



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“PARTICIPACIÓN DE LA FOSFATASA DE FOSFOLÍPIDOS 3 (PLPP3) EN EL  
NICHOS NEUROGÉNICO DE LA ZONA SUB VENTRICULAR DEL CEREBRO DE  
RATÓN ADULTO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
LBM. ANGÉLICA LUNA LEAL

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

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Enero, 2020



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.

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Doctora Diana María Escalante Alcalde.

Durante la realización de este trabajo se contó con la beca CONACyT/CVU 385799/631425, así como con el apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (*PAPIIT*) IN 205812; IN 207015 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB165897; CB250613 para el financiamiento del trabajo experimental.

Se agradece el apoyo técnico de la Dra. Ana Valeria Martínez Silva para la realización de este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Escalante por el tiempo y esfuerzo dedicado a mi formación, y permitirme ser un miembro del AL-103.

A Lupita, Héctor y Aldo, por tanto, e incondicional amor, por tener fe en mí, incluso cuando yo la hubiera perdido. Gracias familia por siempre estar conmigo, son mi más grande orgullo, los quiero.

A Pily y a Cris, gracias por ser mi segunda familia, mis amigas y mis consejeras.

A Martha, Vale y Arlen, por su amistad, las charlas científicas y otras no tanto, y hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia inolvidable.

A Jean, Gibrán, Daniel, Gabriel, Eliana, Jahel, Josué, Tania, Miguel, por saber estar en las buenas y las malas, por su amistad y camaradería en este tramo del camino que hemos compartido.

Muchas gracias amigos...

A Damián, gracias por tu amor y paciencia, pero por sobre todas las cosas a tu necesidad, por no dejar de empujar. Por la horda...

A la vida y a las probabilidades que los pusieron a todos ustedes en mi camino.

## RESUMEN

Mucho tiempo se pensó que la neurogénesis, proceso por el cual se generan nuevas neuronas a partir de sus progenitores, sucedía sólo durante el desarrollo embrionario, actualmente conocemos dos nichos donde este fenómeno se mantiene en mamíferos adultos: la zona sub ventricular (ZSV) y la zona sub granular del giro dentado del hipocampo (ZSG).

En la ZSV, se ha identificado un número importante de moléculas que podrían estar participando en la regulación del fenómeno de neurogénesis, entre ellas, destaca por su abundancia, la fosfatasa de fosfolípidos 3 (PLPP3).

Se sabe que la PLPP3 es miembro de la familia de las fosfatasas de fosfolípidos (PLPPs), y se conoce su rol importante en procesos de desarrollo del sistema nervioso central ya es responsables de regular los niveles de lípidos como S1P y LPA que activan vías de señalización, a través de la unión receptores acoplados a proteínas G. La S1P ha sido bien descrita como regulador de vías de señalización que promueven diferenciación, proliferación y supervivencia de las células.

Se ha encontrado la presencia importante del receptor 1 de S1P (S1PR<sub>1</sub>) y de PLPP3, en la zona sub ventricular del cerebro de ratón adulto, por lo que en este proyecto nos dimos a la tarea de investigar si la presencia de esta fosfatasa estaba participando en la regulación de la neurogénesis adulta.

Se realizó una caracterización de la expresión de la proteína PLPP3 en el nicho de la zona sub ventricular usando la técnica de inmunofluorescencia, para analizar su expresión en los elementos celulares del nicho, además de que se hicieron ensayos de administración de BrdU<sup>+</sup> en ratones control y ratones mutantes carentes de la proteína PLPP3 en el SNC.

Identificamos que PLPP3 se expresa en CTN del nicho neurogénico de la ZV-ZSV, así como en los astrocitos del parénquima. Y que su expresión desaparece conforme avanza el proceso de diferenciación, estando ausente en TAPs, neuroblastos y células del epéndima. También identificamos que la ausencia de la PLPP3 provoca un incremento del S1P extracelular, indicado por regulación a la baja del S1P<sub>1</sub> en el nicho neurogénico de la ZV-ZSV.

Los ensayos preliminares de los ensayos de administración de BrdU<sup>+</sup> arrojaron que la carencia de PLPP3 provoca un aparente incremento en el número de neuroblastos generados.

## Índice

1	Abreviaturas	1
2	La neurogénesis adulta	2
3	El nicho neurogénico de la zona ventricular- subventricular (ZV-ZSV): hogar de las células troncales neurales (CTN).	2
4	Los elementos celulares y arquitectura del nicho de la ZV-ZSV	5
4.1	Las células troncales neurales o células tipo B.	5
4.2	Células de amplificación transitoria o tipo C	7
4.3	Neuroblastos	7
4.4	Otros componentes celulares del nicho de la ZV-ZSV	8
4.4.1	Microglía y astrocitos	8
4.4.2	Epéndima	9
5	Factores implicados en la regulación del nicho neurogénico de la ZV-ZSV: participación de los lípidos bioactivos.	11
6	¿Qué son los lípidos bioactivos y cómo se regulan?	11
7	Regulación de lípidos bioactivos por las PLPPs	12
8	La fosfatasa de fosfolípidos 3 (PLPP3)	13
8.1	Ácido lisofosfatídico (LPA)	14
8.2	Esfingosina-1-fosfato (S1P)	16
9	Lisofosfolípidos y la PLPP3 en la neurogenesis adulta.	16
10	Justificación	18
11	Hipótesis	19
11.1	Objetivo general	19
11.2	Objetivos particulares	19
12	Metodología	20
12.1	Animales	20
12.2	Genotipificación	21
12.3	Perfusión y fijado de tejidos.	23
12.4	Inmunofluorescencia	25
12.5	Ensayos de marcaje, seguimiento y cuantificación de células con BrdU	26
12.6	Ensayos de migración <i>in vitro</i> .	28
12.7	Western blot	29
13	Resultados	31

13.1	Distribución y tipos celulares que expresan a la PLPP3 en el nicho de la ZV-ZSV.	31
13.2	Expresión del receptor S1P <sub>1</sub> en el nicho de la ZV-ZSV.	38
13.3	Efecto de la ausencia de la PLPP3 en la expresión del receptor S1P <sub>1</sub> .	39
13.4	Alteraciones en la generación de neuroblastos en ausencia de la PLPP3	42
13.5	Ensayos de migración de neuroblastos <i>in vitro</i>	43
14	Discusión	46
15	Conclusiones	50
16	Perspectivas	51
17	Bibliografía	52

## 1 Abreviaturas

ATX	Autotaxina
BO	Bulbo olfatorio
BrdU <sup>+</sup>	Bromodeoxiuridina
C1P	Ceramida-1- fosfato
CMR	Corriente de migración rostral
CTN	Células troncales neurales
CTNa	Células troncales neurales activadas
CTNq	Células troncales neurales quiescentes
DCX	Doublecortina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
GCs	Células glomerulares
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato y aspartato
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IGF2	Factor de crecimiento parecido a insulina 2
LCR	Líquido cefalo raquídeo
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAR	Receptores para LPA
NEM	N- etilmaleimida
PAP	Fosfatasa de fosfolípidos
PEDF	Factor pigmentario derivado de epitelio
PGCs	Células periglomerulares
PLPPs	Fosfatasa de fosfolípidos
S1P	Esfingosina-1-fosfato
TAP	Células de amplificación transitoria.
TH	Tirosina hidroxilasa
VCAM	Proteína de adhesión celular vascular
ZSG	Zona subgranular del giro dentado
ZV-ZSV	Zonaventricular- subventricular



## **2 La neurogénesis adulta**

En la década de los sesenta, el dogma que sostenía que todos nacíamos con un número finito de neuronas, que se iba reduciendo con el paso de los años, incapaces de regenerarse en el cerebro humano, fue puesta en duda. Se había creído que la neurogénesis, proceso mediante el cual se originan nuevas neuronas, sólo ocurría durante el desarrollo embrionario. El responsable de este importante descubrimiento fue el Dr. Joseph Altman, quien junto con su grupo de trabajo, reportó que la neurogénesis se mantenía activa en mamíferos de edades postnatales (Altman, 1962). Ahora, más de 50 años después de este logro científico se sabe con claridad que este fenómeno se mantiene activo durante la etapa adulta de algunos mamíferos. Se han descrito dos sitios canónicos donde la neurogénesis es persistente en el cerebro de mamíferos adultos; la zona ventricular-subventricular de los ventrículos laterales (ZV-ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo.

La neurogénesis adulta parte de unas células llamadas "células troncales neurales" (CTN), que deben poseer dos características, 1) tener la capacidad de auto-renovarse y 2) ser multipotentes, es decir, que pueden dar lugar a los diferentes linajes neuroectodérmicos del sistema nervioso central. Una característica importante de las células troncales neurales que residen en los nichos neurogénicos, es que mantienen marcadores específicos de las células troncales neurales que se encuentran presentes durante el desarrollo del sistema nervioso (Fuentealba et al., 2015; Menn et al., 2006).

### **3 El nicho neurogénico de la zona ventricular- subventricular (ZV-ZSV): hogar de las células troncales neurales (CTN).**

Para dejar claro el concepto de nicho, primero es necesario definirlo. La descripción clásica de un nicho, se refiere a un área de un tejido que provee un microambiente específico, en el cual las células troncales están presentes en un estado que favorece la auto renovación y el estado de multipotencialidad. En la ZV-ZSV este microambiente especializado, permite que las células ahí presentes interactúen con las células troncales neurales para mantenerlas o promover su diferenciación.

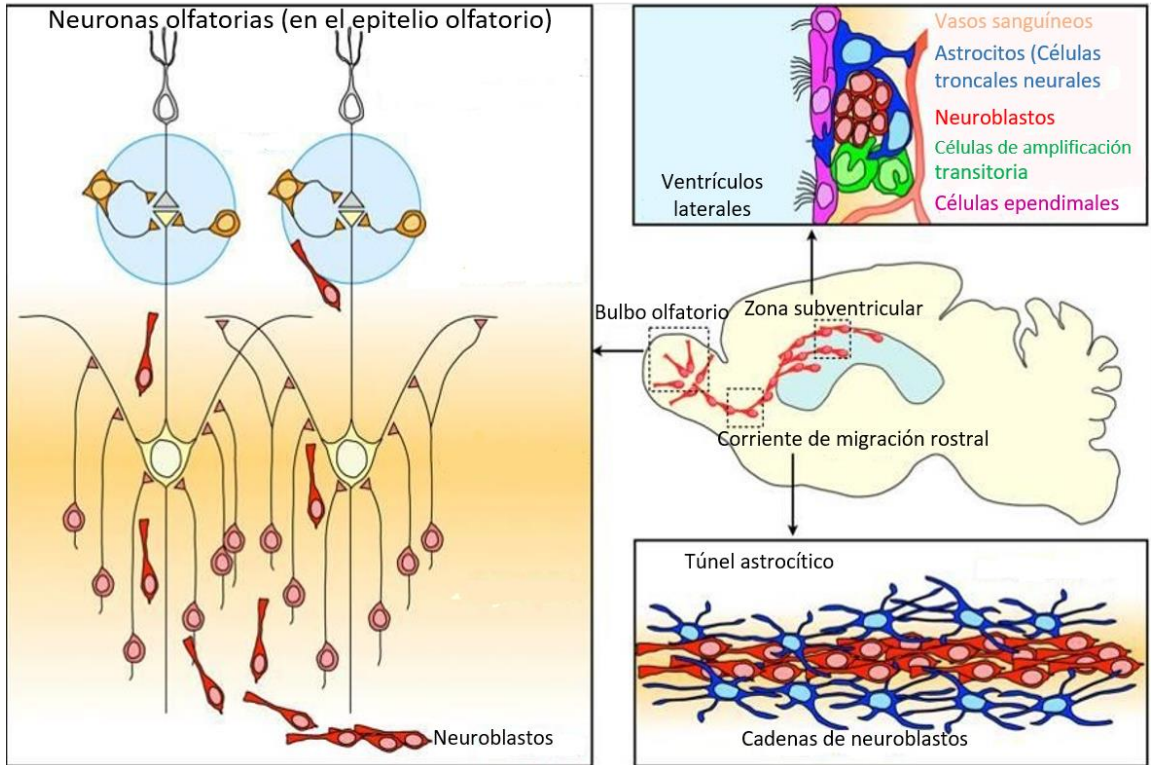
El más grande de los dos nichos que existen en el cerebro de ratón adulto es el de la zona subventricular, que de forma más apropiada debe ser llamado zona ventricular-subventricular (ZV-ZSV) debido a que el nicho se mantiene por elementos que se encuentran dentro y fuera de las paredes del ventrículo. Por una parte, la zona subventricular contiene las CTN y los linajes celulares que mantienen el nicho, mientras que en la zona ventricular están las células del epéndima y el líquido cefalorraquídeo (LCR) el cual, al fluir a través de los ventrículos, provee a las CTN que tienen contacto con él, de factores que también intervienen en la regulación de este microambiente altamente controlado.

En la ZSV se encuentra una subpoblación de CTN que darán origen a una gran diversidad de interneuronas que terminarán su diferenciación en el bulbo olfatorio (BO). Para que este fenómeno se complete, las células generadas en el nicho de la ZV-ZSV a partir de CTN, también llamados "neuroblastos" deben recorrer un largo trayecto de entre 3 y 8 mm a través de la corriente de migración rostral (CMR) hacia el BO (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Lois et al., 1996).

Las células troncales en el nicho de la ZV-ZSV, también llamadas células tipo B, mantienen propiedades de glía radial (predecesores que durante el desarrollo se desempeñan como progenitores neurales) y además tienen características moleculares de astrocitos (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Doetsch et al., 1999). Una diferencia importante con el cerebro en estadios embrionarios es que en la ZV-ZSV del cerebro adulto las CTN poseen una capacidad de diferenciación reducida teniendo en cuenta que sólo se generan interneuronas y oligodendrocitos (Menn et al., 2006; Merkle et al., 2014), comparado a la capacidad multipotencial que poseen los precursores neurales durante el desarrollo embrionario.

