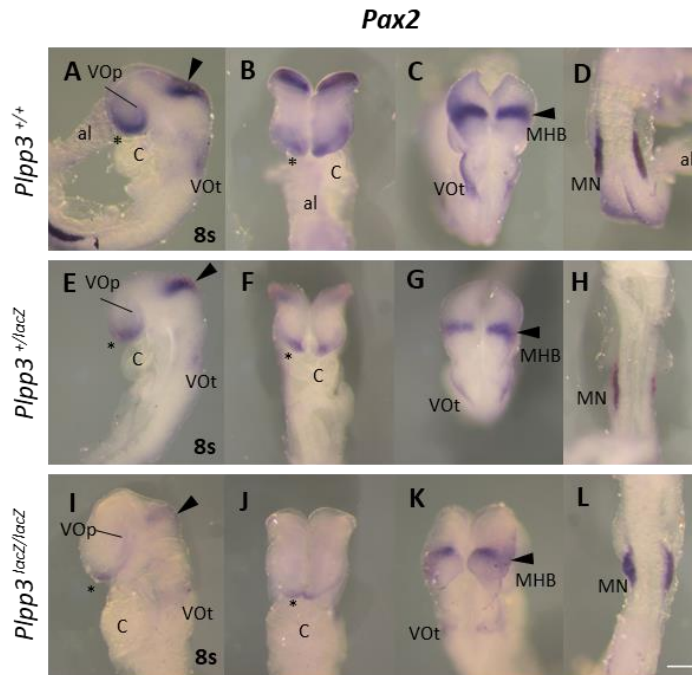


Figura 14. Expresión de *Pax2* en embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/-lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en el estadio de 8s. Imágenes muestran vista lateral (A, E, I), ventral (B, F, J) y dorsal (C, D, G, H, K, L) de los dominios de expresión de *Pax2*. Se observa expresión de *Pax2* en los pliegues neurales anteriores del prosencéfalo (*), en la vesícula óptica, en la región del MHB, en la vesícula óptica y en los ductos mesonefricos. Puntas de flecha muestran la ubicación del MHB. *Plpp3^{+/+}* (n=18), *Plpp3^{+/-lacZ}* (n=12) y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (n=10). al: alantoides; C: corazón; MN: mesonefros; VOp: Vesícula Óptica; VOt: Vesícula Ótica. Barra de escala: 200µm.

En los embriones *Plpp3^{+/+}* (n=18) se observaron los dominios de expresión de *Pax2* previamente descritos para E8.5 (Figura 14). En los embriones *Plpp3^{+/+}* se encontró expresión en el borde lateral de los pliegues neurales del prosencéfalo (Figura 14A, B). En esta región también se observó expresión de *Pax2* en la futura vesícula óptica (Figura 14A). En el MHB se observó una banda de expresión que abarcó la porción caudal del mesencéfalo y la porción anterior del romboencéfalo (Figura 14C). En una posición más caudal se observó expresión de *Pax2* en la región de los pliegues neurales que dará origen a la vesícula ótica (Figura 14C). Por último, se observó expresión de *Pax2* en dos dominios paralelos en el mesodermo lateral en la región caudal que conforma al mesonefros (Figura 14D).

Los embriones $Plpp3^{+/lacZ}$ (n=12) también presentaron los dominios de expresión de $Pax2$ reportados (Figura 14E-H) y no mostraron variaciones en la intensidad, la ubicación ni el patrón con respecto a los embriones silvestres.

A diferencia de los embriones $Plpp3^{+/lacZ}$, los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ mostraron diferencias en la expresión de $Pax2$ en la región cefálica al comparar su intensidad con la intensidad en embriones $Plpp3^{+/+}$. En el prosencéfalo anterior se observó una disminución considerable en la intensidad y en el dominio de expresión de $Pax2$ (Figura 14I, K).

El análisis de la densidad integrada de este dominio reveló que la intensidad promedio de $Pax2$ en embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ fue de 42.9 UA, mientras que en los embriones $Plpp3^{+/+}$ fue de 68.3 UA. La diferencia en intensidades entre ambos genotipos fue significativa estadísticamente de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney (Figura 15).

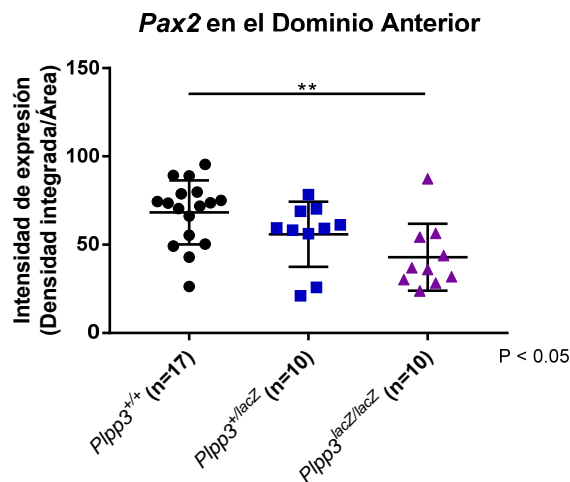


Figura 15. Disminución en la intensidad de la expresión de $Pax2$ en el prosencéfalo de embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de $Pax2$ en el dominio del prosencéfalo. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). **= $P < 0.0047$.

En la región del MHB la banda del dominio de expresión de $Pax2$ también se observó más tenue y más delgada en embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ que en los embriones control (Figura 14K). Al analizar la densidad integrada de este dominio, el promedio en embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ fue de 51.94 UA (n=9), mientras que el de los embriones $Plpp3^{+/+}$ fue de 67.12 UA (n=16) y en embriones $Plpp3^{+/lacZ}$ fue de 70.54 UA (n=12). La prueba de Mann-Whitney reveló que la diferencia de expresión de $Pax2$ en el MHB de embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ es significativamente menor a la expresión en embriones $Plpp3^{+/+}$ y $Plpp3^{+/lacZ}$ (Figura 16).

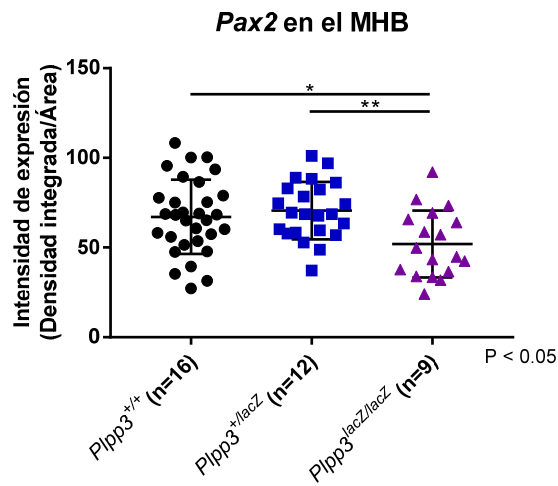


Figura 16. Disminución en la intensidad de la expresión de Pax2 en el MHB de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de Pax2 en el dominio del MHB. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). * = $P < 0.0175$. ** = $P < 0.0027$.

En la región de la vesícula ótica el dominio mostró variabilidad entre los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* evaluados. En dos de ellos parece tener la intensidad y morfología observada en los controles, en cuatro embriones se mostró más tenue y condensado y finalmente en tres la tinción fue casi ausente (Figura 14K).

Por último, la expresión de Pax2 en el mesonefros no se vio afectada en los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (n=10), tanto en la extensión y morfología del dominio como en la intensidad de expresión (Figura 14L y Figura 17).

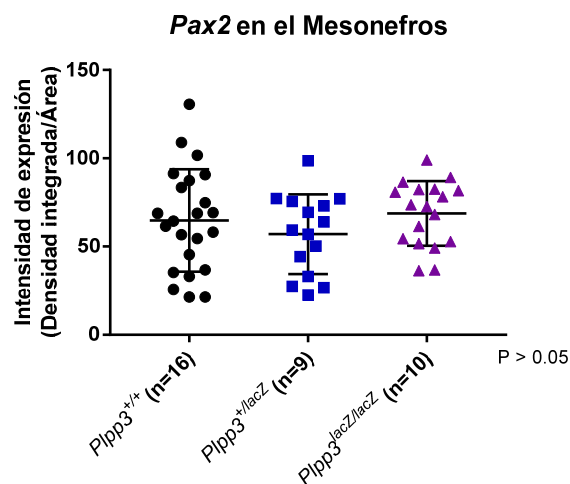


Figura 17. No existen diferencias en la intensidad de la expresión de Pax2 en el mesonefros de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de Pax2 en el dominio del mesonefros. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error).

La expresión de *Pax2* en este dominio se consideró como un control interno dentro de los mismos embriones analizados para la intensidad de expresión del gen en el prosencéfalo y el MHB. Ya que todos los dominios en el embrión fueron expuestos a los mismos factores durante la hibridación, podemos concluir que las diferencias en la intensidad de *Pax2* en la región cefálica del embrión no son un artefacto del protocolo y son ocasionadas por la falta de la PLPP3.

8.3 La ausencia de PLPP3 produce un aumento en la expresión de *Wnt1* en el MHB

La expresión de *Wnt1* se evaluó utilizando la sonda antisentido en embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (Figura 18). La sonda sentido se utilizó como control negativo y no se observó señal en los embriones (n=6).

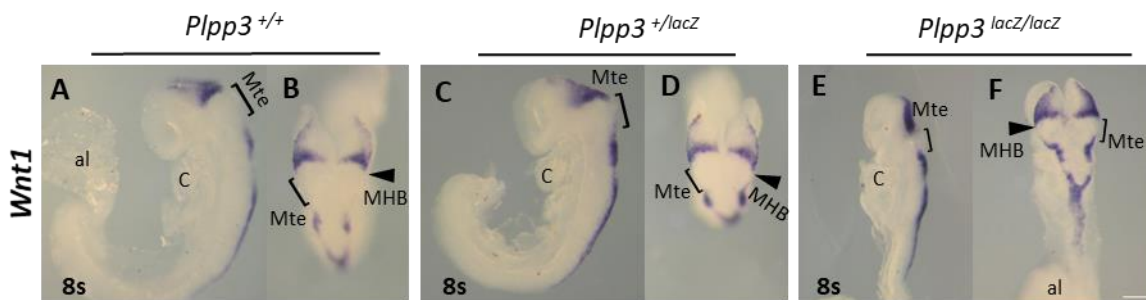


Figura 18. Expresión de *Wnt1* en embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en el estadio de 8s. Imágenes muestran vista lateral (A, C, E) y dorsal (B, D, F) de los dominios de expresión de *Wnt1*. Se observa expresión de *Wnt1* en los bordes laterales de los pliegues neurales mesencefálicos, en la frontera anterior del MHB, en los bordes laterales de los pliegues neurales del romboencéfalo y en la línea media dorsal del tubo neural. No se observa señal en los pliegues neurales del metencéfalo. Puntas de flecha muestran la ubicación del MHB. *Plpp3^{+/+}* (n=27), *Plpp3^{+/lacZ}* (n=15) y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (n=20). al: alantoides; C: corazón; Mte: metencéfalo. Barra de escala: 200µm.

En los embriones *Plpp3^{+/+}* (n=27) se observaron los dominios de expresión de *Wnt1* previamente descritos para E8.5 (Figura 18). Se observaron dominios de expresión en el borde lateral de los pliegues neurales del mesencéfalo y en su borde caudal (Figura 18B). En este dominio el patrón de expresión asemeja a un triángulo con la base en el extremo lateral y los vértices extendiéndose hacia el surco neural en la línea media. La expresión de *Wnt1* se observó también en los bordes laterales de los pliegues neurales del romboencéfalo posterior y se mostró como una línea continua en donde los pliegues se fusionaron y ahora forman la línea dorsal del tubo neural (Figura 18A). En el borde lateral de los pliegues neurales del romboencéfalo anterior, el cual corresponde al r1, no se observó expresión de *Wnt1*.

En los embriones *Plpp3^{+/lacZ}* (n=15) se observaron los mismos dominios de expresión para *Wnt1* que se encontraron en los embriones silvestres (Figura 18C, D). No se observaron diferencias en la posición, el patrón o la intensidad de expresión de los dominios en este genotipo.

En los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ (n=20) por otra parte, se observaron diferencias en los niveles de expresión de $Wnt1$. La expresión de $Wnt1$ en el MHB fue más intensa que la expresión en los embriones $Plpp3^{+/+}$ y $Plpp3^{+/lacZ}$ (n=6/20). En los bordes laterales del mesencéfalo de algunos embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ (n=12/20) la expresión de $Wnt1$ pareció también ser aún más intensa y con un dominio más ancho que la observada en los embriones control (Figura 18F).

El dominio negativo a la expresión de $Wnt1$ en el romboencéfalo, correspondiente al r1, se vio modificado en algunos de los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ (n=4/20), ya que su extensión parecía reducida (Figura 18E). Esta reducción parece estar causada por un acortamiento de esta región del neuroepitelio y no por un recorrimiento caudal del dominio de expresión de $Wnt1$.

Finalmente, la extensión de la expresión de $Wnt1$ en la línea dorsal del tubo neural en embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ también parece ser más corta que la observada en embriones control (Figura 18F), pero estas diferencias pudieron haber sido ocasionadas de igual manera por un acortamiento global del eje anteroposterior de estos embriones, producido por la ausencia de la PLPP3.

El análisis de la densidad integrada del dominio de expresión de $Wnt1$ en el MHB reveló que el promedio de intensidad en embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ es de 60.93 UA, mientras que el de los embriones $Plpp3^{+/+}$ es de 34.84 UA y el de los embriones $Plpp3^{+/lacZ}$ de 37.94 UA. La prueba estadística de Mann-Whitney reveló que la diferencia de expresión de $Wnt1$ en el MHB observada entre los genotipos es estadísticamente significativa (Figura 19).

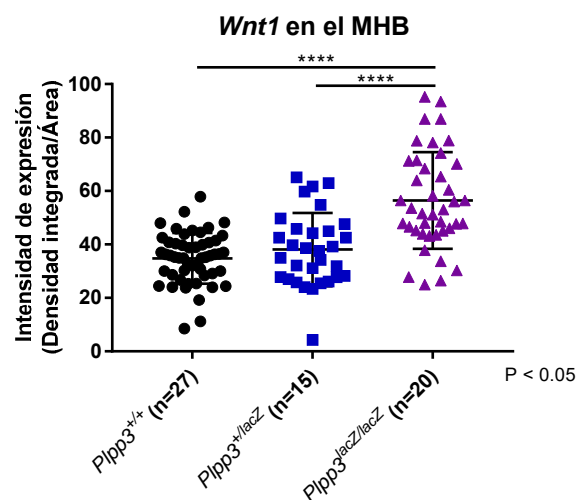


Figura 19. Existe un aumento en la intensidad de la expresión de $Wnt1$ en el MHB de embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de $Wnt1$ en el dominio del MHB. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). ****= $P < 0.0001$.

8.4 La ausencia de PLPP3 aumenta la expresión de *Fgf8* en el ANR y en el MHB

La expresión de *Fgf8* se detectó utilizando la sonda antisentido en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} (Figura 21). La sonda sentido se utilizó como control negativo y no se observó señal en los embriones tratados (n=6).

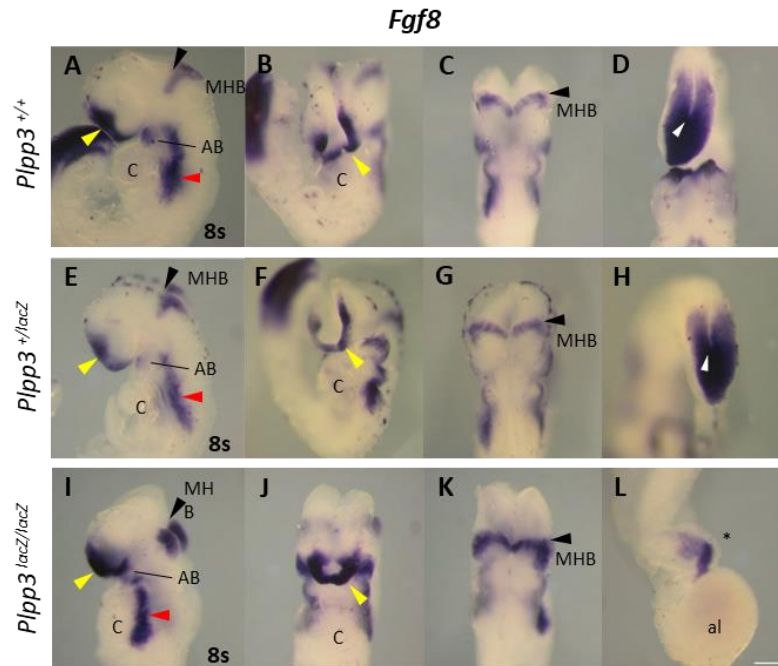


Figura 20. Expresión de *Fgf8* en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} en el estadio de 8s. Imágenes muestran vista lateral (A, E, I), ventral (B, F, J) y dorsal (C, D, G, H, K, L) de los dominios de expresión de *Fgf8*. Vista lateral muestra la expresión de *Fgf8* en los pliegues neurales anteriores del prosencéfalo (punta de flecha amarilla), en la frontera caudal del MHB, en el primer arco branquial en desarrollo y en la región faríngea (punta de flecha roja). Vista ventral muestra la expresión de *Fgf8* a lo largo de los pliegues neurales anteriores del prosencéfalo (punta de flecha amarilla). Vista dorsal muestra el dominio de *Fgf8* en la frontera rostral del romboencéfalo. D, H y L muestran la expresión de *Fgf8* en la región más caudal de los pliegues neurales. Este dominio presenta malformaciones severas en embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ} por defectos en la gastrulación (*). Punta de flecha blanca en D y H muestra reminiscencia del surco primitivo. Punta de flecha negra marca la posición del MHB. *Plpp3*^{+/+} (n=23), *Plpp3*^{+/lacZ} (n=18) y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} (n=19). AB: arco branquial; al: alantoides; C: corazón. Barra de escala: 200µm.

En los embriones *Plpp3*^{+/+} (n=23) se observaron los dominios de expresión de *Fgf8* ya descritos para la etapa que fue evaluada (Figura 21). Se encontró expresión en el borde más rostral de los pliegues neurales del prosencéfalo, delineando la cresta de los pliegues neurales y con una ligera extensión triangular hacia la pared lateral de los pliegues, hacia la vesícula óptica (Figura 20A, B). A la altura del corazón *Fgf8* se expresa en dos líneas verticales en ambos costados del embrión, en los futuros arcos branquiales y en el primer arco branquial en desarrollo (Figura 20A). En la región del MHB se observó expresión de *Fgf8* en una banda delgada en el borde anterior del romboencéfalo (Figura 20C). Finalmente, *Fgf8* también se

observó en el MHB y en los pliegues neurales caudales donde se encuentra la reminiscencia del surco primitivo (Figura 20D).

En los embriones $Plpp3^{+/lacZ}$ (n=18) se observaron los mismos dominios de expresión de $Fgf8$ que se observaron en los embriones silvestres (Figura 20E-H). La extensión de los dominios y la intensidad de la expresión no mostró variaciones.

En los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ se observaron los cuatro dominios de expresión vistos en los genotipos anteriores (n=19), sin embargo, en estos embriones se pudieron observar variaciones en la intensidad de la expresión de $Fgf8$ y en la morfología de sus dominios (Figura 20I-L).

En la cresta neural anterior (ANR) de algunos de los embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ el dominio de $Fgf8$ parece estar compactado hacia la región anterior de los pliegues (n=8/19). No se observó la misma extensión triangular focalizada en la pared lateral del pliegue, en cambio el dominio presentó una forma semicircular, abarcando una mayor extensión de la pared lateral del prosencéfalo que los controles (n=5/19).

Se realizó un análisis de circularidad para evaluar la morfología del dominio de $Fgf8$ en el ANR. El análisis reveló que el dominio de $Fgf8$ en el prosencéfalo de embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ es más redondeado que en los embriones $Plpp3^{+/+}$ y $Plpp3^{+/lacZ}$ y esta diferencia es estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney (Figura 21).

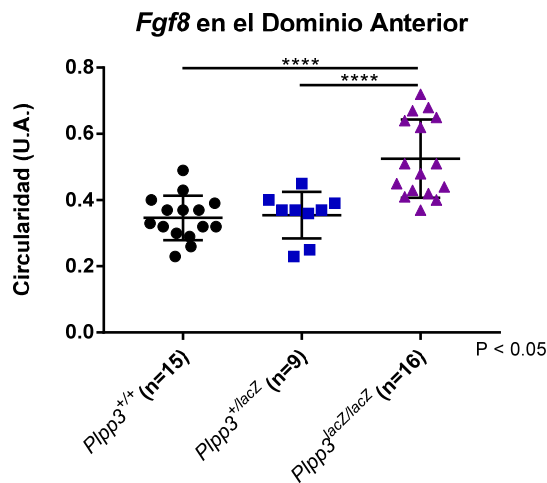


Figura 21. Existe una compactación en la extensión del dominio de expresión de $Fgf8$ en el prosencéfalo de embriones $Plpp3^{lacZ/lacZ}$ en 8s. Gráfica del análisis del índice de circularidad del dominio de expresión de $Fgf8$ en prosencéfalo. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). ****= P< 0.0001.