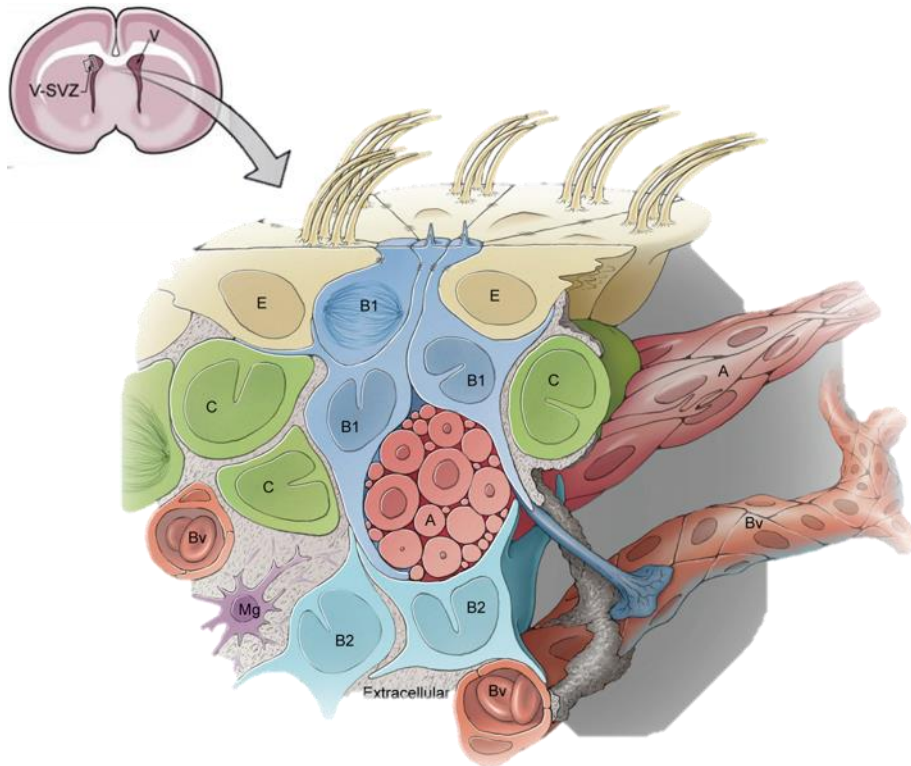
Las CTN de la zona subventricular, se pueden dividir simétricamente para mantener la población de células troncales, o asimétricamente para generar una célula igual y un progenitor que recibe los nombres de célula progenitora de división rápida / precursor intermedio / células tipo C o TAPs (Transient Amplifying Progenitor). Las células progenitoras de división rápida/precursores intermedios, se dividen rápidamente, entre 3 y 4 veces antes de originar el siguiente linaje celular (Calzolari et al., 2015). Las células tipo C eventualmente se diferencian a células tipo A o neuroblastos, que en roedores migran a través de la CMR para dar origen a interneuronas en el bulbo olfatorio. Los neuroblastos, migran tangencialmente en forma de cadenas, a lo largo de los ventrículos y hacia la CMR. Éstos terminan su recorrido en el BO donde finalizarán su proceso de diferenciación a interneuronas granulares y periglomerulares (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996) (Figura 1).

Otro aspecto importante del nicho de la ZV-ZSV es que éste está altamente regionalizado, es decir, se formarán diferentes tipos de interneuronas dependiendo de su localización rostro-caudal y dorso-ventral. Las CTN dorsales, producen células granulares (GCs) superficiales, mientras que las anteriores originan células periglomerulares (PGCs) y muy pocas o prácticamente ninguna que sea positiva al marcador calbindina. Por otro lado, las CTNs ventrales producen células granulares más profundas y células positivas a calbindina, pero prácticamente ninguna positiva a tirosina hidroxilasa (TH) (Lim and Alvarez-Buylla, 2014).



**Figura 1.** Representación del proceso de neurogénesis de la ZV-ZSV del cerebro de ratón adulto, en esta imagen podemos observar la identificación de los ventrículos, los elementos que la componen y el importante proceso de migración que ocurre hacia el bulbo olfatorio, donde las células terminarán el proceso de diferenciación para convertirse en diferentes tipos de interneuronas. Tomado y modificado de (Sawada and Sawamoto, 2013)

Estudios realizados para entender las diferencias entre las regiones de la zona subventricular revelan que las variaciones son en gran parte debido a propiedades intrínsecas de las células, por lo que se deduce a partir de esto que las CTN adultas no son una población homogénea. Una de las explicaciones mejor aceptadas para comprender las diferencias entre la población de troncales neurales ha sido atribuida a diferencias epigenéticas basadas en su localización física dentro de la zona subventricular (Kohwi et al., 2007).



**Figura 2.** Elementos estructurales que conforman el nicho ventricular-subventricular. Neuroblastos o células tipo A, células troncales neurales o células tipo B1, células tipo B2 que se encuentran más alejadas del ventrículo y que no tienen un proceso apical. Células de amplificación rápida o células tipo C y células endimales o E. Además, se observa la estructura como rehilete que rodea a los procesos apicales de las células tipo B1 que están en contacto con los ventrículos, mientras que su proceso basal contacta con vasos sanguíneos (BV). Tomado y modificado de (Fuentealba et al., 2012; Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011).

#### 4 Los elementos celulares y arquitectura del nicho de la ZV-ZSV

##### 4.1 Las células troncales neurales o células tipo B.

La identidad glial de las células tipo B es de particular interés cuando se examinan desde el contexto de su origen embrionario. En el embrión existe un tipo especializado de glía, la radial, que dará lugar a neuronas y glía durante el desarrollo del sistema nervioso (Anthony et al., 2004; Campbell and Gotz, 2002; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Noctor et al., 2001). En este periodo, los cuerpos celulares de la glía radial residen en la zona subventricular y mantienen contacto con los ventrículos, además de poseer un cilio primario en su superficie apical, características que se asemejan a las características de las células tipo B1 (ver adelante), lo que sugiere la persistencia de células parecidas a la glía radial en la zona ventricular adulta (Fuentealba et al., 2012; Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011).

Al igual que la glía radial embrionaria, las células tipo B poseen marcadores moleculares de astrocitos como la GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y GLAST (transportador de glutamato y aspartato) y carecen del marcador de astrocitos maduros

S100B (Doetsch et al., 1997). Por su morfología y localización, las células tipo B se han subdividido en B1 y B2.

Las células tipo B1 son las mejor estudiadas hasta el momento, y se describen como células con un dominio proximal medial y distal. El dominio proximal de éstas, corresponde a la porción celular que contiene un proceso especializado llamado "el cilio primario" que en una buena proporción de estas células está en contacto directo con el ventrículo, y que sobresale entre las rosetas formadas por las células ependimales (tipo E) (Mirzadeh et al., 2008; Sawamoto et al., 2006; Shen et al., 2008). Se piensa que el cilio primario funciona al interactuar con factores presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011; Lehtinen et al., 2011), activando vías de señalización indispensables para el mantenimiento del nicho. El dominio intermedio de las células B1 está en estrecho contacto con los progenitores intermedios y neuroblastos, probablemente permitiendo que haya retroalimentación de señales entre ellas para regular el mantenimiento del nicho (Imayoshi et al., 2010). El dominio distal se encuentra con uno más de los elementos importantes que componen el nicho, la vasculatura. El dominio distal de las células tipo B1, interactúa con la lámina basal de los vasos sanguíneos y posiblemente con factores derivados de la circulación que podrían estar favoreciendo la proliferación y la auto-renovación de los progenitores de la ZV-ZSV (Shen et al., 2004). Esta idea se deriva de la observación de que la barrera hematoencefálica de los vasos sanguíneos del nicho es más permeable que en otras áreas no neurogénicas (Tavazoie et al., 2008).

Por otro lado, las células tipo B2, las cuales comparten los marcadores descritos en las células B1, son las que se encuentran enmarcando el parénquima estriatal, y su principal característica es que no presentan un proceso apical que contacte con los ventrículos.

Las células B también se han clasificado por el estado de su ciclo celular. Las mejor caracterizadas se piensa corresponden a las células con morfología B1. Algunas de estas células permanecen en estado quiescente (CTNq o Bq) y entran en ciclo con poca frecuencia, pues se ha calculado que sufren una división aproximadamente cada 28 días y que es la población de células que funcionan como reserva de CTN (Ponti et al., 2013). Las CTNq pasan por un estado "primed" o de preparación previa a su estado activado (CTNa o Ba) cuando están listas para su transición al siguiente tipo celular en el proceso de neurogénesis. Una característica de las CTNq de este nicho es que carecen de la expresión de nestina, la cual sólo aparece cuando están mitóticamente activas (Codega et al., 2014b).

Como se mencionó, las células tipo B suelen identificarse por la expresión de GFAP y GLAST o GLT1. Sin embargo, estas proteínas también las expresan los astrocitos maduros no neurogénicos. También expresan el carbohidrato de membrana conocido como LeX. El problema con el uso de este marcador radica en que éste se encuentra expresado en algunos neuroblastos y otras células no neurogénicas. La falta de marcadores específicos para estas células continúa siendo motivo de estudio en el área de las células troncales neurales. Por lo anterior el uso de una combinación de diversos marcadores se ha empleado para aislar y purificar algunas de estas poblaciones.

Por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) se expresa en CTN activas mitóticamente (Ba) y en las células tipo C (Pastrana et al., 2009). El factor de transcripción Id1, se expresa abundantemente en las células tipo B, y las tipo C al igual que el factor de transcripción Tlx. La proteína VCAM se expresa en el cilio primario de las células tipo B1 (Kokovay et al., 2012). De forma similar, la proteína CD133, o Prominina, se utiliza frecuentemente para enriquecer poblaciones de células troncales, dado que se expresa en el cilio primario, sin embargo, su expresión es variable en las CTN pues no todas lo poseen y la presencia de cilios es más prominente en las células ependimales (Codega et al., 2014b; Coskun et al., 2008).

A pesar de la falta de marcadores específicos para las CTN, hay algunos perfiles de expresión que permiten la identificación de cada elemento celular del nicho neurogénico como se muestra en la Tabla 1.

#### **4.2 Células de amplificación transitoria o tipo C**

Hasta muy recientemente se pensaba que una vez que una CTN sale de quiescencia y se activa, se divide por división simétrica, generando nuevas células tipo B que mantienen el número de células troncales neurales estable en el nicho; o por división asimétrica, dando lugar a una célula tipo B y a una célula tipo C o de amplificación transitoria. Evidencia reciente sugiere que sólo el 20% de la CTN se auto-renuevan por división simétrica, mientras que el 80% de ellas no se autorenevan pero dividen de forma simétrica para dar lugar a dos células tipo C (Obernier et al., 2018).

Las células de este tipo se caracterizan por no tener procesos, tienen un núcleo más grande, y son más redondeadas. Su tasa de división es más alta que su predecesor celular, ya que estas células logran dividirse entre 3 y cuatro veces antes de diferenciarse a neuroblastos. Otra característica importante de las células tipo C es que se pueden encontrar en contacto con el parénquima estriatal y con las células del epéndima (Doetsch et al., 1997). Además, se localizan cerca de sus progenitores y frecuentemente se encuentran cerca de vasos sanguíneos formando pequeños agregados celulares cercanos a las células tipo A (Doetsch et al., 1997; Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011; Mamber et al., 2013).

La identificación de este tipo de células resulta menos compleja debido a que poseen una combinación de marcadores más específica: marcadores de proliferación, el EGFR, BLBP y Mash1. A pesar de que algunos de los marcadores antes mencionados también están presentes en las células tipo B, el potencial de proliferación de las células tipo C las convierte en un tipo celular relativamente fácil de identificar (Tabla 1).

#### **4.3 Neuroblastos**

En la zona sub ventricular, las neuronas jóvenes o neuroblastos (también conocidas como células tipo A) se derivan a partir de las células tipo C. Un fenómeno particular de este tipo celular es que antes de diferenciarse en neuronas glomerulares y periglomerulares en el

bulbo olfatorio, deberán abandonar la ZSV a través de un camino bien establecido, la corriente de migración rostral (CMR). Éstos se desplazan uno sobre otro en forma de cadenas en un proceso conocido como migración tangencial, que se diferencia de la migración radial que fundamentalmente ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso. Se sabe que las cadenas migratorias están rodeadas de glía que forma estructuras conocidas como tubos gliales, los cuales proveen soporte a las cadenas migratorias (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Wichterle et al., 1997b).

Los neuroblastos poseen una morfología alargada con un proceso que en su extremo más distal posee algo parecido a un cono de crecimiento que indica la punta líder. Este tipo celular posee la capacidad de dividirse entre una y dos veces más durante su recorrido por la CMR (Ponti et al., 2013). La identificación de este tipo celular está bien establecida, ya que son positivos a Doblecortina (DCX) y PSA-NCAM (Rousselot et al., 1995) (Tabla 1).

Los mecanismos por los cuales las cadenas migratorias se desplazan y saben en qué dirección debe ser su movimiento neto son complejos y aún siguen en estudio sin embargo se conocen algunas moléculas que se requieren para su migración. Un ejemplo es DCX, proteína asociada a microtúbulos que es importante para la migración neuronal durante el desarrollo, y en el ratón adulto participa la pérdida de la morfología bipolar y el movimiento de los neuroblastos (Francis et al., 1999; Koizumi et al., 2006; Moores et al., 2004).

#### **4.4 Otros componentes celulares del nicho de la ZV-ZSV**

##### **4.4.1 Microglía y astrocitos**

La glía se conforma de diferentes tipos celulares que antiguamente se creía eran elementos que solamente daban soporte estructural a las neuronas que habitaban el SNC. Sin embargo, se han identificado diferentes tipos celulares que componen la glía, todos con roles activos que participan en la homeostasis del SNC. Se reconocen cuatro tipos celulares como componentes de la glía: microglía, astrocitos, oligodendrocitos y epéndima.

Las células de la microglía son macrófagos especializados en el SNC que desempeñan las funciones como liberación de citocinas, fagocitosis, promover la homeostasis o la remodelación de sinapsis. Recientemente se ha descrito una población única de microglía que reside en el nicho neurogénico de la ZV-ZSV que posee propiedades morfológicas y funcionales diferentes. Esta población contribuye facilitando la sobrevivencia de los progenitores neuronales y en la migración hacia el bulbo olfatorio (Ribeiro Xavier et al., 2015).

Los astrocitos son responsables por promover soporte metabólico y estructural para las neuronas. Actualmente se sabe que los astrocitos producen una variedad de señales intercelulares, tanto solubles como asociadas a la membrana, que influyen en el desarrollo del SNC. Debido a que en el nicho de la ZV-ZSV se encuentran íntimamente asociados a los otros tipos celulares que ahí residen es probable que contribuyan en gran medida a

proveer el ambiente adecuado para que la neurogénesis ocurra. *In vitro*, se ha demostrado que las interacciones célula-célula entre los astrocitos y las CTN, son necesarias para promover la progresión a sus precursores neurales ( células tipo A) (Lim and Alvarez-Buylla, 1999), mientras que en el nicho del giro dentado del hipocampo se ha comprobado que los astrocitos que ahí residen promueven el destino neuronal de las NCS (Song et al., 2002). La identificación de los astrocitos se ha hecho típicamente con el marcador de citoesqueleto GFAP (proteína acídica fibrilar glial) o con el transportador de glutamato GLT1 en combinación con S100B (Emsley and Macklis, 2006; Oberheim et al., 2012).

#### 4.4.2 Epéndima

Las células endodimales forman un epitelio en monocapa que recubre la pared de los ventrículos laterales, estas células forman estructuras conocidas como rosetas o rehiletos. Las funciones del epéndima aún son especulativas pues se ha sugerido que pueden funcionar como CTN (Johansson et al., 1999). A pesar de esto, la mayoría de la evidencia apoya que estas células son quiescentes, no tienen propiedades de CTN (Capela and Temple, 2002; Doetsch et al., 1999) y no se activan incluso después de sufrir daño.