A demás de la compactación del dominio en el prosencéfalo, la expresión de *Fgf8* parece ser más intensa en esta región en los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* que en los embriones de los otros dos genotipos (n=5/19) (Figura 20J).

El análisis de la densidad integrada de este dominio reveló que la intensidad promedio de expresión de *Fgf8* en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* fue de 42.4 UA, en embriones *Plpp3^{+/+}* fue de 27.5 y en embriones *Plpp3^{+/lacZ}* 30.9 UA. La prueba de Mann-Whitney demostró que la diferencia de expresión entre los embriones *Plpp3^{+/+}* y *Plpp3^{+/lacZ}* fue estadísticamente significativa (Figura 22).

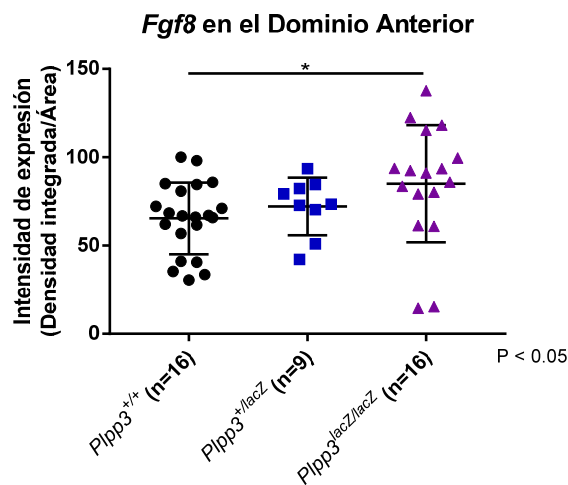


Figura 22. Existe un aumento en la intensidad de la expresión de *Fgf8* en el prosencéfalo de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de *Fgf8* en el dominio del prosencéfalo. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). * = $P < 0.0207$.

En el MHB, todos los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* presentaron el dominio de expresión de *Fgf8* en el romboencéfalo anterior (Figura 20C). En algunos embriones, el dominio tenía una intensidad de señal visiblemente mayor a la de los embriones *Plpp3^{+/+}* y *Plpp3^{+/lacZ}* (n=3/19).

El análisis de la densidad integrada del dominio de expresión de *Fgf8* en el MHB de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* reveló que la intensidad de expresión es mayor a la expresión en los embriones control y la prueba de Mann-Whitney reveló que esta diferencia entre los genotipos es estadísticamente significativa (Figura 23).

El dominio de expresión más afectado en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* fue el dominio en el extremo caudal del embrión. En esta región la ausencia de la PLPP3 ocasiona el arresto de la gastrulación en etapas tempranas y el embrión sufre defectos en su morfología, como un acortamiento en el eje anteroposterior y protrusiones anormales de tejido. En los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* solamente se observó la reminiscencia del surco primitivo en 4 embriones, en los demás embriones esta estructura no se pudo identificar, así como

el surco neural y los pliegues neurales. No obstante, los defectos en la morfología no ocasionaron la pérdida de expresión de *Fgf8* ya que a pesar de las malformaciones en el dominio todavía se observó marca en el tejido (n=16).

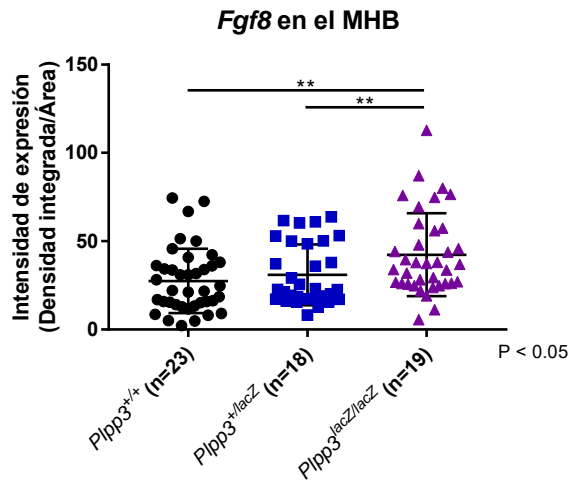


Figura 23. Existe un aumento significativo en la intensidad de la expresión de *Fgf8* en el MHB de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de *Fgf8* en el dominio del MHB. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). **= P < 0.0020. **= P < 0.0096.

Aun cuando se observó expresión de *Fgf8* en el dominio caudal en etapas posteriores a su inducción, el análisis de densidad integrada y la prueba de Mann-Whitney revelaron que hay una disminución significativa en la intensidad de expresión de *Fgf8* en el dominio caudal de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* al compararlos con embriones silvestres (Figura 24).

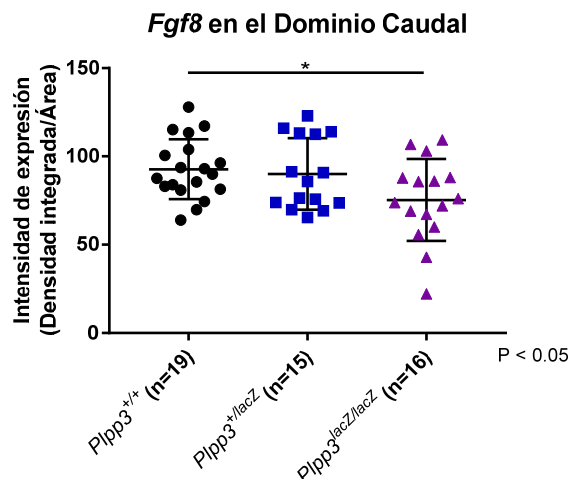


Figura 24. Disminución en la intensidad de la expresión de *Fgf8* en la región caudal de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en 8s. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de *Fgf8* en el primordio de la cola. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). *= P < 0.0314.

La disminución en la intensidad de expresión de *Fgf8* en el dominio caudal podría ser ocasionada por los defectos en la morfología caudal ocasionados por el arresto de la gastrulación de esta zona en ausencia de la PLPP3. Este arresto ocasiona una subsecuente reducción en el grosor y la extensión del tejido en esta región, probablemente resultando en la reducción de la expresión de *Fgf8* también.

8.5 La ausencia de PLPP3 no afecta los niveles de expresión de *En2*

Con la sonda antisentido para *En2* se detectó su expresión en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} (Figura 25) La sonda sentido se utilizó como control negativo y no se observó marca en los embriones hibridados con esta sonda (n=6).

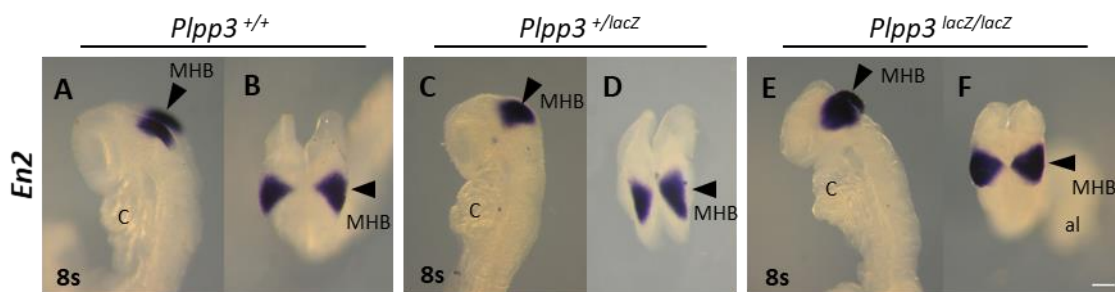


Figura 25. Expresión de *En2* en embriones *Plpp3*^{+/+}, *Plpp3*^{+/lacZ} y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} en el estadio de 8s. Imágenes muestran vista lateral (A, C, E), y dorsal (B, D, F) del dominio de expresión de *En2*. Se observa expresión de *En2* en los pliegues neurales en la región del MHB, abarcando al mesencéfalo posterior y al metencéfalo. Puntas de flecha muestran la ubicación del MHB. *Plpp3*^{+/+} (n=12), *Plpp3*^{+/lacZ} (n=12) y *Plpp3*^{lacZ/lacZ} (n=11). al; alantoides. C; corazón. Barra de escala: 200µm.

Todos los embriones *Plpp3*^{+/+} (n=10) presentaron en el MHB expresión de *En2* en la región de los pliegues neurales correspondiente al mesencéfalo posterior y al r1 en el romboencéfalo anterior (Figura 25A). El dominio se muestra como un triángulo en ambos pliegues con la base en el borde lateral y el vértice en el surco neural en la línea media del embrión (Figura 25B). El límite caudal y el límite anterior del dominio de expresión mostraron una frontera bien definida. En los embriones *Plpp3*^{+/lacZ} (n=12) se observó también el dominio de *En2* con la misma morfología, ubicación e intensidad de expresión que el observado en embriones silvestres (Figura 25C, D).

En los embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ} (n=11) se observó el dominio de *En2* con la misma ubicación e intensidad que el dominio de los embriones *Plpp3*^{+/+} y *Plpp3*^{+/lacZ} (Figura 25E, F). El límite caudal y el límite anterior del dominio de expresión mostraron fronteras bien definidas y el patrón triangular en todos los embriones (Figura 25F). El análisis de la densidad integrada del dominio de expresión de *En2* demostró que la intensidad de expresión de este gen no presenta variaciones en los embriones de los 3 genotipos (Figura 26).

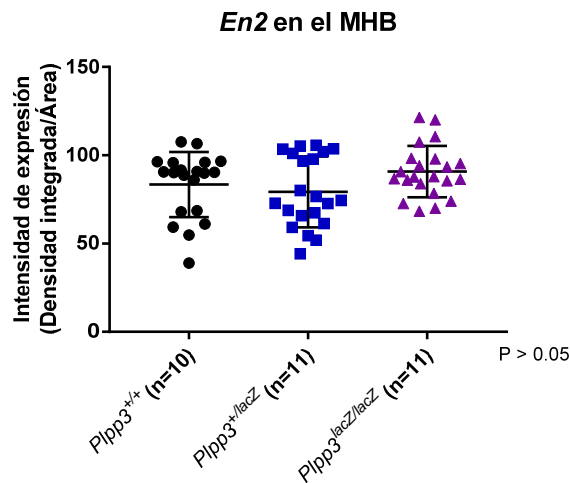


Figura 26. No existen diferencias en la intensidad de la expresión de *En2* en el MHB de embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ} en 8s a comparación de embriones control. Gráfica del análisis de la intensidad de expresión de *En2* en el dominio del MHB. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error).