Las células endodimales también participan en la regulación del nicho al expresar la proteína Noggin, que promueve la neurogénesis al antagonizar la señalización por BMPs (proteínas morfogénicas de hueso) (Lim et al., 2000; Peretto et al., 2004). Además estas células secretan factores como el factor pigmentario derivado de epitelio (PEDF) que se sabe, promueve la auto renovación de las células troncales al aumentar la señalización por Notch o SDF-1 que estimula la movilidad de los neuroblastos (Ramírez-Castillejo et al., 2006). De igual forma el batido de sus cilios contribuye al flujo del líquido cefalorraquídeo dentro de los ventrículos.



CTNq	CTNa	TAPs	Neuroblastos	Ependimales
GFAP +++	GFAP +++	EGFR ++++	DCX ++++	CD133 ++++
Sox2 +++	EGFR ++	ASCL1		Nestina ++
CD133 ++	CD133 ++	Nestina ++		
GLT1 ++	Nestina ++	BLBP ++		
GLAST ++	GLT1 ++			
BLBP ++	GLAST ++			
	BLBP ++			

**Tabla 1.** Perfiles de expresión de los diferentes tipos celulares que conforman el nicho de la ZV-ZSV, la combinación de éstos, hacen posible la identificación de cada elemento dentro del nicho neurogénico. (CTNq, células neurales troncales quiescentes; CTNa, células troncales neurales activadas; TAPs, células de amplificación transitoria (por sus siglas en inglés).

### 3.4.3 Vasos Sanguíneos

La vasculatura, además del epéndima, delimita el nicho de la ZV-ZSV y ha adquirido relevancia al demostrarse que tanto las células tipo B2, las células tipo C y las células tipo A mantienen relaciones estrechas con los vasos sanguíneos. La vasculatura provee al nicho de factores que promueven el mantenimiento del nicho, y en el caso de los neuroblastos secretan factores que pueden servir de guía en el proceso de la migración tangencial a lo largo de la CMR (Goldberg and Hirschi, 2009). Se ha demostrado que la barrera hematoencefálica en este nicho es más permeable que en otras regiones no neurogénicas, por lo que es probable que estas características de la vasculatura faciliten la exposición directa de las CTN a los factores provenientes de la sangre (Tavazoie et al., 2008)

Entre las diferentes señales solubles provenientes de la vasculatura se encuentran las que promueven la proliferación y la diferenciación de los progenitores neurales, particularmente de las células tipo Ba y de las células tipo C. Por otro lado se ha observado que la vasculatura se orienta de forma paralela a los neuroblastos que migran por la CMR y que provee de algunas señales que guían las cadenas migratorias en su camino hacia el BO, como el PEDF (factor pigmentario derivado de epitelio), SDF-1, Betacelulina o BDNF.

## **5 Factores implicados en la regulación del nicho neurogénico de la ZV-ZSV: participación de los lípidos bioactivos.**

Entre los factores que han sido reconocidos como importantes reguladores del comportamiento de las células tipo B1 se encuentran el factor de crecimiento parecido a insulina 2 (IGF2), proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), WNTs, Sonic hedgehog (SHH) y ácido retinoico (Lehtinen et al., 2011). Las células del epéndima y la vasculatura, que se encuentran en estrecho contacto con las células tipo B, participan en la regulación de nicho al secretar factores como el factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF) o el factor derivado de estroma-1 (SDF-1), promoviendo la proliferación de los progenitores y la movilización de los neuroblastos de la ZV-ZSV, respectivamente (Lim and Alvarez-Buylla, 2014; Lim et al., 2000; Peretto et al., 2004). La administración directa del PEDF en los ventrículos laterales resulta en un aumento de la proliferación celular (Ramírez-Castillejo et al., 2006). En estudios *in vitro e in vivo*, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) estimula la neurogénesis tanto en el nicho neurogénico del hipocampo como en la ZSV (Jin et al., 2002). Por otra parte, el factor de crecimiento betacelulina (BTC), ha mostrado tener un efecto sobre la proliferación y la neurogénesis al incrementar la proliferación de las células tipo C a través de la activación de la vía de señalización de ERK (Doetsch et al., 2002; Gonzalez-Perez et al., 2009).

En un trabajo reciente de RNAseq de célula única de componentes celulares del nicho de la ZV-ZSV, se ha visto que el metabolismo de lípidos durante los estadios iniciales del proceso de neurogénesis está activo y que éste va disminuyendo conforme progresa la diferenciación de los precursores neurales de este nicho (Llorens-Bobadilla et al., 2015a). Aunque se conocen factores que influyen sobre la proliferación y la auto-renovación de las CTN del nicho, no se conoce mucho sobre los mecanismos que éstas ocupan para mantener el estado de quiescencia en la población de CTN. En 2014, se le dio notoriedad a la participación de los lípidos bioactivos, como factores importantes en la regulación de este nicho neurogénico. Se observó que tanto la prostaglandina D2 como la esfingosina-1-fosfato (S1P), juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la quiescencia de las CTN del nicho a través de la señalización mediada por los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) con los que son capaces de interactuar (Codega et al., 2014b). Estos estudios demuestran que la señalización y metabolismo de lípidos bioactivos también son importantes en la regulación del proceso neurogénico.

## **6 ¿Qué son los lípidos bioactivos y cómo se regulan?**

Para entender el rol de los lípidos como moléculas señalizadoras, es necesario saber qué son y cómo se regulan. Mucho tiempo se creyó que la función de los lípidos sólo era relevante si los pensábamos como reservas energéticas o como componentes estructurales de las membranas celulares, sin embargo en los últimos años se han descrito nuevos roles para los que se han denominado "lípidos bioactivos". Algunos lípidos

bioactivos llevan a cabo sus funciones a través de la interacción con receptores específicos, por ejemplo, receptores acoplados a proteína G. Estos derivados lipídicos juegan roles importantes en el desarrollo, en la homeostasis, en la proliferación celular, la migración, entre otros, y su regulación a la alta o a la baja ha sido implicada en diversas patologías. Por lo tanto, la regulación de los niveles de lípidos bioactivos es un proceso fundamental para la homeostasis de los organismos (Hannun and Obeid, 2008).

## **7 Regulación de lípidos bioactivos por las PLPPs**

Lípidos fosfatados como el ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, esfingosina-1-fosfato y ceramida-1-fosfato son intermediarios en la biosíntesis de fosfolípidos y esfingolípidos, además de que juegan papeles importantes en procesos de señalización intra y extracelular. La desfosforilación de estos lípidos termina con su actividad señalizadora y en algunos casos se generan productos con actividades biológicas adicionales (McDermott et al., 2006). Una familia de enzimas que juegan un papel importante en la desfosforilación de estos lípidos son las PLPPs (del inglés Phospholipid Phosphatases, antes PAP2s o LPPs).

Históricamente estas enzimas fueron inicialmente incluidas en la familia de las PAPs (Phosphatidic Acid Phosphatases), las cuales tienen como principal función la hidrólisis de fosfatidato (Kok et al., 2012). En 1991, Jamal y colaboradores fueron los primeros en identificar que había dos tipos de actividades de PAPs en mamíferos, las cuales presentaban diferencias en su localización subcelular y en sus propiedades bioquímicas. La actividad tipo PAP1 requería de magnesio, eran inhibidas por N-etilmaleimida (NEM) y se localizaba en la fracción citoplásmica. En contraste la actividad tipo PAP2, no requería de magnesio, era insensible a NEM y se encontraba asociada a la fracción membranal (Jamal et al., 1991).

A finales de la década de los 90s se reportó la clonación de los dos primeros miembros de la familia de enzimas tipo PAP2. Al caracterizar su actividad hidrolítica se observó que además de defosforilar al ácido fosfatídico (PA), también eran capaces de defosforilar ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida-1-fosfato (C1P) y esfingosina-1-fosfato (S1P) con semejante eficiencia (Kai et al., 1996; Kai et al., 1997). Para diferenciar sus propiedades bioquímicas, y variedad de sustratos, a las enzimas tipo PAP2 se les denominó LPPs (del inglés Lipid Phosphate Phosphatase), pero en el 2015 el comité de nomenclatura de genes humanos modificó y unificó la nomenclatura de esta familia y proteínas relacionadas, motivo por el cual desde entonces a la fecha se denominan PLPPs.

Se conocen tres isoenzimas pertenecientes a la familia de las PLPPs, PLPP1, PLPP2 y PLPP3, cada una codificada por genes independientes presentes en los cromosomas humanos 5q11, 19p13 y 1p32.2, respectivamente. Estos genes codifican proteínas integrales de membrana de aproximadamente 300 aminoácidos con 40% de identidad en la secuencia primaria de aminoácidos. La mayor parte de los aminoácidos conservados se encuentra en los dominios catalíticos conocidos como C1, C2, y C3 (Kai et al., 1997; Kok et al., 2012; Pyne et al., 2004) que están localizados en la segunda y tercer

asa extracelular (Escalante-Alcalde et al., 2003). Además poseen un sitio para N-glicosilación en la segunda asa entre los dominios C1 y C2 (Figura 3). El dominio C1 es el responsable del reconocimiento del sustrato, mientras que los dominios C2 y C3 contienen los aminoácidos que son necesarios para la actividad de fosfolipasa (Sigal et al., 2005). El dominio C3 contiene una histidina altamente conservada que actúa como un nucleófilo que atrae el grupo fosfato para formar un intermediario transitorio "histidina-fosfato"; mientras que la histidina en C2 está involucrada en romper la unión con el grupo fosfato para liberar el lípido resultante que ya no contiene el grupo fosfato. El dominio C1 contiene además residuos de lisina y arginina que junto a un residuo del dominio C3 ayudan a estabilizar al sustrato en el sitio activo (Tang et al., 2015).

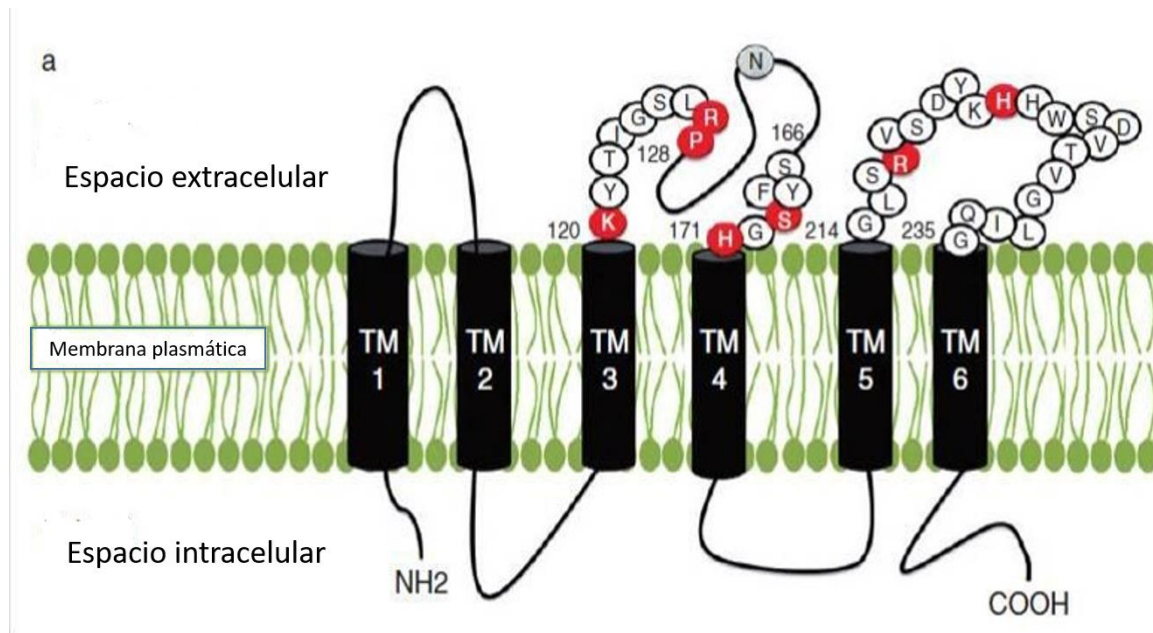
La topología de su sitio catalítico sugiere que las PLPPs participan como reguladores de la señalización extracelular catalizando la desfosforilación de lípidos bioactivos como el LPA y la S1P (Escalante-Alcalde et al., 2007; Kok et al., 2012). Las PLPPs pueden también estar localizadas en membranas intracelulares como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y en compartimientos endosomales, esto dependiendo del tipo celular y la isoenzima (Kai et al., 1997). En este caso el sitio activo se localiza del lado luminal. Las PLPPs pueden formar homo- y hetero-dímeros capaces de funcionar independientemente en las reacciones de desfosforilación. Se cree que este tipo de asociaciones podrían ser responsables de la localización subcelular de estas enzimas, sin embargo no es una asociación necesaria para que funcionen correctamente (Tang et al., 2015).

## **8 La fosfatasa de fosfolípidos 3 (PLPP3)**

La PLPP3 humana se caracteriza por contener una secuencia de unión a integrinas, arginina-glicina-aspartato (RGD), (arginina-glicina-ácido glutámico) RGE en ratón, por lo que la expresión de esta enzima incrementa o modifica las interacciones célula-célula, de forma independiente a su actividad catalítica, a través de la unión con integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_5\beta_1$ . Esta característica de la PLPP3 es relevante en células endoteliales para la formación de vasos sanguíneos (Brindley and Pilquill, 2009) pero se desconoce si participa en otros procesos del desarrollo.

La PLPP3 tiene un rol específico y no redundante durante el desarrollo y es que se ha visto que, a diferencia de los otros miembros de la familia, la deficiencia de esta enzima en ratones knock out es letal en estados tempranos del desarrollo embrionario, aproximadamente en el día embrionario 9.5, debido a defectos severos del desarrollo del sistema vascular del saco vitelino y en la formación de la placenta (Escalante-Alcalde et al., 2003), además de alteraciones en la formación del tubo neural (Escalante-Alcalde et al., 2009; Escalante-Alcalde et al., 2007). Debido a la letalidad temprana que su deficiencia provoca se ha requerido de otras estrategias que permitan establecer cuál es su función en diversos procesos y etapas del desarrollo. Por ejemplo en otro trabajo del laboratorio, se observó que la deficiencia de PLPP3 provoca una disminución de los precursores neurales derivados de la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón, al afectar su

proliferación e incrementar la muerte celular por apoptosis (Sanchez-Sanchez et al., 2012) sugiriendo que la enzima puede tener un papel en el desarrollo del sistema nervioso.



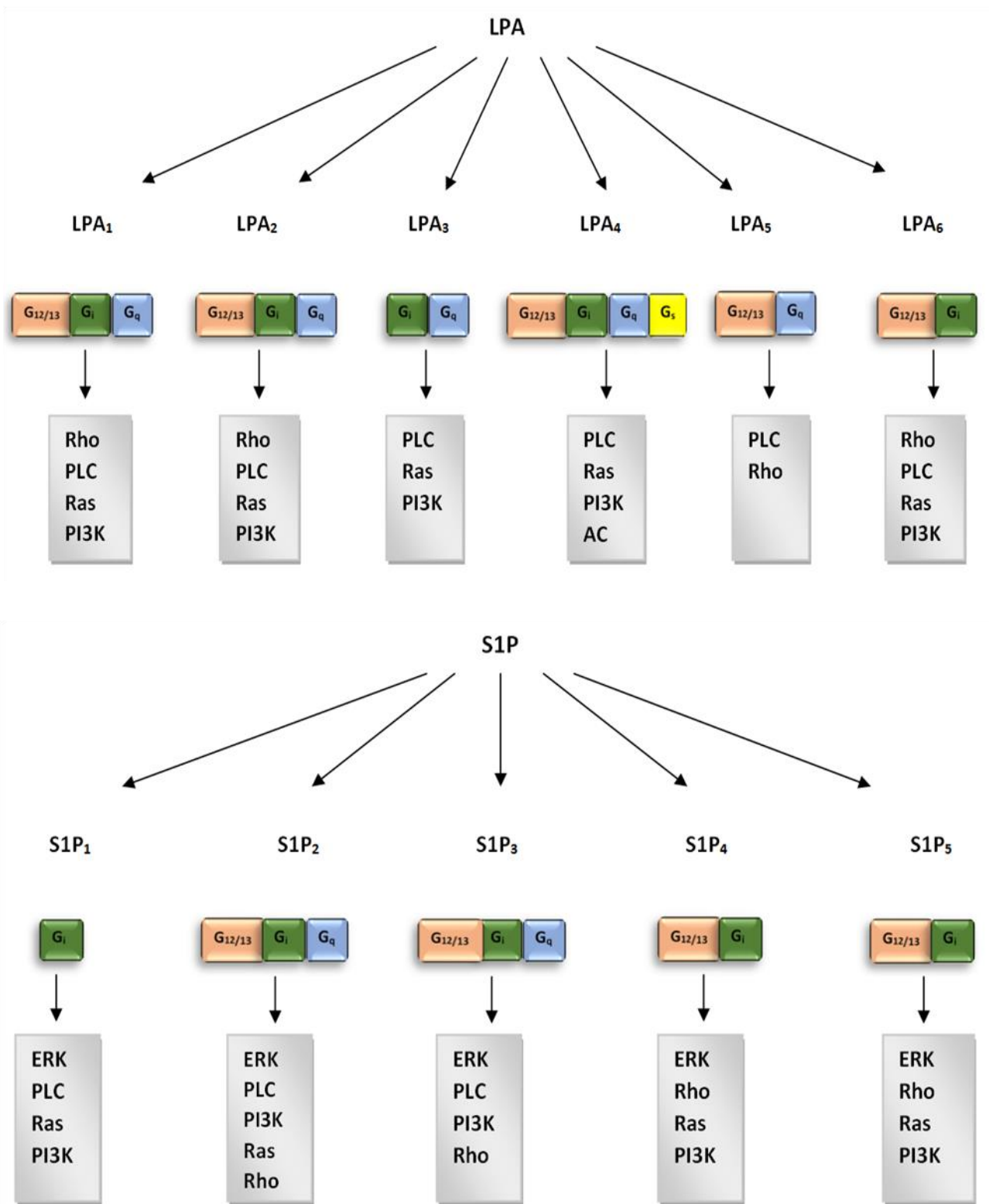
**Figura 3.** Estructura de las PLPPs. Las PLPP's contienen seis dominios transmembranales y un sitio catalítico hidrofílico compuesto por tres dominios conservados. Se ha propuesto que uno de los dominios catalíticos se une al sustrato, mientras que los otros dos contribuyen a la desfosforilación del sustrato. El sitio catalítico típicamente se ubica del lado extracelular, cuando la PLPP3 está ubicada en la membrana celular y del lado del lumen cuando se ubica en membranas intracelulares. Una característica extra de la PLPP3 es su potencial para formar homo y hetero oligómeros. (Choi and Chun, 2013).

Como todos los miembros de esta familia, la PLPP3 hidroliza el grupo fosfato del PA, C1P, LPA y S1P, sin embargo, la gran mayoría de los estudios realizados con esta enzima se han enfocado principalmente en su actividad sobre S1P y LPA. Tanto la S1P como el LPA actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y las vías de señalización involucradas se asocian con un gran número de procesos celulares como diferenciación, migración y muerte celular. Es por eso que las PLPPs cobran importancia, ya que éstas regulan las concentraciones disponibles lípidos bioactivos tanto intracelularmente como extracelularmente (Brindley and Pilquill, 2009; Escalante-Alcalde et al., 2003; Sanchez-Sanchez et al., 2012).

### 8.1 Ácido lisofosfatídico (LPA)

El LPA es un metabolito en la síntesis de fosfolípidos el cual se sintetiza en una gran variedad de tejidos. Se encuentra en concentraciones que van desde 0.1  $\mu\text{M}$  en plasma hasta 10  $\mu\text{M}$  en suero (Yung et al., 2015). Dentro del SNC, el LPA se encuentra en vasos sanguíneos, médula espinal, plexo coroideo, meninges y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Yung et al., 2014). La vía de síntesis más importante de LPA es a través de la enzima Autotaxina (ATX) y puede ser degradado por las PLPPs mediante la liberación de un grupo

fosfato para producir monoacil glicerol (MAG) (Brindley and Pilquill, 2009).



**Figura 4.** Esquema de los receptores descritos de LPA y S1P, y las vías de señalización que desencadenan. ESCRIBIR UNA EXPLICACIÓN DE LO QUE SIGNIFICAN TODAS LAS

## ABREVIATURAS.

Actualmente se conocen seis receptores para LPA (LPARs) bien caracterizados denominados LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>6</sub>. Estos receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembranales activan diferentes vías de señalización dependiendo de la proteína G a la que se acoplen (G<sub>12/13</sub>, G<sub>q/11</sub>, G<sub>i/o</sub>, y G<sub>s</sub>.) (Yung et al., 2014) (Figura 4). Este lípido juega papeles importantes en el desarrollo del sistema nervioso y su reparación, en el dolor neuropático, en la artritis reumatoide y en la obesidad, procesos en los que la intervención de las PLPPs podría estar involucrado (Yung et al., 2015). Estudios previos con este lípido también han demostrado su importancia en procesos como vasculogénesis y la formación de la cresta neural en el desarrollo embrionario de anfibios (Tanaka et al., 2006). Además estimula la agregación plaquetaria y la migración de fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos cuando hay una lesión. El LPA también media la extravasación de linfocitos para mantener la homeostasis del sistema inmune (Takeda et al., 2017; Takeda et al., 2015).

### 8.2 Esfingosina-1-fosfato (S1P)

Este lípido bioactivo se forma principalmente intracelularmente, a partir de la fosforilación de esfingosina por las esfingosina cinasas 1 y 2 (SphK1/2), después este lípido es transportado extracelularmente por transportadores ABC (Kim et al., 2009). En el medio extracelular el proceso de "aclaramiento" de S1P sucede únicamente por la actividad de las PLPPs (Pyne et al., 2009). S1P está presente en un gran número de organismos, incluidas plantas, levaduras y en mamíferos. Ha sido implicado en una amplia variedad de funciones fisiológicas que van desde el crecimiento celular, la supresión de la muerte celular, hasta la maduración de la vasculatura y su permeabilidad; también se ha reportado que S1P es necesaria para la correcta migración de los linfocitos (Pyne et al., 2009). Su mecanismo de acción se desencadena a partir de unirse a uno de los 5 receptores de S1P descritos (S1P<sub>1</sub>–S1P<sub>5</sub>) los cuales activan diferentes tipos de proteínas G, que a su vez activan vías de señalización como Rho/Rock, MAPK y PLC, entre otras (Figura 4). El S1P<sub>1</sub> se expresa en los precursores neurales y se ha descrito que es capaz de afectar la neurogénesis embrionaria, la migración celular y la extensión de procesos neuríticos mediado por el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Martin and Sospedra, 2014).

## 9 Lisofosfolípidos y la PLPP3 en la neurogenesis adulta.

Se ha descrito que la señalización mediada por LPA contribuye a regular la neurogénesis en el hipocampo adulto ya que la ausencia de su receptor LPA<sub>1</sub> reduce la neurogénesis (Matas-Rico et al., 2008). El efecto del LPA sobre su receptor LPA<sub>1</sub> parece estar más relacionado con un incremento en la supervivencia de las nuevas neuronas que con efectos sobre la proliferación de progenitores neuronales ya que la infusión continua de LPA en el hipocampo produce un incremento neto en la neurogénesis sin alterar el estado proliferativo sus progenitores (Walker et al., 2016).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la S1P parece contribuir a mantener el estado quiescente de las CTN en el nicho de la ZV-ZSV aunque se desconoce a través de cuál de sus receptores lo hace. El mRNA de uno de sus receptores, el *S1pr1*, se expresa muy abundantemente en las paredes de los ventrículos laterales, y en la ZSG del giro dentado (Figura 5), aunque no existen estudios que indiquen que tipos celulares expresan este receptor dentro de ambos nichos neurogénicos. Estudios de RNAseq de célula única indican que el *S1pr1* se expresa abundantemente en las CTNq del nicho de la ZV-ZSV y que su expresión baja una vez que éstas se activan (Shin et al., 2015). Estudios del mismo tipo indican que en la ZSG del giro dentado del hipocampo genes relacionados con el metabolismo de esfingolípidos también se expresan con la misma cinética. Interesantemente el mRNA del *S1pr1* también se expresa más abundantemente en la ZSG, sitio donde se encuentran localizados los somas de las CTN de este nicho (Figura 5). Lo anterior sugiere que la regulación de la concentración de S1P, y por lo tanto de su señalización, puede ser un mecanismo importante para el mantenimiento de la quiescencia en las CTN del nicho de la ZV-ZSV y probablemente también en la ZSG.

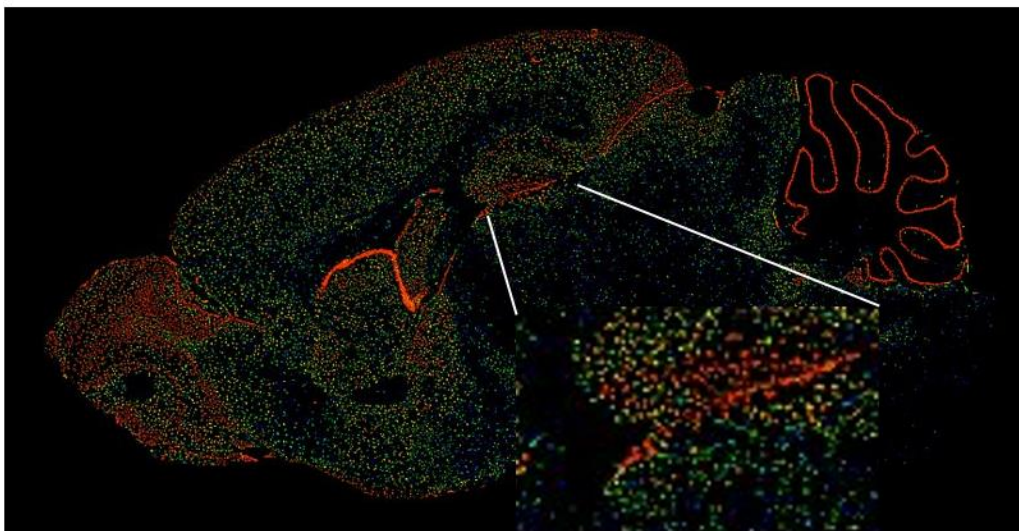
Se sabe, por estudios de hibridación *in situ* o expresión de reporteros de su transcripción, que la PLPP3 se expresa muy abundantemente en la glía de Bergman en el cerebelo, la cual es un tipo de astrocito especializado importante para el desarrollo y la fisiología del cerebelo que además expresa algunos marcadores que son típicos de CTN (López-Juárez et al., 2011). También se expresa muy abundantemente en la ZSG del giro dentado y las paredes de los ventrículos laterales, nichos neurogénicos del ratón adulto, y en el bulbo olfatorio (López-Juárez et al., 2011). Nuestro grupo además tiene evidencia de que en el giro dentado del hipocampo del ratón adulto, la PLPP3 se expresa en CTN además de en los astrocitos de toda la región, y que su ausencia reduce la proliferación de progenitores neurales de hipocampos de animales de 8 semanas de edad tanto *in vivo* como *in vitro* (Castro- Hernández, 2015; Cotzomi-Ortega, 2015).

Adicionalmente, trabajos previos de nuestro grupo y nuestros colaboradores han puesto de manifiesto que la PLPP3 regula la disponibilidad de la S1P y la señalización del receptor S1P<sub>1</sub> en varios sistemas incluyendo en cerebro adulto ya que la ausencia de la enzima produce una importante regulación a la baja de la expresión en superficie del S1P<sub>1</sub> (Bréart et al., 2011; López-Juárez et al., 2011).

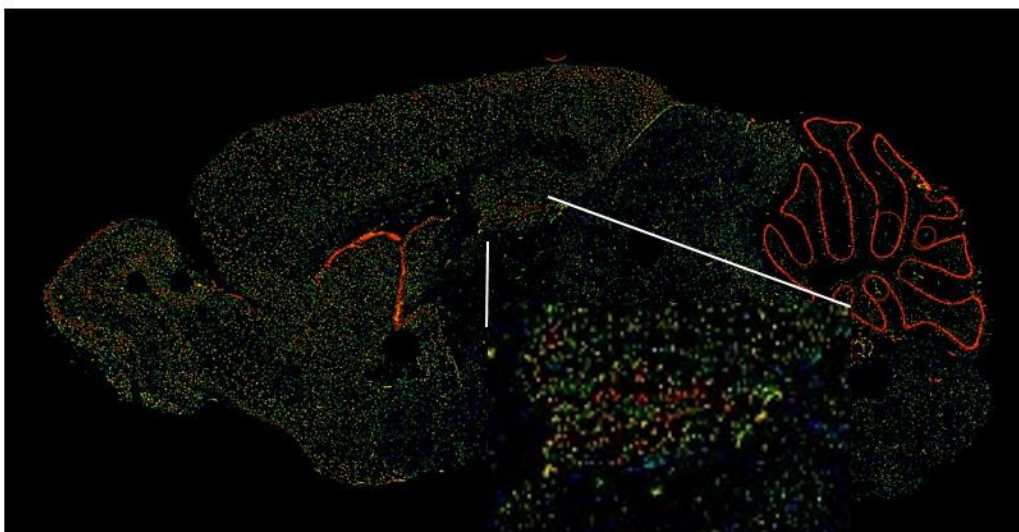
En conjunto, estas observaciones sugieren que la concentración de S1P, y por lo tanto de su señalización, puede ser regulada por la PLPP3 en el nicho de la ZV-ZSV. Sin embargo, a la fecha se desconoce como la PLPP3 y el S1P<sub>1</sub> están distribuidos, y en qué tipos celulares se expresan dentro de este nicho. Este trabajo tuvo precisamente como finalidad realizar un análisis detallado de la expresión de ambas proteínas, en combinación con otros marcadores, y explorar si la ausencia de la enzima tiene algún efecto sobre la neurogénesis del nicho de la ZV-ZSV.