Por otra parte, cuando se observó el embrión desde un ángulo lateral, se encontró que la morfología del dominio parecía modificada. El dominio presenta una compactación en el eje anteroposterior, lo que hace que el dominio aparente ser más corto que el dominio de *En2* en embriones que se *Plpp3*^{+/+} y *Plpp3*^{+/lacZ} (Figura 25E). El análisis de circularidad y la prueba de Mann-Whitney reveló que el dominio de *En2* en el MHB de embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ} es significativamente más redondeado que en los embriones *Plpp3*^{+/+} y *Plpp3*^{+/lacZ} (Figura 27).

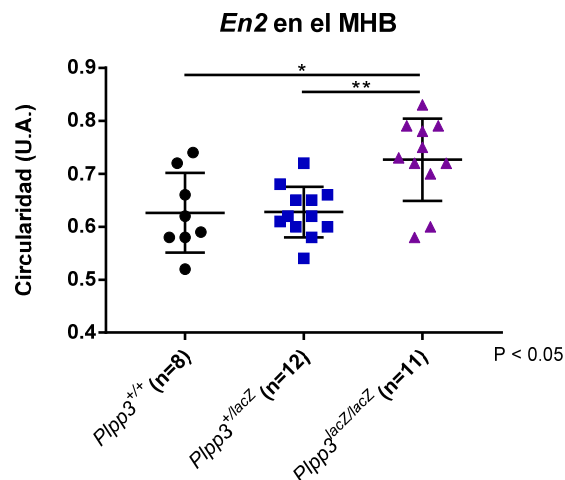


Figura 27. Existe una compactación significativa en el dominio de expresión de *En2* en el MHB de embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ} en 8s. Gráfica del análisis del índice de circularidad del dominio de expresión de *En2* en el MHB. Se muestran los valores y la media \pm desviación estándar (barras de error). * = $P < 0.0194$. ** = $P < 0.0049$.

La compactación del dominio en los embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ} se debe a que la morfología de los pliegues neurales presentó ondulaciones y surcos que no se observaron en los embriones de los otros dos genotipos

(Figura 28). Estos surcos estereotípicos parecen aparecer en el neuroepitelio justo en la frontera anterior y posterior del dominio de *En2*. No se observó algún surco que atravesara por el centro de este el dominio.

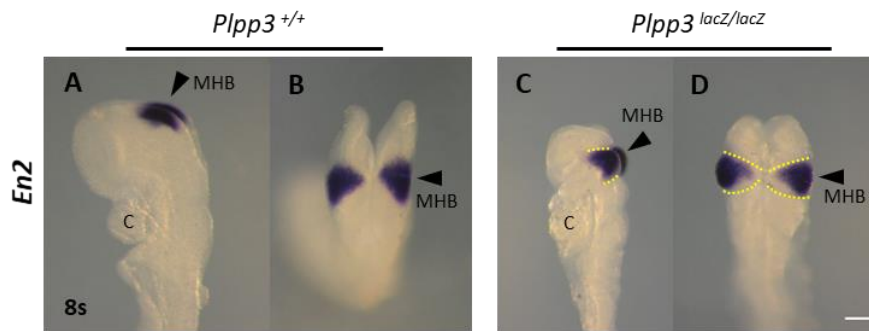


Figura 28. Existen surcos estereotípicos que flanquean al dominio de expresión de *En2* en el MHB de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* en 8s. Vista lateral y dorsal de embriones *Plpp3^{+/+}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}*. Líneas punteadas en amarillo denotan la posición y extensión de los surcos en el neuroepitelio de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}*. Puntas de flecha muestran la posición del MHB. *Plpp3^{+/+}* (n=12) y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (n=11). C; corazón. Barra de escala: 200µm.

Estos surcos estereotípicos podrían estar ocasionados por una disminución focalizada en la proliferación celular del neuroepitelio o en un aumento significativo en los índices de muerte celular, por lo que se evaluaron los niveles de muerte y proliferación en embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}*.

8.6 Análisis de proliferación

Para evaluar los índices de proliferación en el neuroepitelio alrededor de la etapa de 8s se realizaron inmunofluorescencias contra la proteína Histona H3 fosforilada (PHH3 por sus siglas en inglés). La PHH3 es una proteína de unión al DNA que sirve como marcador de células mitóticamente activas, específicamente aquellas en donde los cromosomas comienzan a condensarse y están por entrar a la profase y se sostiene hasta la anafase (Hendzel *et al.*, 1997).

Lo que se observó en los embriones tratados con el anticuerpo primario fueron células positivas a PHH3 en el neuroepitelio de los genotipos evaluados (Figura 29). Los embriones control que fueron tratados únicamente con anticuerpo secundario no mostraron marca.

Los embriones *Plpp3^{+/+}* (n=3), y *Plpp3^{+/lacZ}* (n=2) presentaron un neuroepitelio con una superficie lisa. Además, las células PHH3 positivas se encontraron uniformemente distribuidas en toda la superficie del tejido (Figura 29A-F). En el caso de los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (n=3), a pesar de que se observaron los surcos estereotípicos en el neuroepitelio (n=2/3), también se observó aproximadamente el mismo número de células PHH3 positivas y con la misma distribución (Figura 29G-I).

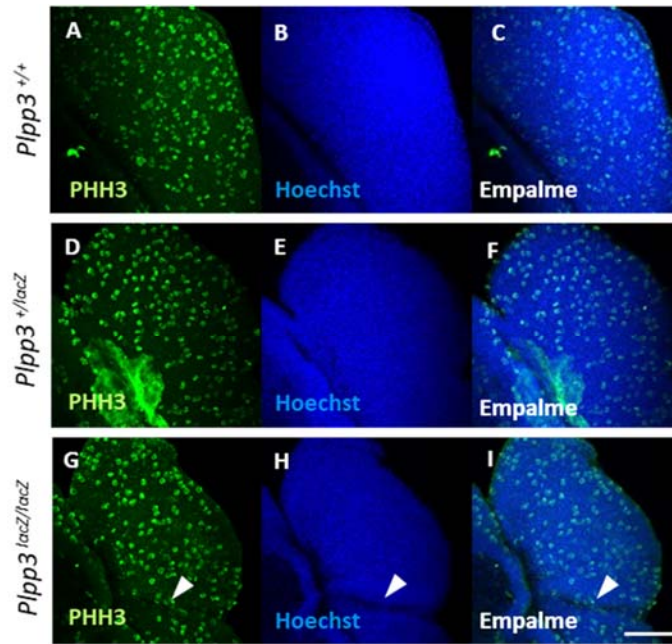


Figura 29. Los surcos estereotípicos en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* no parece estar ocasionados por una disminución en la proliferación del neuroepitelio alrededor de la etapa de 8s. Imágenes muestran proyecciones en Z de la vista dorsal de embriones *Plpp3^{+/+}*, *Plpp3^{+/-lacZ}* y *Plpp3^{lacZ/lacZ}*. En verde se observan las células positivas para PHH3. Hoechst marca núcleos en azul. Punta de flecha blanca marca surcos estereotípicos en el neuroepitelio. *Plpp3^{+/+}* (n=3), *Plpp3^{+/-lacZ}* (n=2) y *Plpp3^{lacZ/lacZ}* (n=3). Barra de escala: 100µm.

La cuantificación del número de células observadas por cada 100 µm² de neuroepitelio reveló que hay una disminución significativa en las células PHH3 positivas en ausencia de la PLPP3. Mientras que en los embriones *Plpp3^{+/+}* se observó un número promedio de 6 células/100 µm², en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* se observaron 3 células/100 µm² (Figura 30).

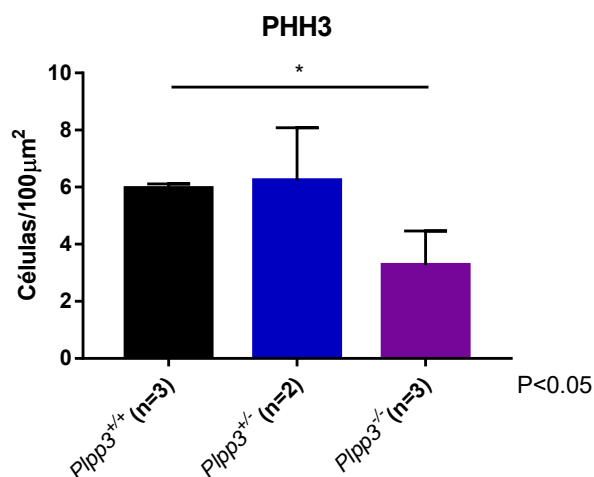


Figura 30. Cuantificación de células PHH3 en el neuroepitelio de la región del MHB de embriones en 8s. Gráfica del análisis del número de células positivas a la marca de PHH3 por µm² de neuroepitelio a la altura del MHB. Se muestran los valores y la media ± desviación estándar (barras de error). * = P < 0.0341.

Aun cuando hay una disminución en el número de células en proliferación, no se observó una disminución focalizada alrededor de los surcos estereotípicos, sino que la disminución fue global en todo el grosor del tejido. Esto indica que la morfología anormal del neuroepitelio en ausencia de la PLPP3 no es a consecuencia de la disminución de la proliferación celular en la región del MHB.

8.7 Análisis de muerte celular

Ya que una disminución focalizada en la proliferación del neuroepitelio no explica la aparición de los surcos estereotípicos, se quiso evaluar los niveles de muerte celular mediante inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo primario dirigido contra la forma activa de la proteína Caspasa-3 (Cas-3). La Cas-3 es una proteasa considerada como una de las ejecutantes de la cascada de muerte celular por su actividad proteolítica y marca que una célula está en apoptosis (Nicholson y Thornberry, 1997).

Las inmunofluorescencias utilizando el anticuerpo primario mostraron dominios en neuroepitelio que presentaban células positivas a la Cas-3 (Figura 31). Los embriones control que fueron únicamente tratados con anticuerpo secundario no mostraron marca verde.