*PLPP3*



*S1pr<sub>1</sub>*



**Figura 5.** La expresión de *Plpp3* y del receptor de *S1pr1* es abundante en el nicho neurogénico de la zona subventricular (ZSV). Ensayos de hibridación *in situ* tomadas del Allen Brain Atlas (<https://portal.brain-map.org/>) permiten observar la expresión del mensajero de *Plpp3* y de *S1pr1* en el cerebro de ratón adulto. Es notable que tanto el mensajero de la *Plpp3* como del receptor a *S1pr1* tienen distribuciones semejantes. Se ha ampliado la ZSG del giro dentado para una mejor apreciación de la zona.

## 10 Justificación

La PLPP3 se expresa abundantemente en el nicho neurogénicos de la zona subventricular. Debido a su importancia en la regulación de lípidos bioactivos, como la S1P, es necesario establecer en que tipos celulares de expresa para predecir cómo ésta podría participar en

la regulación del proceso de neurogénesis del nicho ZV-ZSV.

## **11 Hipótesis**

La expresión de PLPP3 en las ZV-ZSV difiere en los diferentes grupos celulares y favorece el mantenimiento de la quiescencia de las CTN a través de regular los niveles de S1P.

### **11.1 Objetivo general**

Identificar qué tipos celulares expresan la PLPP3 y el S1P<sub>1</sub> en el nicho neurogénico de la zona sub ventricular y su participación en el mantenimiento de la quiescencia?

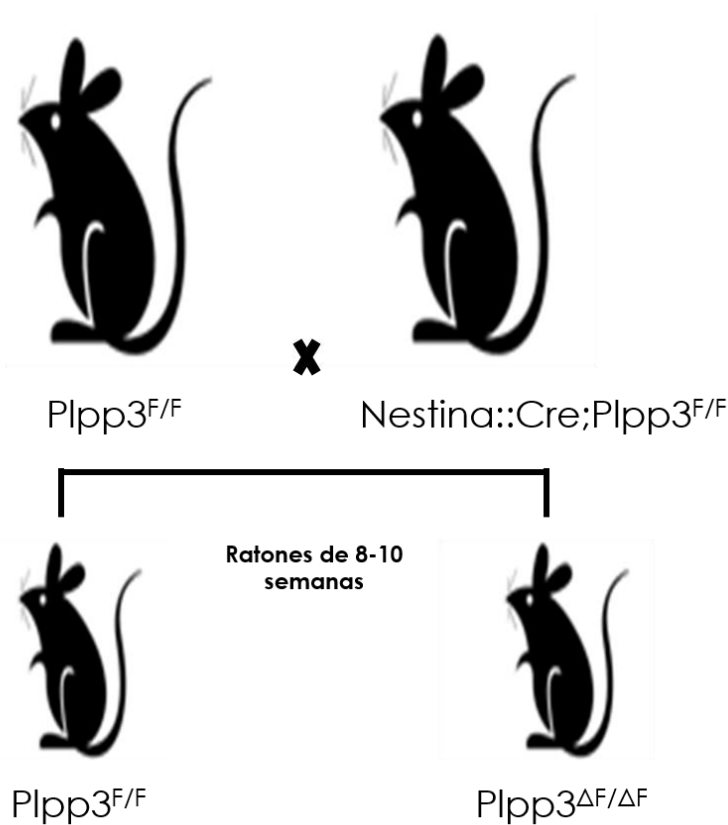
### **11.2 Objetivos particulares**

1. Identificar el tipo o tipos celulares que expresan la enzima PLPP3 en la ZSV.
2. Determinar la distribución del receptor S1P<sub>1</sub> en la ZSV.
3. Establecer si se altera la expresión del receptor S1P<sub>1</sub> en el nicho de la ZV-ZSV de animales que carecen de la enzima en sistema nervioso.
4. Evaluar si la ausencia de la PLPP3 produce alteraciones en el proceso neurogénico del nicho de la ZV-ZSV.

## 12 Metodología

### 12.1 Animales

Debido a que la delección de *Plpp3* es letal en estadios tempranos del desarrollo embrionario, fue necesario usar un ratón que sólo contiene la delección de la enzima en un tejido específico, en este caso el SNC. En el laboratorio contamos con el mutante condicional de *Plpp3*, este modelo se diseñó mediante el uso del sistema de recombinación *Cre/loxP* (Escalante-Alcalde et al., 2007).



**Figura 6.** Para obtener el mutante condicional carente de PLPP3 en SNC se hicieron cruces entre hembras  $Plpp3^{F/F}$  y machos  $Nestina::Cre;Plpp3^{F/F}$ . Se eligieron como mutantes condicionales a la progenie que poseyera la expresión de la recombinasa Cre, y que por lo tanto sufrió delección de la región flanqueada por las secuencias *loxP* ( $\Delta F/\Delta F$ ) mientras que lo que no la heredaron fueron considerados como controles ( $F/F$ ).

Para la obtención de estos ratones carentes de PLPP3, trabajamos con ratones que contienen dos genotipos, uno que contiene sitios *loxP* flanqueando los exones 3 y 4 del gen de *Plpp3* y otro ratón que además expresa de la recombinasa Cre, dirigida por el promotor de una proteína preferente del tejido neural, en este caso nestina, lo que quiere decir que sólo aquellas células que expresen nestina expresarán la recombinasa Cre (figura 6).

Cuando ocurre una recombinación exitosa, se genera una proteína trunca que carece de actividad enzimática debido a que los exones 3 y 4 de *Pfpp3* han sido eliminados. Individuos de ambos genotipos se mantienen en constante reproducción con la finalidad de obtener camadas que hayan heredado la recombinada Cre y que por lo tanto tengan la delección en *Pfpp3*.

Una vez que obtenidas las camadas, éstas se genotipificaron máximo a las 3 semanas de edad. Individuos de genotipo F/F fueron empleados para realizar los ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos contra diferentes marcadores (ver tabla abajo). Además empleamos un ratón reportero *GFAP::GFP* que fue amablemente donado por el Dr. Araulfo Martínez Torres del Instituto de Neurobiología. Esta línea de ratones expresa la proteína verde fluorescente (EGFP) dirigida al promotor de *GFAP*.

## 12.2 Genotipificación

Una vez que se obtienen las camadas provenientes de cruzar ratones FF y  $\Delta F/\Delta F$ , fue necesario identificar si las crías poseían la mutación resultante de la expresión de la recombinasa Cre en el SNC.

Para saber esto, se sigue un protocolo de dos pasos.

Primero.-Extracción de ADN a partir de un pequeño corte en la cola de los ratones obtenidos a las 3 semanas de edad.

*Para lisar las colas de ratón para la extracción de DNA:*

- 1.-Agregar en un tubo eppendorf 350  $\mu$ l de buffer de lisis (Ver anexo).
- 2.- Se corta la punta de la cola del ratón a genotipar.
- 3.- Se agregan 50  $\mu$ l de proteinasa K (0.895  $\mu$ g)
- 4.- Se incuba 2-3 horas a 56°C con agitación (850 rpm) o toda la noche a 37°C.

*Extracción de DNA mediante el uso de fenol-cloroformo:*

- 1.-Agregar a cada muestra 1/2 vol de fenol y agitar vigorosamente.
- 2.- Agregar 1/2 vol de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y agitar.
- 3.- Centrifugar a máxima velocidad por 5 min (13,000 rpm) y separar la fase acuosa en un tubo nuevo.
- 4.- Agregar un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), mezclar vigorosamente y centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Nuevamente separar la fase acuosa.
- 5.- Precipitar el DNA con 1 vol. de isopropanol e incubar 1 hora a -70°C.
- 6.- Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos.
- 7.- Retirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500  $\mu$ l de etanol al 70%

Resuspender el DNA en 50  $\mu$ l de buffer TE e incubar a 37°C durante al menos 2 horas.

Segundo.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con secuencias de oligonucleótidos diseñados previamente en el laboratorio (Escalante-Alcalde et al., 2007).

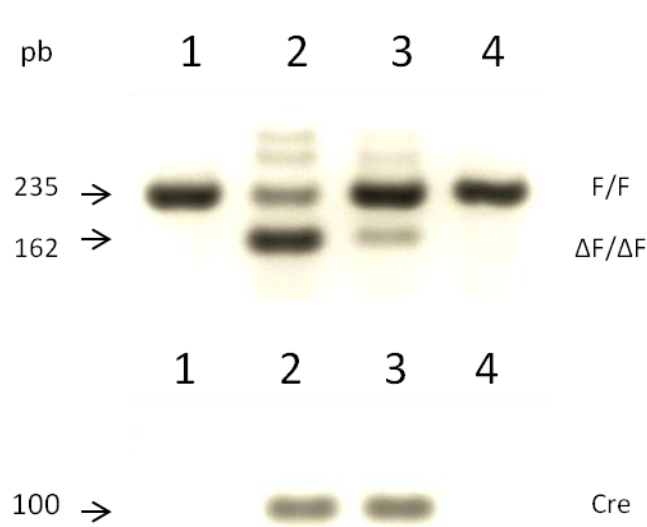
Nombre	Secuencia
<b>HLox</b>	5' GAA GTG CCA TTA CTC TCT CAGC 3'
<b>HLox3'</b>	5' CCA GGG TGC TAT CTA TCT GTA AC' 3'
<b>NLox5'</b>	5' CTA CAG ATG TCA GTC AGT GTG G ' 3'
<b>Cre (sentido)</b>	5' GAAGTGCCATTACTCTCTCAG ' 3'
<b>Cre (antisentido)</b>	5' GTG AAA CG CAT TGC TGT CAC TT 3'

Reacciones para PCR utilizadas (25 µl por reacción):

	Cantidad	Concentración final
<b>Buffer 10x</b>	2.5 µl	1x
<b>dNTPs (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>HLox 5' (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>HLox 3' (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>NLox 5' (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>Taq Polimerasa</b>	0.5 µl	1U
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	19 µl	
<b>DNA</b>	1 µl	

	Cantidad	Concentración final
<b>Buffer 10x</b>	2.5 µl	1x
<b>dNTPs (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>Cre 5' (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>Cre 3' (10 mM)</b>	0.5 µl	0.2 mM
<b>Taq Polimerasa</b>	0.5 µl	1U
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	19 µl	
<b>DNA</b>	1 µl	

Una vez que se obtuvieron los productos de amplificación del DNA por PCR, éstos se separaron mediante electroforesis, se utilizó una corriente de 100 V durante una hora. Las muestras se depositaron en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X adicionado con bromuro de etidio. Los geles se observaron en un transiluminador de luz UV (Figura 7).

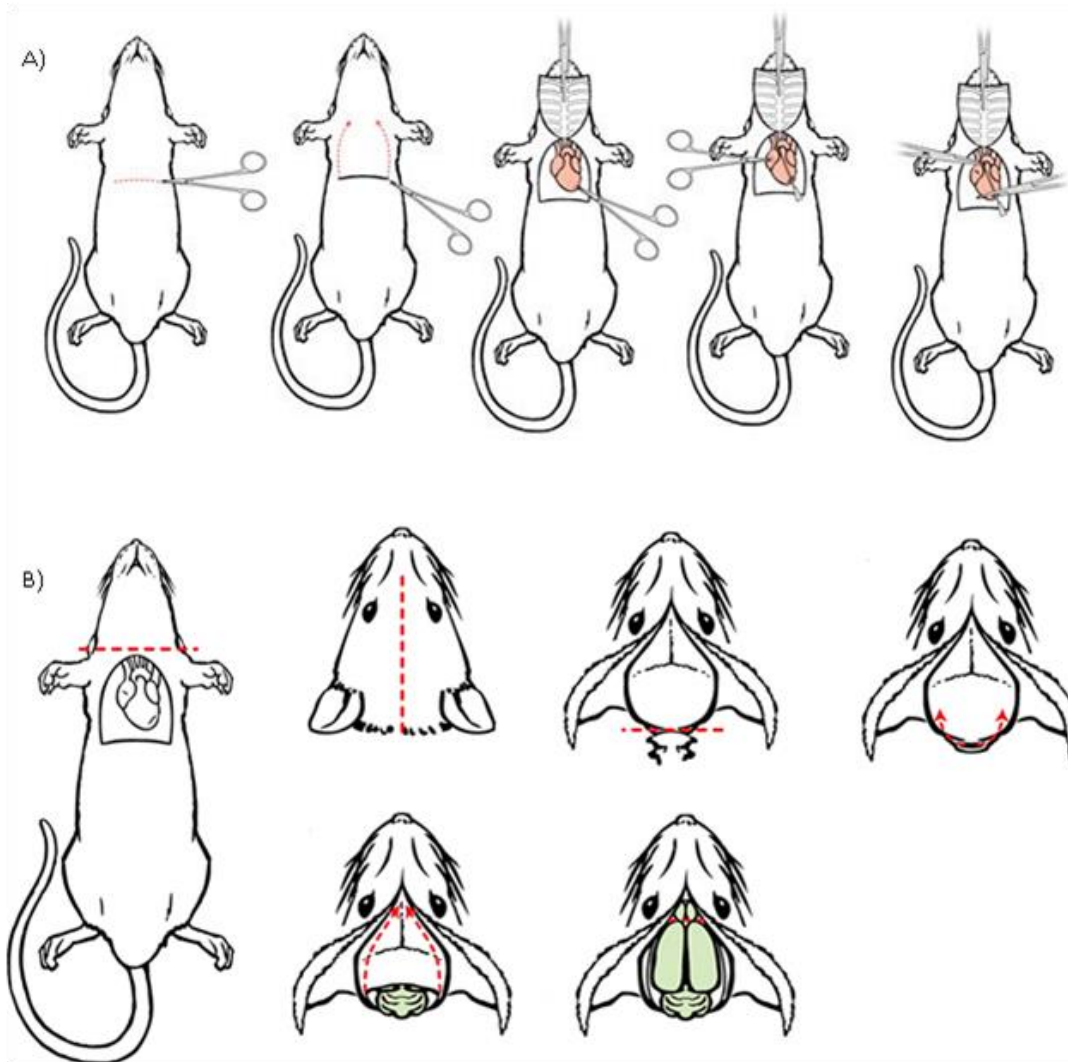


**Figura 7.** Gel de agarosa con los genotipos de camadas obtenidas a partir de la cruce entre hembras  $Ptpp3^{F/F}$  y machos  $NesCre;Ptpp3$ . El carril 1 y 4 corresponden a ratones que sólo poseen los sitios F/F pero que no heredaron la recombinasa Cre, mientras que los carriles 2 y 3 muestran las dos variantes posibles de un genotipo  $\Delta F/\Delta F$ . Sólo se emplearon individuos donde el resultado fue como en el carril 3 (banda superior más intensa), mientras que los individuos con bandas de intensidad como en el carril 2 se descartaron ya que fueron individuos donde uno de los alelos se recombinó espontáneamente en la línea germinal.

### 12.3 Perfusión y fijado de tejidos.

El objetivo de perfundir y fijar el cerebro es preservarlo en buen estado, parecido al que tendría estando vivo, por lo que perfundir la solución fijadora a través del sistema circulatorio permite preservar mejor el tejido.

- 1.- Se anestesiaron ratones con una dosis de Avertina 2.5 % (15  $\mu$ l/gr peso).
- 2.- Una vez que se determinó la anestesia profunda, se hizo una incisión abdominal justo bajo la caja torácica y se separó cuidadosamente el hígado del diafragma.
- 3.-Se cortó cuidadosamente el diafragma y la caja torácica para dejar expuesto el corazón y los pulmones. Con unas pinzas se sujeta el esternón, tal y como indica la figura, de tal forma que el corazón y los grandes vasos queden claramente visibles (Figura 8 ).



**Figura 8.** Procedimiento detallado de perfusión intracardiaca y de la subsecuente extracción de un cerebro de ratón adulto. A) Diagrama de los cortes que deben realizarse para exponer la cavidad torácica y tener acceso al corazón de forma que la punción en el ventrículo izquierdo sea eficiente. B) Una vez que se ha perfundido y fijado el tejido, el siguiente paso es extraer cuidadosamente el cerebro, tal y como se indica en B. Tomado y modificado de (Gage et al., 2012).

4.- Se inserta la punta de una aguja en la punta inferior del ventrículo izquierdo y con la ayuda de unas tijeras finas se hace una incisión en el atrio derecho del corazón para crear una hemorragia importante, teniendo cuidado de no lesionar ninguno de los grandes vasos. Se hacen pasar aproximadamente 20 ml de NaCl 0.9% hasta que ocurra el blanqueamiento de las extremidades y de órganos internos como el hígado lo que provee una señal clara de que la perfusión ha sido exitosa.

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Dilución</b>
<i>Anti-PLPP3 (hecho a solicitud, SIGMA)</i>	1:400
<b>Para identificar células troncales tipo B</b>	
<i>Anti-GFAP (SIGMA)</i>	1:500
<i>Anti-CD133 (BioLegend)</i>	1:100
<b>Para identificar células Ba, progenitores neurales tipo C y Epéndima.</b>	
<i>Anti-Nestina (Millipore)</i>	1:200
<b>Para identificar neuroblastos (Tipo A)</b>	
<i>Anti-Dcx (Santa Cruz biotechnology)</i>	1:400
<b>Para identificar astrocitos</b>	
<i>Anti-GLT1 (Millipore)</i>	1:200
<i>Anti-EGD1/S1P<sub>1</sub> (Santa Cruz biotechnology)</i>	1:200
<b>Para identificar astrocitos y epéndima</b>	
<i>Anti-S100B (Millipore)</i>	1:100

#### 12.4 Inmunofluorescencia

Usamos la técnica de inmunofluorescencia en la que hicimos uso de anticuerpos específicos que fueron detectados con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos para observar la distribución de las proteínas de interés. Después de la perfusión los cerebros disectados fueron fijados en PFA 4% por 16 horas a 4°C y equilibrados en sacarosa al 30%. Los cerebros se embebieron en O.C.T y haciendo uso del criostato se obtuvieron cortes coronales de 50 µm. Las rebanadas resultantes fueron puestas en flotación en PBS y posteriormente acomodadas en portaobjetos.

- 1.- Los cortes coronales fueron lavados 3 veces con PBS, 10 minutos cada uno.
- 2.- Se agregó una solución de glicina 0.1 M para eliminar todos los residuos de PFA que hayan quedado libres.
- 3.- Se lavó nuevamente con PBS 1, 3 veces, 10 minutos.
- 4.- Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con Blocking Reagent 1% (Roche) /0.2% Tritón X-100 en PBS.
- 5.- Se incubó con el primer anticuerpo en solución de bloqueo durante 24-48 hrs a 4°C. Pasado el tiempo de incubación del primer anticuerpo.
- 6.- Nuevamente se hicieron 3 lavados con PBS.



- 7.- Se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 8.- Se hicieron 3 lavados con PBS1.
- 9.- Se tiñeron los núcleos Hoechst (1:1000, stock 1 µg/ml), durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 10.- Se realizaron 3 breves lavados con PBS.
- 11.- Se colocó solución de montaje (Fluoromount-G) y se montaron las muestras con un cubreobjetos.
- 12.- Las imágenes fueron adquiridas usando el microscopio confocal FV10i (Olympus).

### Anticuerpos secundarios

<b>Alexa Fluor 488</b>	<i>Gallina anti-ratón, 21200, Invitrogen</i>
<b>AlexaFluor 568</b>	<i>Burro anti-cabra, A11031, Invitrogen</i>
<b>Alexa Fluor 594</b>	<i>Gallina anti-conejo, A214442, Invitrogen</i>

### 12.5 Ensayos de marcaje, seguimiento y cuantificación de células con BrdU

Se usó BrdU, análogo de timidina, para marcar las células que se encontraban en la fase S del ciclo celular. Posteriormente las células que incorporaron la BrdU se identificaron mediante el uso de anticuerpos específicos.

Para estos ensayos se utilizaron sólo ratones machos. Se seleccionaron individuos de ambos genotipos (F/F, controles y mutantes  $\Delta F/\Delta F$ ) que fueran hermanos de camada y que tuvieran entre 8-10 semanas de edad. A éstos se les realizó lo siguiente:

- 1.- Se administró BrdU intraperitonealmente (50 mg/kg) cada 12 horas, durante cuatro días. Después de la última inyección se dejaron pasar 14 días antes del sacrificio (Figura 9).



**Figura 9.** Protocolo de administración de BrdU para identificar células que se han diferenciado a partir de células troncales neurales. El protocolo consiste en cuatro días de administración, dos veces al día más un periodo de 14 días de reposo previo sacrificio por eutanasia del sujeto experimental.

- 2.- Para la detección de la marca de BrdU en células Dcx positivas se hizo primero la detección de Dcx con el mismo procedimiento que para una inmunofluorescencia, descrita anteriormente.

- 3.- Posteriormente se utilizó el Kit de detección de BrdU (Roche) como se indica a continuación:

- Se usó el anticuerpo anti-BrdU (1:100) en la solución de incubación. Contendida en el Kit y se incubó 45 min a 37°C.

- Se hicieron 3 lavados con PBS (pH 7.4)
- Se incubó con anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (1:100) 45 minutos a 37°C
- Seguido de 3 lavados con PBS.
- Finalmente se incubó con Hoechst como se indicó anteriormente.

4.- Se montaron las muestras agregando solución de montaje Fluoromount G y se cubrieron con un cubreobjetos.

5.- Las imágenes fueron adquiridas usando el microscopio confocal FV10i (Olympus).

Para la cuantificación del número de células BrdU<sup>+</sup> debe aclararse que los cortes de cerebro estaban montados en las laminillas mediante el método fraccionador, que nos asegura que en cada laminilla tenemos una fracción representativa de la ZSV del cerebro de un ratón (Encinas and Enikolopov, 2008).

El método fraccionador consiste en hacer cortes de toda la zona sub ventricular y repartirlos en varios pozos de forma equitativa, de modo que el primer corte sea depositado en el primer pozo, el segundo en el segundo, y así sucesivamente hasta terminar con toda la zona sub ventricular. En nuestro caso quedó contenida en 6 pozos diferentes (Figura 10).

Para contar las células positivas a BrdU se contaron todas las células que eran positivas a DCX y BrdU. Para evitar sesgo al contar las células, se ignoran las células del plano focal más superficial y sólo se cuentan como válidas todas las células siguientes.

Una vez que todas las células positivas a la marca de la sección representativa elegida se cuantifican, este número debe ser multiplicado por seis, que fue el número de fracciones en las que quedó dividido el cerebro.

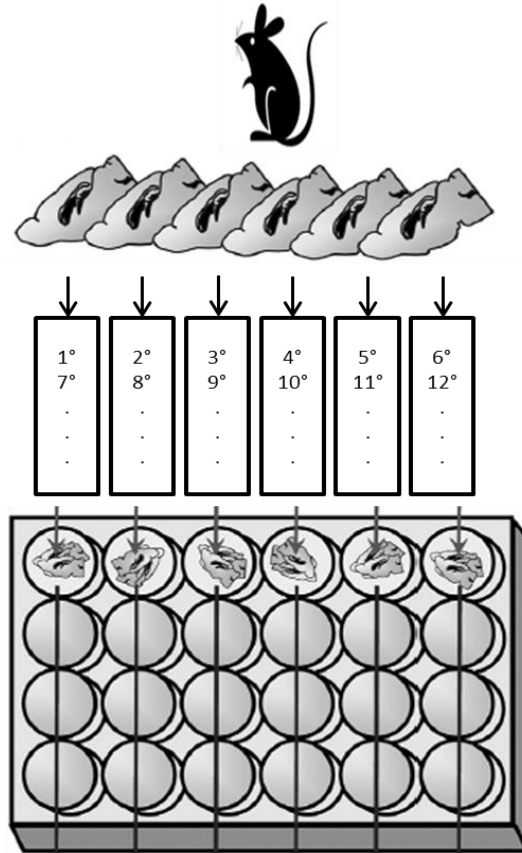


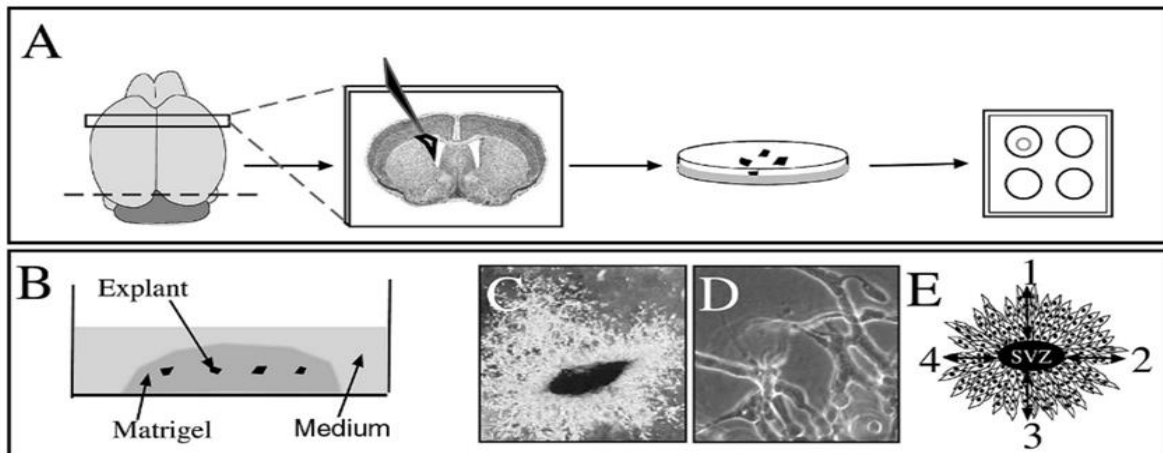
Figura 10. Ejemplo de distribución de los cortes obtenidos de un cerebro de ratón mediante el uso del método fraccionador. El uso de éste método permite obtener muestras representativas que permiten evaluar fácilmente toda la extensión de la zona del cerebro a estudiar (tomado y modificado de (Encinas and Enikolopov, 2008).

## 12.6 Ensayos de migración *in vitro*.

Los ensayos de migración *in vitro* permiten estudiar los factores que influyen en la migración de los precursores neurales desde el nicho neurogénico de la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio. Se utilizó el protocolo descrito por (Durbec *et al.*, 2008; Wichterle *et al.*, 1997a).

- 1.- Se extrajo el cerebro a ratones de 6 días de nacidos
- 2.- Se lavó con PBS y después se colocó en medio de disección (Medio DMEM/F12, Penicilina/Streptomocina, HEPES).
- 3.- Se cortó una rebanada del cerebro donde se puede ubicar la zona subventricular de pared lateral de los ventrículos y se cortó en fragmentos lo más pequeños posibles.
- 4.- Los fragmentos se mantuvieron en hielo y se llevaron a la campana de flujo laminar donde se les retiró el medio de disección y se les agregó 15  $\mu$ l de medio especial para los explantes (medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con B27 1x y N2 1x, Pen/Strep 1x) y 45  $\mu$ l de Matrigel,

- 5.- Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
- 6.- Se tomaron fotografías a las 24 y 48 horas para registrar la migración alrededor de los explantes. Pasadas las 48 horas, los explantes fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente. Para cuantificar distancia alcanzada por la migración celular se mide desde uno de los bordes del explante hasta el extremo líder de las cadenas migratorias, éste procedimiento se realiza cuatro veces y se hace un promedio para calcular la distancia media por explantes (Figura 11).



**Figura 11.** Diagrama de obtención de explantes de la ZSV de ratones postnatales. En a) podemos observar la región del cerebro que debe extirparse de la ZSV y la correspondiente localización en las cajas de cultivo donde crecerán, por otra parte en b) podemos observar el explante colocado en matrigel dónde se le dejará crecer. En c y d) se ejemplifica la obtención de los explantes a las 24 y 48 hrs, mientras que en e) se ejemplifica la forma en que se mide el crecimiento de los explantes. Tomado y modificado de (Durbec et al., 2008).

## 12.7 Western blot

Para evaluar la expresión de la PLPP3 y del receptor de S1P<sub>1</sub> nos ayudamos de la técnica conocida como "western blot" que se basa en la identificación de proteínas específicas mediante el uso de electroforesis para la separación de las proteínas y posterior identificación con anticuerpos específicos.

- 1.- Utilizamos ratones de 8-10 semanas de edad a los que se les extrajo la ZSV y el hipocampo.
- 2.- La ZSV y el hipocampo fueron lisados en buffer de extracción de proteínas P40 (50 mM Tris-HCl pH 8.0/150 mM NaCl/1% IGEPAL/1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>/25 mM), NaF/1X cOmplete EDTA-coctel libre de proteasas (Roche Molecular Diagnostics).
- 3.- Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 13,000 rpm durante 3 minutos
- 4.- Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas usando "DC Protein Assay Reagents (Bio-Rad) y BSA como estándar.
- 5.- Se colocaron 40 microgramos de proteína por carril y fueron separados por electroforesis en SDS-PAGE y transferidos en membranas de fluoruro polivinilideno o por sus siglas en inglés PVDF

- 6.- Las membranas de PVDF fueron bloqueadas con 5% (w/v) de leche/TBS-Tween.
- 7.- Los anticuerpos primarios fueron agregados en la solución de bloqueo y fueron incubados a 4°C durante toda la noche.
- Anti-PLPP3 (1:2000, Sigma)
  - Anti-EGD1/S1P<sub>1</sub> (1:3000, Santa Cruz)
  - Anti-GAPDH (1:3000, Millipore)
- 8.- Se realizaron 3 lavados con TBS-T
- 9.- Se adicionaron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) 1 hora a temperatura ambiente (1:5000, SantaCruz).
- 10.- La actividad de la peroxidasa fue visualizada utilizando el sistema para análisis de western blot ECL (Amersham, GE Healthcare) o el sustrato Immobilon quioluminiscente de HRP para Western (Millipore).