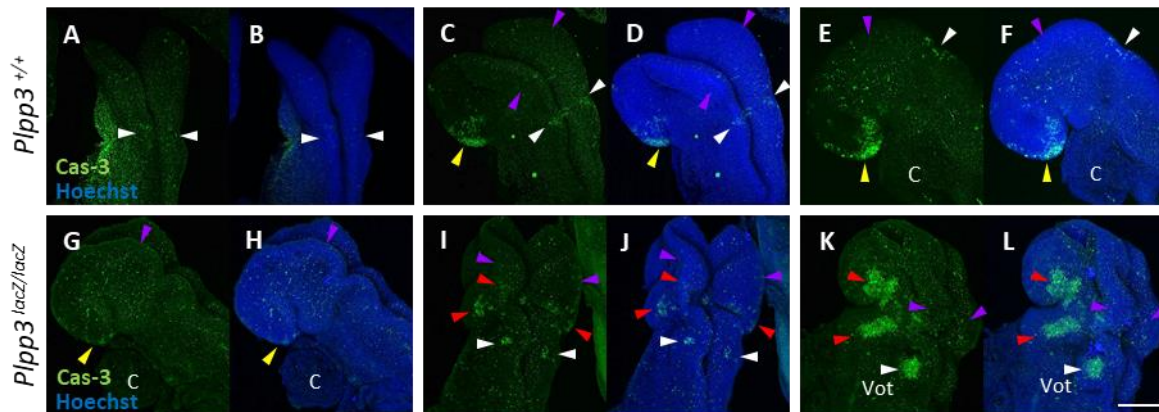


Figura 31. Los surcos estereotípicos en embriones $P1pp3^{lacZ/lacZ}$ no parece estar ocasionados por un aumento en la muerte celular del neuroepitelio alrededor de la etapa de 8s. Vista lateral y dorsal de embriones $P1pp3^{+/+}$ y $P1pp3^{lacZ/lacZ}$. Puntas de flecha moradas muestran la posición aproximada del MHB. Puntas de flecha blancas muestran dominio de muerte en el romboencéfalo caudal (A-F, I-L). Puntas de flecha amarillas muestran dominio de muerte en los bordes laterales del prosencéfalo anterior. Puntas de flecha rojas muestran dominios de muerte celular ectópicos en el neuroepitelio y en el ectodermo céfalico en los embriones $P1pp3^{lacZ/lacZ}$. $P1pp3^{+/+}$ (n=7) y $P1pp3^{lacZ/lacZ}$ (n=15). C; corazón. Vot; Vesícula ótica. Barra de escala: 200 μ m.

Los embriones $P1pp3^{+/+}$ (n=7), $P1pp3^{+/lacZ}$ (n=5) y $P1pp3^{lacZ/lacZ}$ (n=15) presentaron en el neuroepitelio dominios de muerte focalizados en la región céfalica (Figura 30). En etapas tempranas en E8.5, existe un dominio de muerte focalizada en los pliegues neurales anteriores del prosencéfalo. Este dominio es visible en los embriones $P1pp3^{+/+}$ y $P1pp3^{lacZ/lacZ}$ (Figura 30A-H). Por otra parte, en etapas un poco más avanzadas

en los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* la muerte celular en este dominio parece inhibida ya que desaparecen casi por completo las células positivas a Cas-3 (Figura 30K, L). En esta etapa también los pliegues ectópicos alrededor de la región del MHB aparecen.

Al analizar los niveles de muerte en los pliegues ectópicos y alrededor de ellos podemos observar que, aun cuando hay un aumento en las células Cas-3 positivas, el aumento en la muerte celular no es significativo como para explicar las anomalías morfológicas (Figura 30I-L).

9. Discusión

Para la realización de este proyecto se utilizó un modelo murino mutante para gen de la fosfatasa PLPP3. La importancia biológica que tiene este modelo es que nos permite evaluar el efecto de la desregulación de la concentración de varios lípidos bioactivos durante el desarrollo embrionario y también en la etapa adulta. En ausencia de PLPP3 el ligando de los receptores para los fosfolípidos se encuentran en exceso y se pueden analizar las consecuencias que tiene la inhibición o la sobreactivación de las vías que estos fosfolípidos estimulan.

En este trabajo se evaluó el papel que tiene la PLPP3 en el establecimiento del MHB y en el mantenimiento de los genes del organizador mediante hibridaciones *in situ*. Se observó que los niveles de expresión de las proteínas morfogenéticas *Wnt1* y *Fgf8* y de los factores transcripcionales *Pax2* y *Otx2* se ven modificados en ausencia de la enzima, mientras que la expresión de *En2* no sufrió ninguna modificación.

La expresión de *Otx2* en los pliegues neurales anteriores disminuyó ligeramente (análisis de densidad integrada) tanto en los embriones *Plpp3^{+ / lacZ}* como en los embriones *Plpp3^{lacZ / lacZ}*. Estos resultados apuntan a que una disminución parcial en la actividad de PLPP3 es suficiente para tener un efecto sobre los niveles de expresión de *Otx2*. No obstante, este efecto no es dependiente de la dosis de PLPP3, ya que su ausencia total en los embriones *Plpp3^{lacZ / lacZ}* no produce un fenotipo más severo que el observado en embriones heterocigos. Aun cuando la disminución de *Otx2* en la región anterior de los embriones fue estadísticamente significativa, no fue lo suficientemente grande para afectar el desarrollo del tubo neural anterior ni la inducción de los demás genes del MHB.

La expresión de *Pax2* en el prosencéfalo y en el MHB de embriones *Plpp3^{lacZ / lacZ}* disminuyó significativamente. Esta disminución necesariamente tiene que llevarse a cabo después de la inducción y establecimiento de la expresión de *En2* y *Fgf8*, ya que estos genes requieren de la presencia de *Pax2* para iniciar su expresión (Song *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2003; Bouchard *et al.*, 2005). En el caso de *En2* no se observaron variaciones en su expresión en embriones *Plpp3^{lacZ / lacZ}* y en el caso de *Fgf8* su

expresión incrementó significativamente. Estos resultados apuntan a que en ausencia de la PLPP3 la expresión de *Pax2* se desregula tiempo después de su encendido y de la inducción de *En2* y *Fgf8* a partir de la etapa de 5s, y que la expresión remanente de *Pax2* podría ser suficiente para el mantenimiento de la expresión de *En2*. Otra posible explicación de la paradójica ausencia de la variación en los niveles de expresión de *En2* en los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* es que *Wnt1* y *Fgf8* también participan en el mantenimiento de la expresión de este factor transcripcional (Bally-Cuif *et al.*, 1992; Crossley *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999), y dado que estos morfógenos se encuentran sobreexpresados en los embriones mutantes, podrían funcionar como factores compensatorios a la disminución de *Pax2*.

Finalmente, como se menciona arriba, se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión *Wnt1* y *Fgf8* en el dominio del MHB en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* al compararlos con embriones *Plpp3^{+/+}*. El aumento en la expresión de ambos morfógenos en este dominio podría explicarse con el asa de retroalimentación positiva que existe entre ambos genes (Lee *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 2003; Wittmann *et al.*, 2009). Por la temporalidad de la inducción de los genes del MHB y el asa de retroalimentación positiva, se puede suponer que la ausencia de PLPP3 ocasiona un aumento en los niveles de expresión de *Wnt1*, los cuales a su vez inducen una mayor expresión de *Fgf8* y éste a su vez promovería el mantenimiento de niveles altos de *Wnt1*.

Los patrones de expresión de los genes del MHB encontrados en este trabajo no fenocopian a los resultados obtenidos cuando se altera la señalización mediada por LPA. Cuando se elimina la actividad de ATX, la expresión de los genes *Fgf8*, *Wnt1* y *Pax2* se altera (Koike *et al.*, 2011); la extensión de los dominios de expresión de *Wnt1* y *Pax2* en el MHB aumenta, pero en el caso de *Pax2* su intensidad disminuye. En el caso de *Fgf8*, su expresión disminuye o se abate casi por completo en el MHB y el ANR (Figura 6 y 32).

Se sabe que la ausencia de la PLPP3 resulta en un aumento significativo en la concentración extracelular del LPA (Escalante-Alcalde *et al.* 2003; Susanto *et al.*, 2017). Este exceso de ligando puede tener dos efectos distintos sobre los LPARs: 1) puede resultar en la sobreactivación de sus vías de señalización, o 2) puede haber desensibilización de receptores, lo que fenocopiaría un escenario donde no hay LPA, como en embriones *Atx^{-/-}*. Dada la extraordinaria similitud entre los fenotipos de los embriones *Atx^{-/-}* y *Plpp3^{-/-}*, inicialmente pensamos que parte del fenotipo de los embriones pudiera deberse a la desensibilización de LPAR's. Sin embargo, ya que los patrones de expresión de marcadores del MHB observados en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* son diferentes a los obtenidos en embriones *Atx^{-/-}*, podemos sugerir que los efectos encontrados en este proyecto no son exclusivamente ocasionados por un evento de desensibilización de

LPARs, sino por un aumento significativo en la señalización mediada por el LPA o una combinación de ambos eventos.

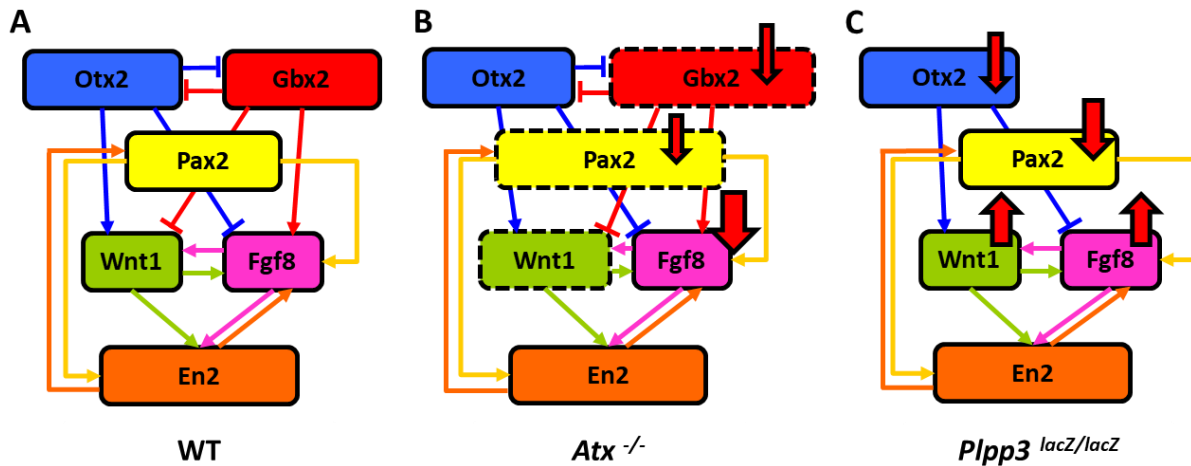


Figura 32. Modelo de los fenotipos observados en el MHB de embriones *Atx*^{-/-} y embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ}. (A) Esquema de las relaciones reguladoras que existen entre los genes del MHB en embriones silvestres. (B) Fenotipo observado en embriones *Atx*^{-/-} (Koike *et al.*, 2011). El dominio de expresión de *Pax2*, *Gbx2* y *Wnt1* se encuentra expandido (denotado por líneas punteadas), pero la expresión de *Pax2* y *Gbx2* disminuye. (C) Fenotipo observado en embriones *Plpp3*^{lacZ/lacZ}. La expresión de *Wnt1* y *Fgf8* aumenta significativamente mientras que la expresión de *Pax2* y *Otx2* disminuyen. El orden de los genes representa el orden temporal en el que se expresan en el MHB. Interacciones reguladoras basadas en Wittmen *et al.*, 2009.