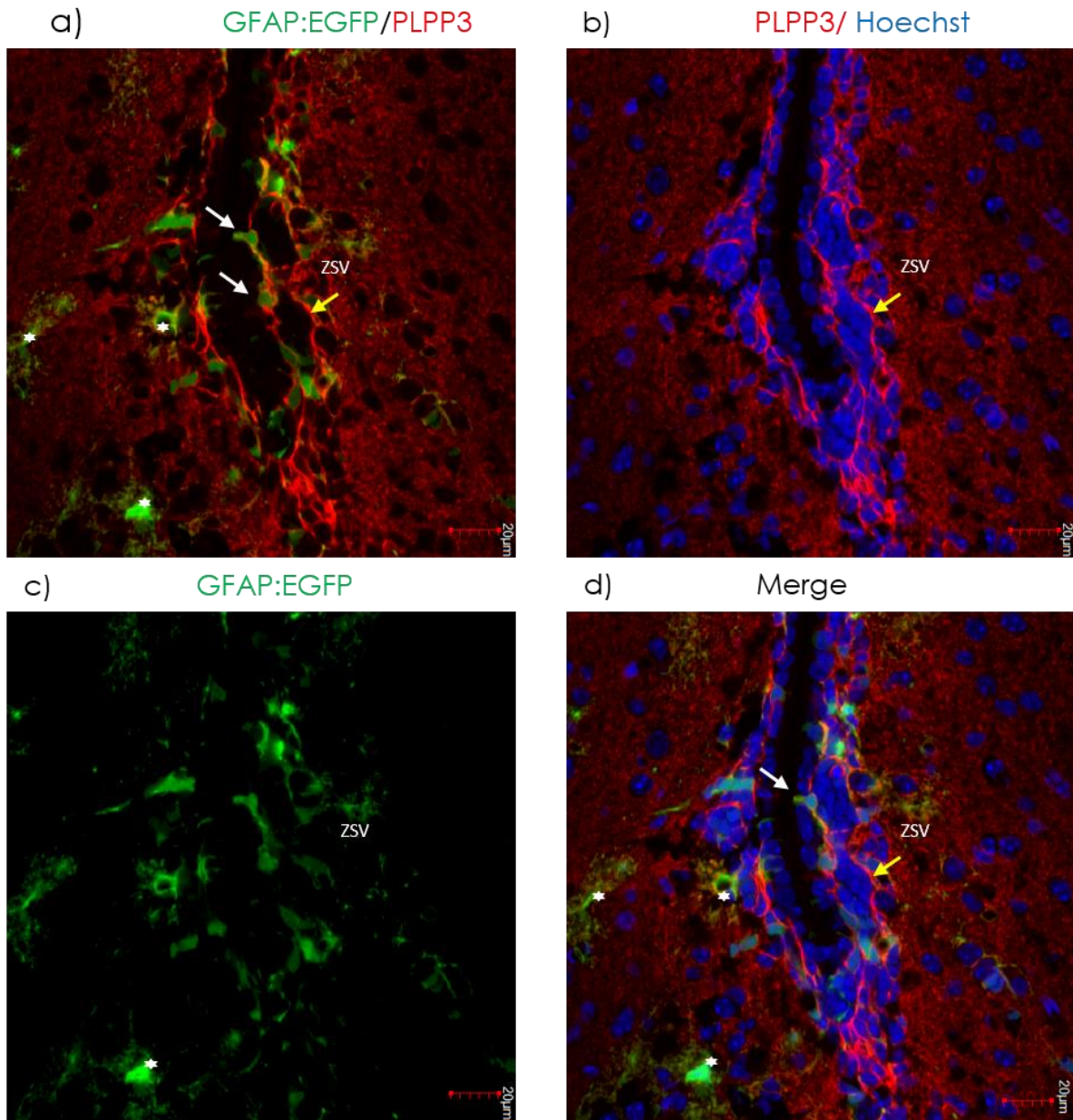
## 13 Resultados

### 13.1 Distribución y tipos celulares que expresan a la PLPP3 en el nicho de la ZV-ZSV.

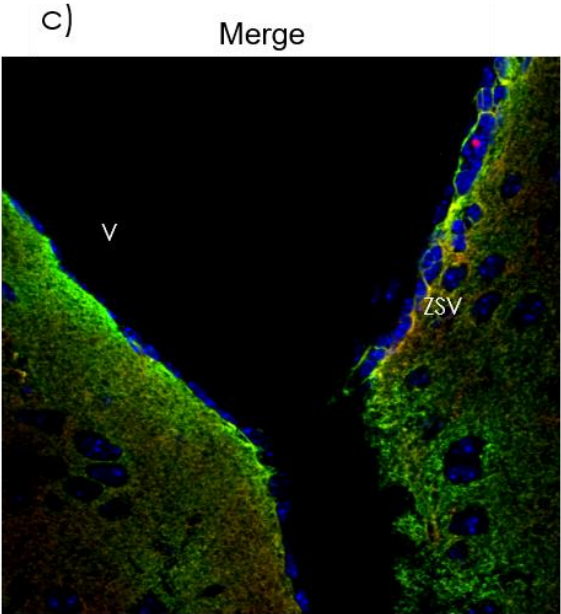
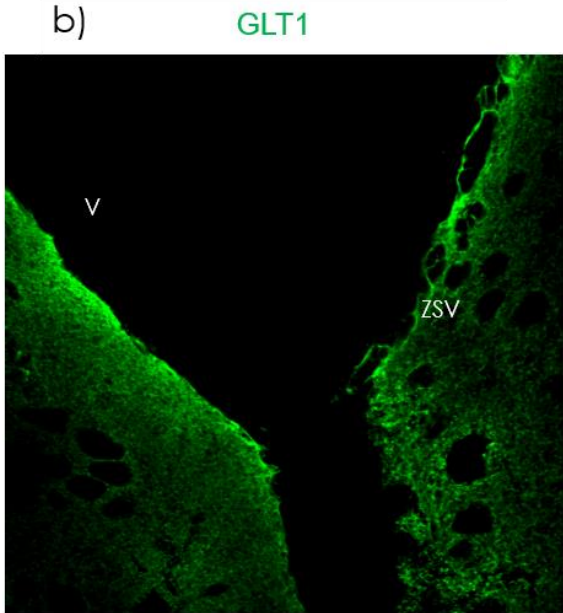
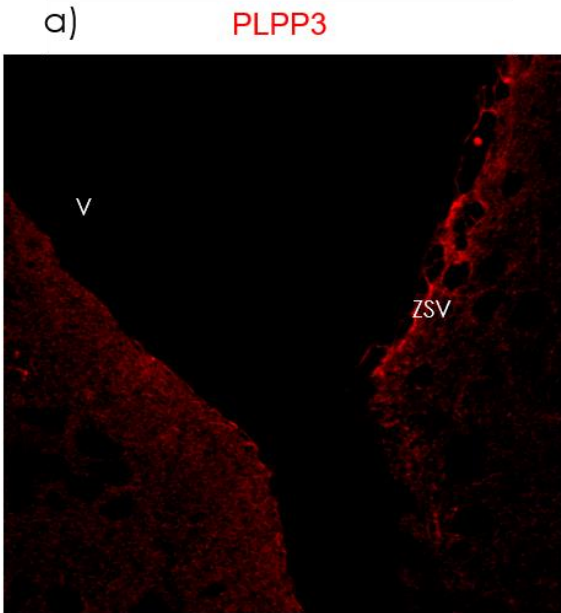
El primer objetivo de este proyecto consistió en identificar en qué tipos celulares se expresa la PLPP3 en el nicho neurogénico de la ZV-ZSV. Para lograrlo, se hicieron inmunofluorescencias empleando diferentes marcadores para identificar los diversos tipos celulares del nicho.

Inicialmente usamos un ratón reportero *GFAP:EGFP* que expresa a la EGFP bajo el promotor de la GFAP, el cual permite la identificación de progenitores neurales tipo B y astrocitos, y un anticuerpo específico para PLPP3. Identificamos una amplia distribución de la PLPP3 en el cerebro de ratón adulto con una señal notablemente más intensa cerca de las paredes de los ventrículos laterales y casi ausente en las fibras del cuerpo caloso. Encontramos células que co-expresaron ambos marcadores en la zona subventricular (PLPP3<sup>+</sup> y GFAP:EGFP<sup>+</sup>). De acuerdo a la citoarquitectura descrita de este nicho neurogénico la expresión de la enzima fue más intensa en lo que correspondería a células tipo B, las cuales rodeaban a cúmulos de células que no expresaron a la PLPP3 o la EGFP, y que podrían corresponder a grupos de neuroblastos (Figura 12, flecha amarilla). Notablemente observamos algunas células positivas para ambos marcadores que presentaban un proceso celular protruyendo hacia el ventrículo, tal y como se ha descrito para las células tipo B1 (Figura 12, flechas blancas). Fuera de la ZSV se pueden observar astrocitos parenquimales típicos, también positivos a ambos marcadores.

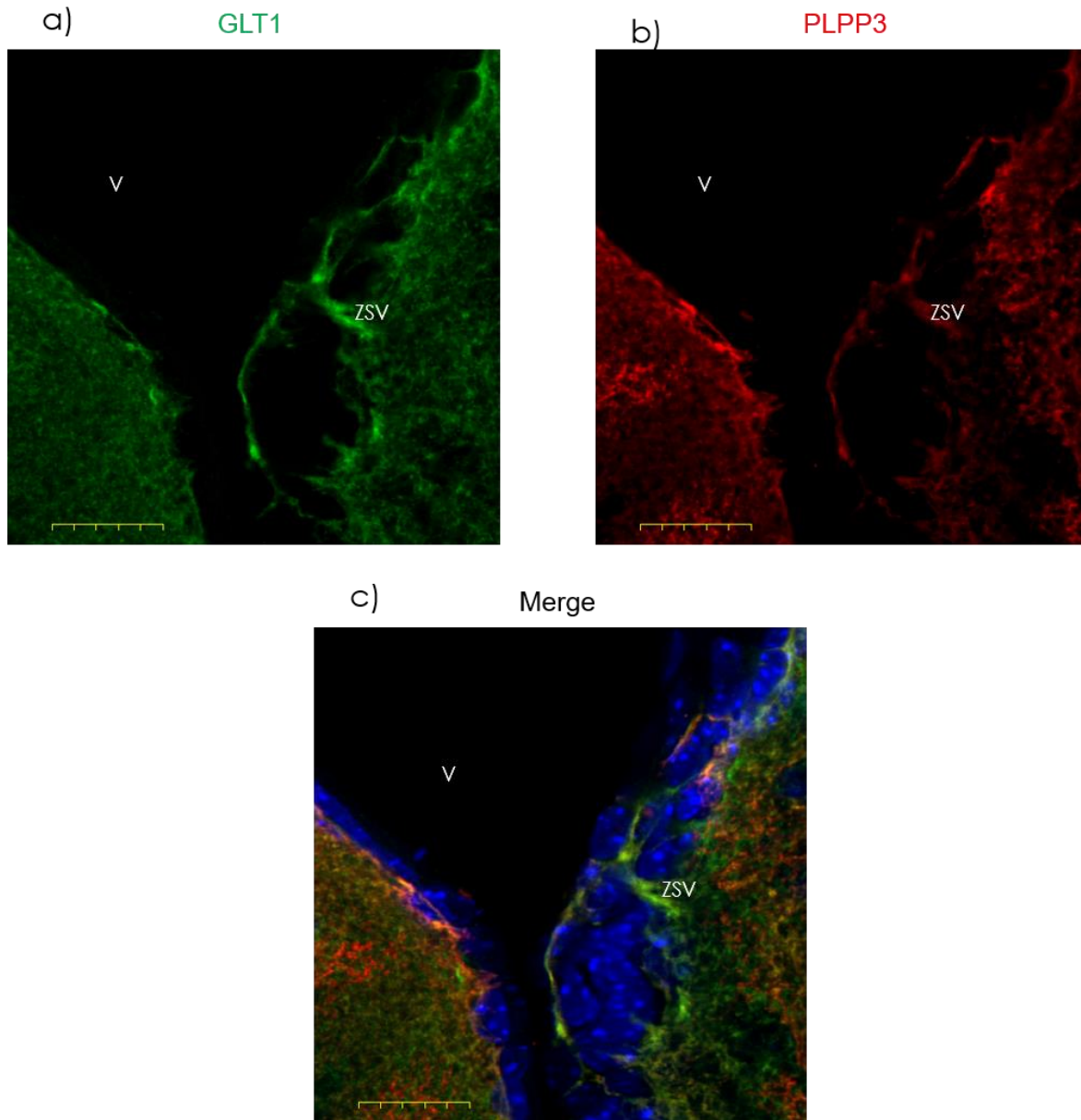
Las células B también expresan otros marcadores de astrocitos como los transportadores de glutamato GLAST y GLT1 por lo que decidimos realizar una doble inmunodetección de GLT1 con PLPP3. Una gran ventaja de emplear a este marcador es que se expresa en el mismo compartimento celular que la PLPP3, es decir en la membrana plasmática. Pudimos verificar que tanto los astrocitos parenquimales como las CTN de la SZV co-expresan ambas proteínas (Figura 13). También fue muy interesante observar que la tinción contra PLPP3 siempre fue mucho más intensa en la ZSV que en el parénquima, y que la tinción de GLT1 fue más intensa que la de PLPP3 en el parénquima, sugiriendo que la enzima es mucho más abundante en las células de la ZSV que en las células del parénquima. No se observaron regiones que no coexpresaran ambos marcadores pero si se observaron zonas desprovistas de ambos marcadores en la ZSV, probablemente ocupados por TAPs o neuroblastos, ya que se sabe que estas no expresan GLT1. Estos datos sugieren que la PLPP3 se expresa abundantemente en las células B dentro de la ZSV.



**Figura 12.** Expresión de PLPP3 en la zona subventricular de un ratón GFAP::EGFP. Puede observarse que la expresión de EGFP es abundante en la SZV y que algunas células co-expresan (flechas blancas) tanto PLPP3 como EGFP, tienen la morfología y localización típicas de las células troncales neurales con características B1. Además hay grupos de células en la ZV-ZSV que no expresan PLPP3 o EGFP (flechas amarillas).