En apoyo a un posible incremento en la señalización mediada por LPA en algunas regiones del embrión está el asa de retroalimentación positiva entre este lípido bioactivo, sus receptores y la expresión de *Fgf*'s descrita en *Xenopus*. En este organismo FGF4 induce la expresión del receptor *Ipar6*, el cual al ser inhibido mediante el uso de morfolinosis ocasiona a su vez la disminución de la expresión de *Fgf8* en el ANR y en el MHB. De igual manera el knockdown de *Atx* reduce la expresión de *Fgf8* en las mismas regiones (Geach *et al.*, 2014). Recordemos que en este trabajo se observó un incremento en la expresión de *Fgf8* tanto en el ANR como en el MHB, sugiriendo que este efecto puede estar mediado por el incremento en la señalización de los LPARs expresados en estas regiones (Figs. 4 y 21-23).

Las diferencias en la expresión de marcadores observadas entre los mutantes de *Atx* y *Plpp3* podría también deberse a que las variaciones observadas en nuestro modelo no sean causadas exclusivamente por alteraciones en la señalización del LPA. La PLPP3 modula la concentración de otros lípidos bioactivos que podrían estar contribuyendo a los defectos morfológicos, por ejemplo, la S1P.

La S1P, como el LPA, es capaz de regular procesos como la diferenciación, la supervivencia, motilidad, crecimiento y movilización de calcio a través de la señalización mediada por los GPCRs S1P₁ al S1P₅ (Mizugishi. *et al.*, 2005). Durante el desarrollo embrionario la expresión de los distintos receptores para la

S1P se lleva a cabo en regiones específicas del embrión. Por ejemplo, *S1pr3* se expresa en el futuro mesencéfalo en E8.5 y en E9.5 se expresa en el mesénquima cefálico y en el primer arco branquial. Por otro lado, *S1pr4* se expresa de manera ubicua en embriones de E8.5 a E10.5 (Ohuchi *et al.*, 2008). La señalización mediada por la S1P es necesaria para un correcto desarrollo. La mutación nula de las cinasas que fosforilan a la esfingosina, la *SphK1* y *SphK2*, ocasionan letalidad embrionaria previo a E13.5. Los embriones mutantes presentan defectos vasculares y frecuentemente exencefalia, ocasionada por una apertura persistente del tubo neural entre los puntos de cierre 1 y 3 en la región anterior (Mizugishi *et al.*, 2005). El incremento en la señalización de S1P también se ha relacionado a defectos en el cierre del tubo neural (Gelineau-van Waes *et al.*, 2012), aunque no se ha estudiado si esto causa alteraciones en la expresión de marcadores del MHB. En este sentido, los fenotipos observados en los embriones deficientes en la PLPP3 pudieran deberse a la combinación de las alteraciones en la señalización mediada por ambos lípidos bioactivos.

Los defectos en el cierre del tubo neural de los embriones carentes de PLPP3 presentan ciertas similitudes con mutantes con defectos en la transición de un epitelio cúbico a uno columnar y pseudoestratificado (i.e. *Pten* [Grego-Bessa *et al.*, 2016]); defectos en la elevación de los pliegues neurales y formación de los puntos de bisagra/curvatura por defectos en la función del citoesqueleto (i.e. *cofilina* [Escuin *et al.*, 2015] y *Shroom3* [Haigo *et al.*, 2003]); de la expansión del mesénquima cefálico (i.e. *Twist* [Zohn y Sarkar, 2012]) o de la señalización mediada por el ectodermo no neural, (i.e. *BMP2* [Furuta *et al.*, 1997]); y el sellado de los pliegues neurales por reducción de la apoptosis (i.e. *Apaf1* [Cecconi *et al.*, 1998], *Caspasa 9* [Kuida *et al.*, (1998).], *p53* [Sah *et al.*, 1995]) o por fallas en la migración de la cresta neural (i.e. *Conexina 43* [Ewart *et al.*, 1997], *Twist* [Chen y Behringer, 1995], por lo que será interesante determinar en cuál(es) de los mecanismos mencionados participa la PLPP3 para regular el cierre del tubo neural.

Un fenotipo del neuroepitelio que se observó de forma consistente en este proyecto fue la aparición de surcos estereotípicos que flanquean en su frontera anterior y posterior al dominio de expresión de *En2* en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}*. Estos surcos y la morfología irregular del neuroepitelio observados por la ausencia de PLPP3 tienen cierta semejanza con los defectos observados en ausencia de la fosfatasa PTEN, otra fosfatasa de fosfolípidos la cual convierte al fosfatidil inositol trifosfato en fosfatidil inositol bifosfato (Grego-Bessa *et al.*, 2016), o en mutantes de genes que controlan la dinámica del citoesqueleto (Escuin *et al.*, 2015; Haigo *et al.*, 2003).

En el caso de la mutación de *Pten*, los surcos en los pliegues del neuroepitelio no son ocasionados por proliferación o muerte celular localizada en el neuroepitelio sino por un defecto en la transición de un

epitelio cúbico a uno columnar y pseudoestratificado (Grego-Bessa *et al.*, 2016). En embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* se observó una ligera disminución generalizada de la proliferación del neuroepitelio. Sin embargo, este resultado parece estar más relacionado al retraso generalizado de su desarrollo que a una disminución focalizada de la proliferación en las regiones de los surcos. De manera similar, aunque en embriones mutantes se encontraron algunas regiones del embrión con incremento de muerte, estas sólo se observaron en embriones de mayor grado de desarrollo que además presentaban hemorragias o edema y no coincidieron con las regiones donde se observaron los surcos formados en el neuroepitelio. Por lo anterior, sería interesante analizar si en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* existe un defecto en la transición de un epitelio cúbico a uno columnar y pseudoestratificado como ocurre en los embriones *Pten^{-/-}*.

En la región del cerebro medio y posterior, inicialmente el neuroepitelio tiene una forma biconvexa con sus vértices orientados en sentido contrario a la línea media. Posteriormente los pliegues neurales adoptan una morfología bicóncava (Morriss-Kay, 1981). Este cambio de morfología de los pliegues neurales de biconvexo a bicóncavo está regulado por la elevación y curvatura del neuroepitelio dependiente del citoesqueleto de actinmiosina (Morriss-Kay y Tuckett, 1985; Sawyer *et al.*, 2010). La señalización del LPA y/o la S1P regula la organización del citoesqueleto por lo que su desregulación en embriones mutantes podría contribuir a los defectos en la topología del neuroepitelio y en el cierre del tubo neural.

Finalmente, el proceso de sellado de los pliegues neurales donde participa la muerte celular apoptótica y la migración de la cresta neural son procesos que también pudieran estar afectados en los embriones carentes de PLPP3. Aunque falta por realizar experimentos más detallados en relación con estos procesos, es interesante notar que en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* los patrones de muerte se ven alterados.

En embriones control de E8.5, los dominios de muerte celular esperados (identificados por inmunodetección para la Cas-3 activa) se ubican en los bordes de los pliegues de las crestas neurales anteriores y en un dominio simétrico a la altura del rombencéfalo (Fig. 31A-F). Estas zonas de muerte se presentaron de forma similar en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* de etapa de desarrollo equivalente, sin embargo, la extensión de la zona de muerte en el ANR se encontró muy reducida, probablemente debido al aumento en la expresión de *Fgf8*, ya que se sabe que la señalización de FGF regula la sobrevivencia celular en la región del prosencéfalo (Paek *et al.*, 2009).

En etapas posteriores, cuando en los mutantes aparecen los surcos flanqueando al dominio de expresión de *En2*, se observaron células positivas a Cas-3 activa en el neuroepitelio alrededor de los surcos caudales, pero no en los surcos anteriores. Además, en los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* que avanzaron más en el

desarrollo se presentaron variaciones en los patrones de muerte observados en comparación con los embriones control. En la región cefálica de embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* se observó un aumento en muerte celular en las regiones laterales de la cabeza, en los arcos branquiales y en un dominio simétrico superior a las vesículas óticas. Estos sitios de muerte son regiones por donde las células de la cresta neural migran y donde también se expresa *Fgf8* (Abu-Issa *et al.*, 2002). Ya que los niveles de expresión de este gen se encuentran aumentados en ausencia de la PLPP3 en estas zonas, la muerte celular no se explica por una ausencia del morfógeno. En este sentido el aumento en muerte celular en estas regiones podría estar siendo ocasionado por la ausencia de la conexión con la circulación materna y por defectos en la angiogénesis, las cuales resultan en edemas y hemorragias. Alternativamente, estas regiones de abundante muerte celular pudieran ser reflejo de alteraciones en la migración de las células de la cresta neural (NCC) cefálica. En *Xenopus* la señalización mediada por el receptor LPAR2 se requiere para la apropiada migración colectiva de la cresta neural cefálica (Kuriyama *et al.*, 2014). Apoyando un posible defecto en la migración de la cresta neural en nuestros embriones mutantes se encuentran: el poco desarrollo del primer arco branquial; la coincidencia de las zonas de muerte con regiones por donde migran las NCC y los dominios más intensos de expresión de *Wnt1* en los bordes de los pliegues neurales, lo que es indicativo de la cresta neural premigratoria (Acuna-Mendoza *et al.*, 2017). Será interesante corroborar si en los embriones mutantes efectivamente existen defectos en la migración de la cresta neural.

10. Conclusiones

1. La expresión de *Otx2* disminuye ligeramente por la ausencia parcial o total de la PLPP3.
2. La deficiencia de la PLPP3 provoca una disminución en los niveles de expresión de *Pax2* en el prosencéfalo y en el MHB.
3. Existe un aumento en los niveles de expresión de *Wnt1* en el MHB en ausencia de la PLPP3.
4. Existe un aumento en los niveles de expresión de *Fgf8* en el prosencéfalo y en el MHB en ausencia de la PLPP3. La disminución de *Pax2* en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* no afecta al factor transcripcional *En2* ni al morfógeno *Fgf8*.
5. Los defectos observados en el MHB en embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* no parecen ser ocasionados exclusivamente por una desregulación en la vía de señalización del LPA.
6. Existen modificaciones en la estructura del neuroepitelio que flanquea al dominio de expresión de *En2* en el MHB.

7. Los defectos en la morfología de los pliegues neurales en ausencia de la PLPP3 no parecen ocasionados por variaciones en los niveles de muerte o proliferación focalizada en el neuroepitelio.

11. Perspectivas

Como ya se mencionó anteriormente, los embriones *Plpp3^{lacZ/lacZ}* fenocopian a embriones que presentan mutaciones en la transición de un epitelio cúbico a uno columnar, en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y en la migración de la cresta neural (Grego-Bessa *et al.*, 2016; Escuin *et al.*, 2015; Haigo *et al.*, 2003; Ewart *et al.*, 1997; Chen y Behringer, 1995).

Para evaluar cuál es el estado del citoesqueleto en nuestros embriones se podrían realizar tinciones con faloidina para visualizar la estructura del neuroepitelio en cortes coronales de la región del MHB. También se puede evaluar la polarización del neuroepitelio mediante el análisis de microtúbulos estables polarizados apicobasalmente detectando tubulina acetilada. La visualización del citoesqueleto de actinmiosina en la región de los surcos observados alrededor del MHB también nos podrían dar indicios de que en ausencia de la PLPP3 la contractibilidad del neuroepitelio se encuentra comprometida y es este defecto el que previene el cierre del tubo neural.

El aumento en la señal de *Wnt1* observado en ausencia de la PLPP3 podría ser evidencia de una acumulación de células de la cresta neural en los bordes de los pliegues neurales. Estas células se derivan de ectodermo que yace entre la placa neural y la epidermis. Estas células dan origen a tejidos como el sistema nervioso periférico, la médula de la glándula suprarrenal, el tejido conectivo y óseo de la región cefálica y los melanocitos (Gilbert 2014). Se sabe que *Wnt1* es un marcador para las células de la cresta neural premigratoria (Acuna-Mendoza *et al.*, 2017). Además, es necesaria una inhibición transitoria de la vía de señalización de WNT para la delaminación de la cresta neural y su subsecuente migración hacia sus sitios blanco (Rabadán *et al.*, 2016). En este contexto, se podrían hacer experimentos para evaluar si la vía de señalización WNT también está sobreactivada o si el aumento en la señal de *Wnt1* está ocasionado por la permanencia de la cresta neural en los pliegues. Un aumento en la localización nuclear de β -catenina sería indicación de la activación de la vía canónica de WNT. Por otra parte, empleando un marcador de cresta neural como Sox10 nos permitiría observar si existen defectos en la migración de las células de la cresta neural en ausencia de la PLPP3.

Idealmente estas estrategias deberían realizarse en un contexto donde la PLPP3 sea desactivada solo en las regiones de interés. En este proyecto se utilizaron ratones de la cepa CDI.*Plpp3^{lacZ}* los cuales son

portadores de un alelo reportero (knock in) para la actividad de la β -galactosidasa de bacteria. Este alelo inhibe la actividad de la PLPP3 en todas las regiones embrionarias y extraembrionarias en donde se expresa la enzima (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003; Escalante-Alcalde *et al.*, 2009). Para estudiar los efectos de la ausencia de la PLPP3 específicamente en la región del MHB se podría generar una cepa con una mutación condicional al flanquear al gen de la *Plpp3* con secuencias loxP (*Plpp3^{fl/fl}*) y deletando al gen mediante la co-expresión de *Wnt1:Cre* o de *En2:Cre*. El uso de la cepa *Plpp3^{Δf/Δf} Wnt1:Cre* además nos podría dar información sobre el papel que tiene la PLPP3 en el desarrollo y migración de la cresta neural.

Finalmente, el gen de la β -gal en el alelo *Plpp3^{lacZ}* se encuentra inserto en el exón 3 del gen de la *Plpp3* como ya se mencionó antes, disrumpiendo a su sitio catalítico y a su dominio de unión a integrinas RGE en el C1 y C2. Se sabe que una de las principales causas de los defectos en el cierre del tubo neural es por fallas en el citoesqueleto y en la adhesión celular (Wild *et al.*, 2014). Es por el efecto dual que tiene el alelo mutante que no podemos diferenciar entre los efectos que tiene la ausencia de la actividad catalítica de la PLPP3 del efecto que tiene la falta de su dominio RGE. Para poder estudiar de forma separada los efectos que tiene la falta de cada una de las funciones que tiene la PLPP3, sería necesario realizar mutaciones puntuales en una u otra región y generar a los ratones transgénicos. Sólo así podremos saber qué contribución tiene el dominio de adhesión de la PLPP3 a los fenotipos observados en el neuroepitelio y en el MHB.

12. Referencias

1. Abu-Issa R., Smyth G., Smoak I., Yamamura K. and Meyers E.N. (2002). *Fgf8* is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development*. 129: 4613-4625.
2. Acampora D., Avantaggiato V., Tuorto F., Simeone A. (1997). Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development*. 124: 3639–3650.
3. Acampora D., Mazan S., Lallemand Y., Avantaggiato V., Maury M., Simeone A. and Brulet P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*. 121: 3279-3290.
4. Acuna-Mendoza S., Martin S., Kuchler-Bopp S., Ribes S., Thalgott J., Chaussain C., Creuzet S., Lesot H., Lebrin F. and Poliard A. (2017). A New Wnt1-CRE TomatoRosa Embryonic Stem Cell Line: A Tool for Studying Neural Crest Cell Integration Capacity. *Stem Cells Dev*. Dec 1;26(23):1682-1694.
5. Asano M. and Gruss P. (1992). Pax-5 is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mechanisms of Development*. 39: 29-39
6. Bally-Cuif L., Alvarado-Mallart R. M. Darnell D.K. and Wassef M. (1992). Relationship between Wnt-1 and En-2 expression domains during early development of normal and ectopic met-mesencephalon. *Development*. 115: 999-1009.
7. Barilà D., Plateroti M., Nobili F., Muda A.O., Xie Y., Morimoto T. and Perozzi G. (1996). The Dri 42 gene, whose expression is upregulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein. *J. Biol. Chem*. 271: 29928–29936.
8. Bouchard M., Grote D., Craven S.E., Sun Q., Steinlein P. and Busslinger M. (2005). Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development*. 132: 2633-2643.
9. Broccoli V., Boncinelli E. and Wurst W. (1999). The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmic organizer. *Nature*. 401: 164-168.
10. Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B.I., Roth K.A. and Gruss P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Dev. Cell*. 94: 727–737.
11. Chen Z-F. and Behringer R.R. (1995). Twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev*. 9: 686–699
12. Chi C.L., Martinez S., Wurst W. and Martin G.R. (2003). The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development*. 130: 2633-2644.

13. Choi J.W., Herr D.R., Noguchi K., Yung Y.C., Lee C.W., Mutoh T., Lin M.E., Teo S.T., Park K.E., Mosley A.N. and Chun J. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50: 157-186.
14. Contos J.J., Fukushima N., Weiner J.A., Kaushal D. and Chun J. (2000). Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:13384–13389.
15. Crossley P.H. and Martin G.R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* 121(2):439-51.
16. Crossley P.H., Martinez S. and Martin G.R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature.* 380: 66-68.
17. Davis C.A., Noble-Topham S.E., Rossant J., and Joyner A.L. (1988). Expression of the homeo box-containing gene *En-2* delineates a specific region of the developing mouse brain. *Genes & Development.* 2:361-371.
18. Dressler G.R., Deutsch U., Chowdury K., Nornes H.O. and Gruss P. (1990). *Pax2*, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development.* 109: 787–795.
19. Escalante-Alcalde D., Hernandez L., Le Stunff H., Maeda R., Lee H.S., Jr Gang C., Sciorra V.A., Daar I., Spiegel S., Morris A.J. and Stewart C.L. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development.* 130: 4623-4637.
20. Escalante-Alcalde D., Morales S.L. and Colin L. Stewart C.L. (2009) Generation of a reporter-null allele of *Ppap2b/Lpp3* and its expression during embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 139-147.
21. Escuin S., Vernay B., Savery D., Gurniak C.B., Witke W., Greene N.D.E. and Copp A.J. (2015). Rho-kinase-dependent actin turnover and actomyosin disassembly are necessary for mouse spinal neural tube closure. *J. Cell. Sci.* 128: 2468-2481.
22. Ewart J.L., Cohen M.F., Meyer R.A., Huang G.Y., Wessels A., Gourdie R.G., Chin A.J., Park S.M., Lazatin B.O., Villabon S. and Lo C.W. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the *Cx43* gap junction gene. *Development* 124: 1281–1292.
23. Favor J., Sandulache R., Neuhäuser-Klaus A., Pretsch W., Chatterjee B., Senft E., Wurst W., Blanquet V., Grimes P., Spörle R. and Schughart K. (1996). The mouse *Pax2(1Neu)* mutation is identical to a human *PAX2* mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA.* Nov 26;93(24): 13870-5.

24. Fotopoulou S., Oikonomou N., Grigorjeva E., Nikitopoulou I., Paparountas T., Thanassopoulou A., Zhao Z., Xu Y., Kontoyiannis D.L., Remboutsika E., Aidinis V. (2010). ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol.* 339:451–464.
25. Furuta Y., Piston D.W. and Hogan B.L. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development.* 124 :2203-2212.
26. Geach T.J., Faas L., Devader C., Gonzalez-Cordero A., Tabler J.M., Brunsdon H., Isaacs H.V. and Dale L. (2014). An essential role for LPA signalling in telencephalon development. *Development.* Feb;141(4): 940-9.
27. Gelineau-van Waes J., Rainey M.A., Maddox J.R., Voss K.A., Sachs A.J., Gardner N.M., Wilberding J.D. and Riley R.T. (2012) Increased sphingoid base-1-phosphates and failure of neural tube closure after exposure to fumonisin or FTY720. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* Oct;94(10):790-803.
28. Gemel J., Jacobsen C., MacArthur C. (1999). Fibroblast Growth Factor-8 Expression Is Regulated by Intronic Engrailed and Pbx1-binding Sites. *J Biol Chem.* 274: 6020–6026.
29. Gilbert S.F. (2014). *Developmental Biology.* Tenth edition. Sinauer associates, Inc. Sunderland, MA USA. pp 341-342.
30. Goetzl E.J. and An S. (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* 12: 1589 -1598.
31. Grego-Bessa J., Bloomekatz J., Castel P., Omelchenko T., Baselga J. and Anderson K.V. (2016). The tumor suppressor PTEN and the PDK1 kinase regulate formation of the columnar neural epithelium. *Elife.* Jan 26;5: e12034.
32. Haigo S.L., Hildebrand J.D., Harland R.M. and Wallingford J.B. (2003). Shroom induces apical constriction and is required for hingepoint formation during neural tube closure. *Curr. Biol.* 13: 2125-2137.
33. Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P. and Allis C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma.* 106: 348–60.
34. Humtsoe J.O., Bowling R.A. Jr, Feng S. and Wary K.K. (2005). Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 906–919.
35. Humtsoe J.O., Feng S., Thakker G.D., Yang J., Hong J. and Wary K.K. (2003). Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *EMBO J.* 22: 1539-1554.

36. Joyner A.L. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* 12: 15-20.
37. Joyner A.L. (2002). Establishment of Anterior-Posterior and Dorsal-Ventral Pattern in the Early Central Nervous System. In Rossant J. and Tam P. (First Edition) *Mouse development: Patterning, Morphogenesis and Organogenesis.* (pp 107-126). Canada: Academic Press.
38. Joyner A.L. and Martin G.R. (1987). En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila engrailed* gene: expression during embryogenesis. *Genes & Development.* 1: 29-38.
39. Joyner A.L., Liu A. and Millet S. (2000). Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol.* Dec;12(6): 736-41.
40. Kai M., Wada I., Imai S., Sakane F. and Kanoh H. (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺ independent phosphatidic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272: 24572–24578.
41. Koike S., Yutoh Y., Keino-Masu K. Noji S., Masu M. and Ohuchi H. (2011). Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Developmental Dynamics.* 240: 413–421.
42. Kok B.P.C., Venkatraman G., Capatos D. and Brindley D.N. (2012). Unlike Two Peas in a Pod: Lipid Phosphate Phosphatases and Phosphatidate Phosphatases. *Chem. Rev.* 112: 5121–5146.
43. Kuida K., Haydar T.F., Kuan C.Y., Gu Y., Taya C., Karasuyama H., Su M.S., Rakic P. and Flavell R.A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* 94: 325–337.
44. Kuriyama S., Theveneau E., Benedetto A., Parsons M., Tanaka M., Charras G., Kabla A. and Mayor R. (2014). In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity. *J Cell Biol.* Jul 7;206(1): 113-27.
45. Lee S. M. K., Danielian P. S., Fritsch B and McMahon A. P. (1997). Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development.* 124: 959-969.
46. Liu A. and Joyner A. (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development.* 128: 181–191.
47. Liu A., Losos K. and Joyner A.L. (1999). FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development.* 126: 4827-483.
48. Logan C.Y. and Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 781–810.
49. Marin F. and Puelles M. (1994). Patterning of the Embryonic Avian Midbrain after Experimental inversions: A Polarizing Activity from the Isthmus. *Developmental Biology.* 163: 19-37

50. Martinez S., Crossley P.H., Cobos I., Rubenstein J.L. and Martin G.R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development*. Mar;126(6): 1189-200.
51. Martinez-Barbera J.P., Signore M., Boyl P.P., Puelles E., Acampora D., Gogoi R., Schubert F., Lumsden A. and Simeone A. (2001). Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2. *Development*. Dec;128(23): 4789-800.
52. McDermott M.I., Sigal Y.J., Crump J.S. and Morris A.J. (2006). Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases. *Methods*. Jun;39(2):169-79.
53. McMahon A.P. and Bradley A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*. 62: 1073-1085.
54. McMahon A.P., Joyner A.L., Bradley A. and McMahon J.A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1⁻/Wnt-1⁻ mice results from stepwise deletion of *engrailed* expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell*. 69: 581-595.
55. Millen K.J., Wurst W., Herrup K. and Joyner A.L. (1994). Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development*. Mar;120(3): 695-706.
56. Millet S., Campbell K., Epstein D.J., Losos K., Harris E. and Joyner A.L. (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the midbrain/hindbrain organizer. *Nature*. 401: 161-164.
57. Mirendil H., Lin M. and Chun J. (2013) Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptor Signaling. In Chun J., Hla T., Moolenaar W. and Spiegel S. (First edition) *Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry*. (pp 1-39). New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
58. Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G.F., Spiegel S. and Proia R.L. (2005). Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Molecular And Cellular Biology*. P. Vol. 25, No. 24: 11113–11121.
59. Morriss-Kay G. and Tuckett F. (1985). The role of microfilaments in cranial neurulation in rat embryos: effects of short-term exposure to cytochalasin D. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88: 333-348.
60. Morriss-Kay G.M. (1981). Growth and development of pattern in the cranial neural epithelium of rat embryos during neurulation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 65 Suppl: 225-241.
61. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K. and Behringer R. (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition, New York.
62. Nicholson D.W. and Thornberry N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 299–306.

63. Nornes H.O., Dressler G.R., Knapik E.W., Deutsch U. and Gruss P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development*. 109: 797–809. 7.
64. Ohuchi H., Hamada A., Matsuda H., Takagi A., Tanaka M., Aoki J., Arai H. and Noji S. (2008). Expression Patterns of the Lysophospholipid Receptor Genes During Mouse Early Development. *Developmental Dynamics*. 237: 3280–3294.
65. Ohuchi H., Hayashibaral Y., Matsuda H., Onoi M., Mitsumori M., Tanaka M., Aoki J. and Noji S. (2007). Diversified expression patterns of *autotaxin*, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. *Developmental Dynamics*. 236: 1134–1143.
66. Ornitz D.M. and Itoh N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Dev Biol*. 4:215–266
67. Paek H., Gutin G. and Hébert J.M. (2009). FGF signaling is strictly required to maintain early telencephalic precursor cell survival. *Development*. Jul;136(14): 2457-65.
68. Ptaszynska M.M., Pendrak M.L., Stracke M.L. and Roberts D.D. (2010). Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. *Mol Cancer Res*. Mar;8(3): 309-21.
69. Pyne S., Long J.S., Ktistakis N.T. and Pyne N.J. (2005) Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signaling. *Biochemical Society Transactions*. Volume 33, part 6.
70. Rabadán M.A., Herrera A., Fanlo L., Usieto S., Carmona-Fontaine C., Barriga E.H., Mayor R., Pons S. and Martí E. (2016). Delamination of neural crest cells requires transient and reversible Wnt inhibition mediated by Dact1/2. *Development*. Jun 15;143(12): 2194-205.
71. Rhinn M., Dierich A., Le Meur M. and Ang S. (1999) Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development*. 126: 4295–4304.
72. Rowitch D.H. and McMahon A.P. (1995). Pax-2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mechanisms of Development*. 52: 3-8.
73. Sah V.P., Attardi L.D., Mulligan G.J., Williams B.O., Bronson R.T. and Jacks T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nature Genet*. 10: 175–180.
74. Sambrook J. and Russell D. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition, New York. p11.63.
75. Sawyer, J.M., Harrell J.R., Shemer G., Sullivan-Brown J., Roh-Johnson M. and Goldstein B. (2010). Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev. Biol*. 341: 5-19
76. Sigal Y.J., McDermott M.I. and Morris A.J. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem. J*. 387: 281–293.

77. Simeone A. (2000). Positioning the isthmic organizer where Otx2 and Gbx2 meet. *Trends Genetics*. TIG 16(6): 237–240.
78. Simeone A., Acampora D., Massino G., Stornainolo A. and Boncinelli E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*. 358: 687-690.
79. Sumida H., Noguchi K., Kihara Y., Abe M., Yanagida K., Hamano F., Sato S., Tamaki K., Morishita Y., Kano M.R., Iwata C., Miyazono K., Sakimura K., Shimizu T. and Ishii S. (2010). LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*. 116: 5060-5070.
80. Susanto O., Koh Y.W.H., Morrice N., Tumanov S., Thomason P.A., Nielson M., Tweedy L., Muinonen-Martin A.J., Kamphorst J.J., Mackay G.M. and Insall R.H. (2017). LPP3 mediates self-generation of chemotactic LPA gradients by melanoma cells. *J Cell Sci*. Oct 15;130(20): 3455-3466.
81. Tanaka M., Okudaira S., Kishi Y., Ohkawa R., Iseki S., Ota M., Noji S., Yatomi Y., Aoki J., Arai H. (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281: 25822–25830.
82. Tang X., Benesch M.G.K, and Brindley D.N. (2015). Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *Journal of Lipid Research*. Volume 56.
83. Tomsig J.L., Snyder A.H., Berdyshev E.V., Skobeleva A., Mataya C., Natarajan V., Brindley D.N and Lynch K.R. (2009). Lipid Phosphate Phosphohydrolase Type 1 (Lpp1) degrades extracellular lysophosphatidic acid *in vivo*. *Biochem J*. 419: 611–618.
84. Wassarman K.M., Lewandoski M., Campbell K., Joyner A.L., Rubenstein J.L, Martínez S., and Martin G.R. (1997). Specification of the anterior hindbrain establishment of a normal midbrain/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development*. 124: 2923-2934.
85. Wilde J.J., Petersen J.R. and Niswander L. (2014) Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. *Annu. Rev. Genet*. 48:583–611.
86. Wilkinson D.G., Bailes J.A. and McMahon A.P. (1987). Expression of the proto-oncogene *in-1* is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell*. 50: 79-88.
87. Wittmann D.M., Blöchl F., Trümbach D., Wurst W., Prakash N. and Theis F.J. (2009). Spatial analysis of expression patterns predicts genetic interactions at the mid-hindbrain boundary. *PLoS Comput Biol*. 2009 Nov;5(11): e1000569.
88. Wurst W. and Bally-Cuif L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat Rev Neurosci*. Feb;2(2): 99-108.

89. Ye W., Bouchard M., Stone D., Luo X., Vella F., Lee J., Nakamura H., Ang S.L., Busslinger M. and Rosenthal A. (2001). Distinct regulators control the induction, positioning and maintenance of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Nat. Neurosci.* 4: 1175-1181.
90. Ye X., Hama K., Contos J.J., Anliker B., Inoue A., Skinner M.K., Suzuki H., Amano T., Kennedy G., Arai H., Aoki J. and Chun J. (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature.* 435: 104–108.
91. Yukiura H., Kano K., Kise R., Inoue A. and Aoki J. (2015). Autotaxin overexpression causes embryonic lethality and vascular defects. *PLoS ONE.* 10(5): e0126734.
92. Zhang N., Sundberg J.P. and Gridley T. (2000). Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis* 27: 137-140.
93. Zhang Q.X., Pilquil C.S., Dewald J., Berthiaume L.G. and Brindley D.N. (2000). Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem. J.* 345: 181–184.
94. Zohn I.E. and Sarkar A.A. (2012). Does the cranial mesenchyme contribute to neural fold elevation during neurulation? *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 94: 841-848.