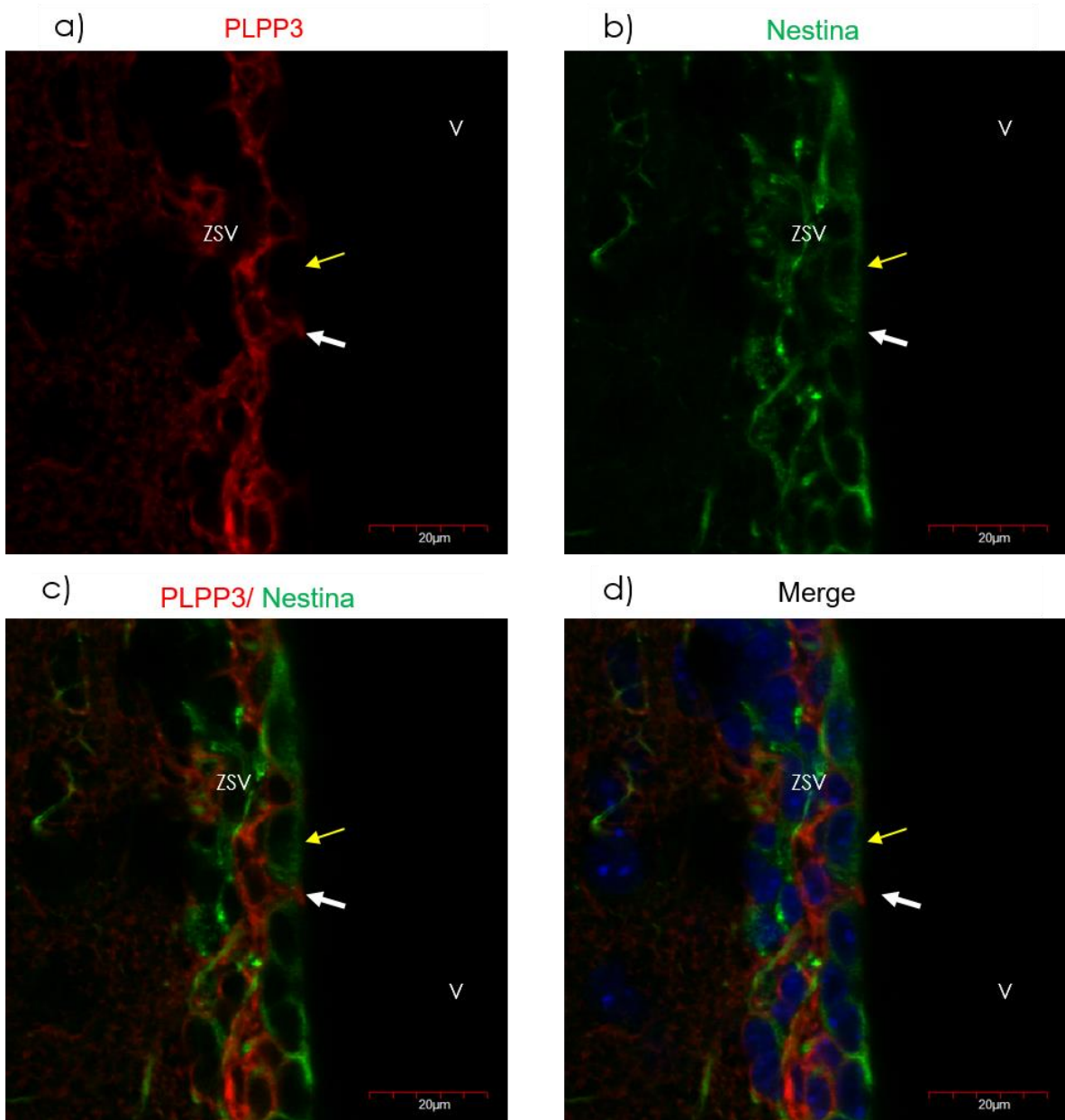
**Figura 13.** *Inmunofluorescencia contra GLT1 y PLPP3. a) Expresión de PLPP3 en la zona subventricular y parenquimal b) El patrón de expresión de GLT1 presenta gran similitud con el de la PLPP3 pero es más homogéneo. c) Conjunción de los tres canales.*

Para para probar la idea anterior realizamos ensayos con un anticuerpo contra la proteína nestina, la cual se expresa en CTNa y TAPs (Figura 14). Como era de esperarse se observaron células positivas a nestina, correspondientes a las poblaciones de células endiales, CTNa y TAPs sin embargo, encontramos diversidad en cuanto a la co-expresión de ambos marcadores. Las células endiales no se observaron positivas a PLPP3. En la ZSV se identificaron: 1) células que aparentemente co-expresan ambos marcadores (nestina es un filamento intermedio mientras que PLPP3 se expresa

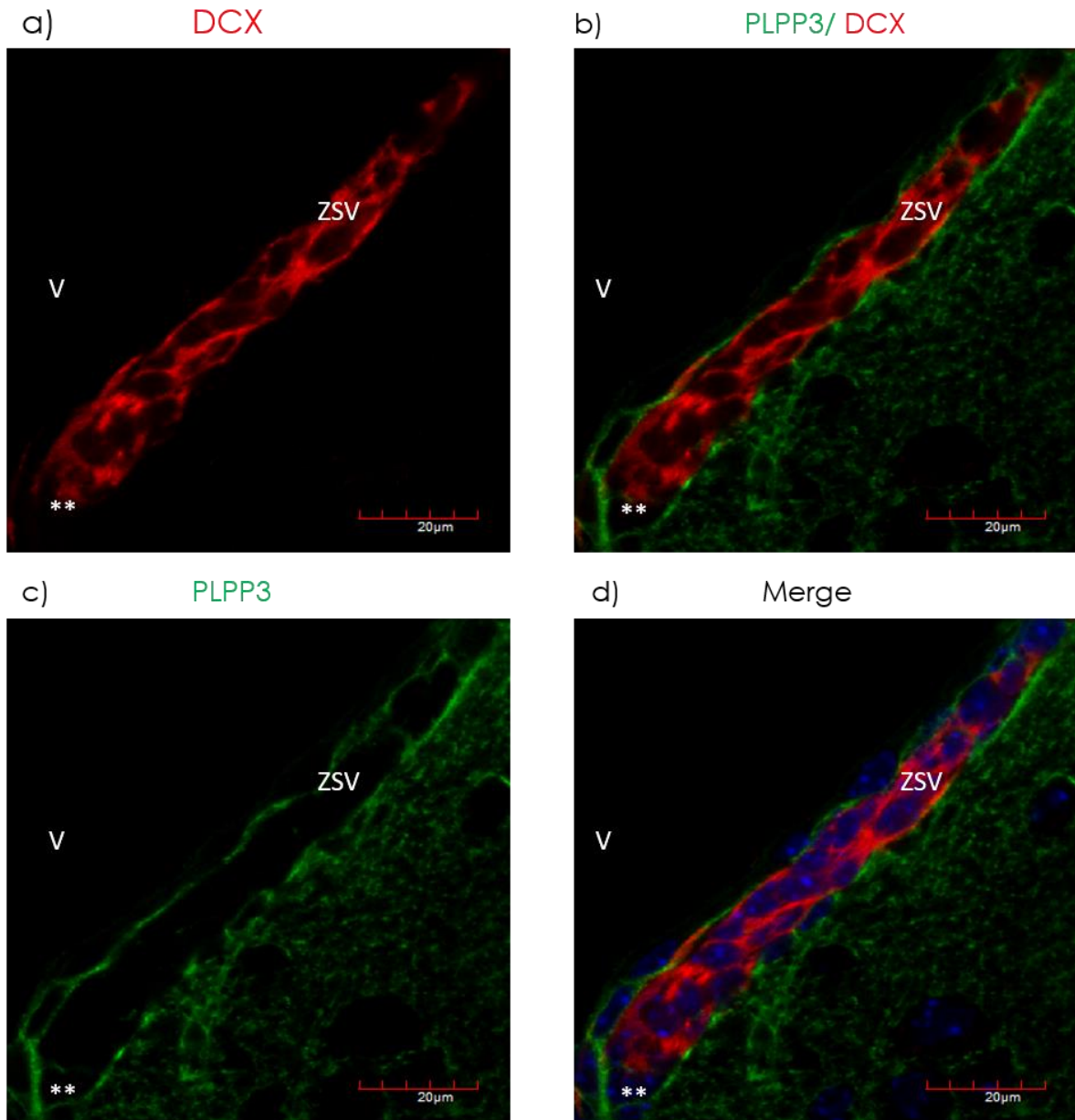
primordialmente en la membrana plasmática por lo que no se observa co-localización), 2) células sólo positivas a PLPP3 con morfología B1 y 3) células sólo positivas a nestina en la ZSV más profunda. Dado que nestina se expresa en CTNa y en TAPs pero no en CTNq, es de suponer que las células PLPP3+ con morfología B1 que no expresan nestina, corresponden a CTNq. Por otro lado, las células con o sin morfología B1 distinguible que parecen co-expresar ambos marcadores deberían corresponder a CTNa y/o TAPs. Finalmente la población que es solo positiva a nestina podría corresponder a TAPs previas a dividirse para dar origen a neuroblastos. Esta última idea se apoya en la observación de que todas las células que expresaron GLT1 co-expresaron PLPP3 y por lo tanto no podrían ser TAPs. En conjunto estas observaciones sugieren que la PLPP3 se expresa en CTNq y CTNa pero no en células del epéndima ni en TAPs.

Como se mencionó, el patrón de expresión de la PLPP3 en la ZV-SZV sugirió que ésta no se expresa en neuroblastos (cúmulos de células desprovistos de la expresión de la enzima). Para corroborar esta idea realicé una doble inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-DCX, un marcador específico de neuroblastos. Como se observa en la figura 15, efectivamente los cúmulos de células desprovistos de PLPP3 correspondieron a neuroblastos, lo que indica que la PLPP3 no se expresa en este tipo celular. Adicionalmente se pudieron detectar algunas células contiguas a los neuroblastos que no fueron positivos a DCX ni tampoco estaban rodeadas por señal positiva de PLPP3 en su superficie. Estas células probablemente correspondan a TAPs (asteriscos).

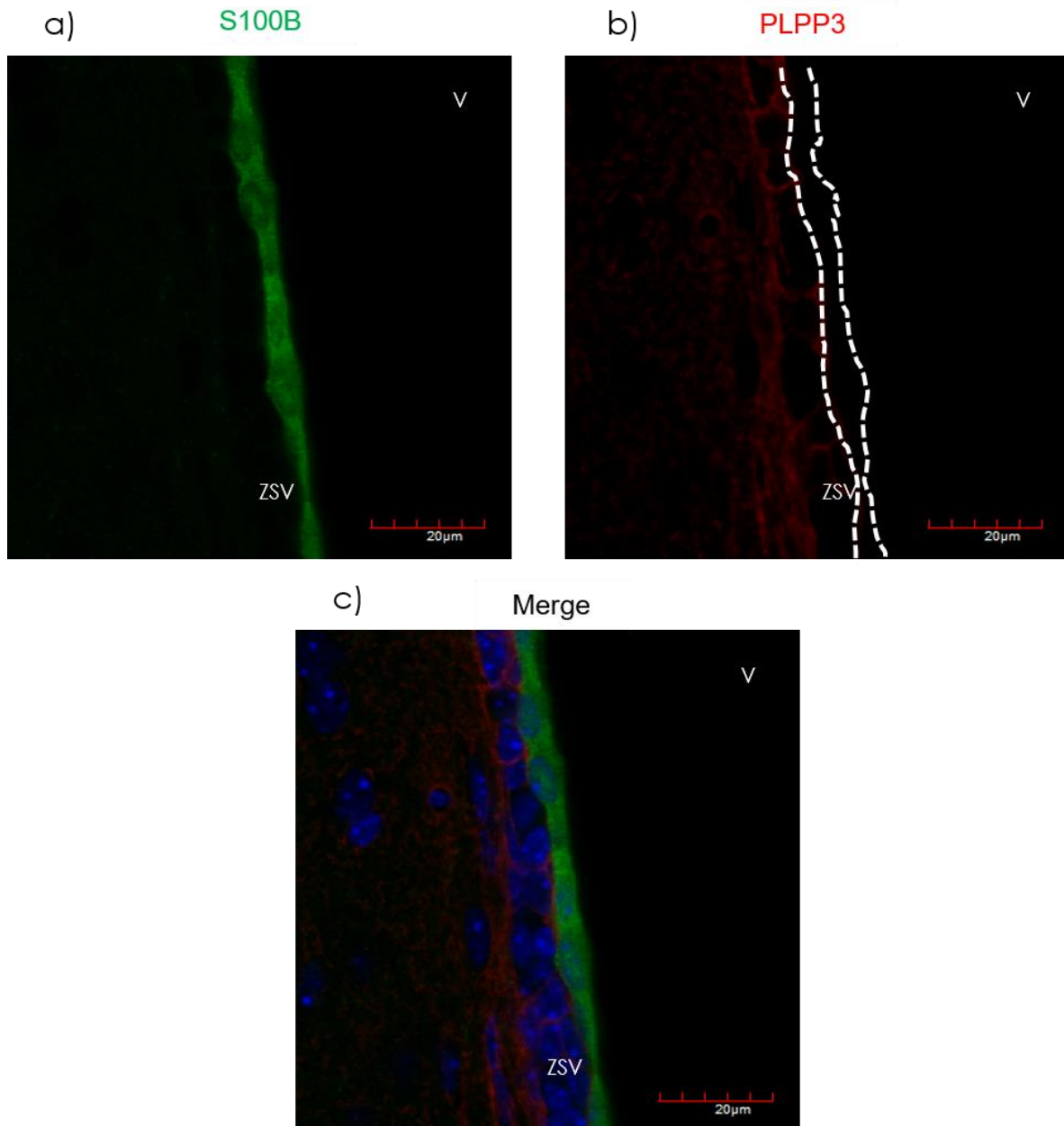
Finalmente para analizar si la PLPP3 se encuentra en células que expresan al marcador de células ependimales y de astrocitos protoplásmicos estriatales maduros, utilizamos el marcador S100B. Este marcador no se expresa en las células B. Como se muestra en la figura 16, en la pared del ventrículo, sólo las células del epéndima presentaron una abundante tinción contra S100B, mientras que la expresión de la PLPP3 se vio claramente restringida a la ZSV. Debido a la elevada intensidad de la señal de S100B en el epéndima, las condiciones de adquisición óptimas empleadas en las fotos de la figura no permiten observar claramente la tinción de este marcador en los astrocitos parenquimales, en los cuales se observó co-expresión con la PLPP3 (dato no mostrado).



**Figura 14.** Inmunofluorescencia de la zona subventricular contra PLPP3 y Nestina, el cual marca progenitores neurales (tipo B activados y tipo C), además de las células del epéndima, las cuales a pesar de ser positivas al marcador, son PLPP3 negativas (señalado con flecha) ) Expresión de PLPP3 en SZV, b) El anticuerpo contra nestina sólo permite ver algunos procesos celulares. c) Conjunción de todos los canales, los núcleos están marcados con Hoechst.



**Figura 15.** Inmunofluorescencia para evaluar la expresión de PLPP3 y DCX (marcador de neuroblastos) a) Se pueden ver los cúmulos de neuroblastos que se forman en la SVZ. b) y c) Las células positivas a Dcx no lo son para PLPP3, pero se encuentran rodeadas por células positivas a PLPP3. d) Conjunción de todos los canales permite ver los núcleos y a la proteína PLPP3 rodeando una cadena de neuroblastos.



**Figura 16** Inmunofluorescencia de la zona subventricular contra PLPP3 y S100B , el cual es un marcador que comúnmente se usa para visualizar astrocitos y células del epéndima. Esta combinación de marcadores nos permitió confirmar que las células del epéndima de la ZSV no expresan la proteína PLPP3. En el panel a )c) Conjunción de todos los canales, los núcleos están marcados con Hoechst.

### 13.2 Expresión del receptor S1P<sub>1</sub> en el nicho de la ZV-ZSV.

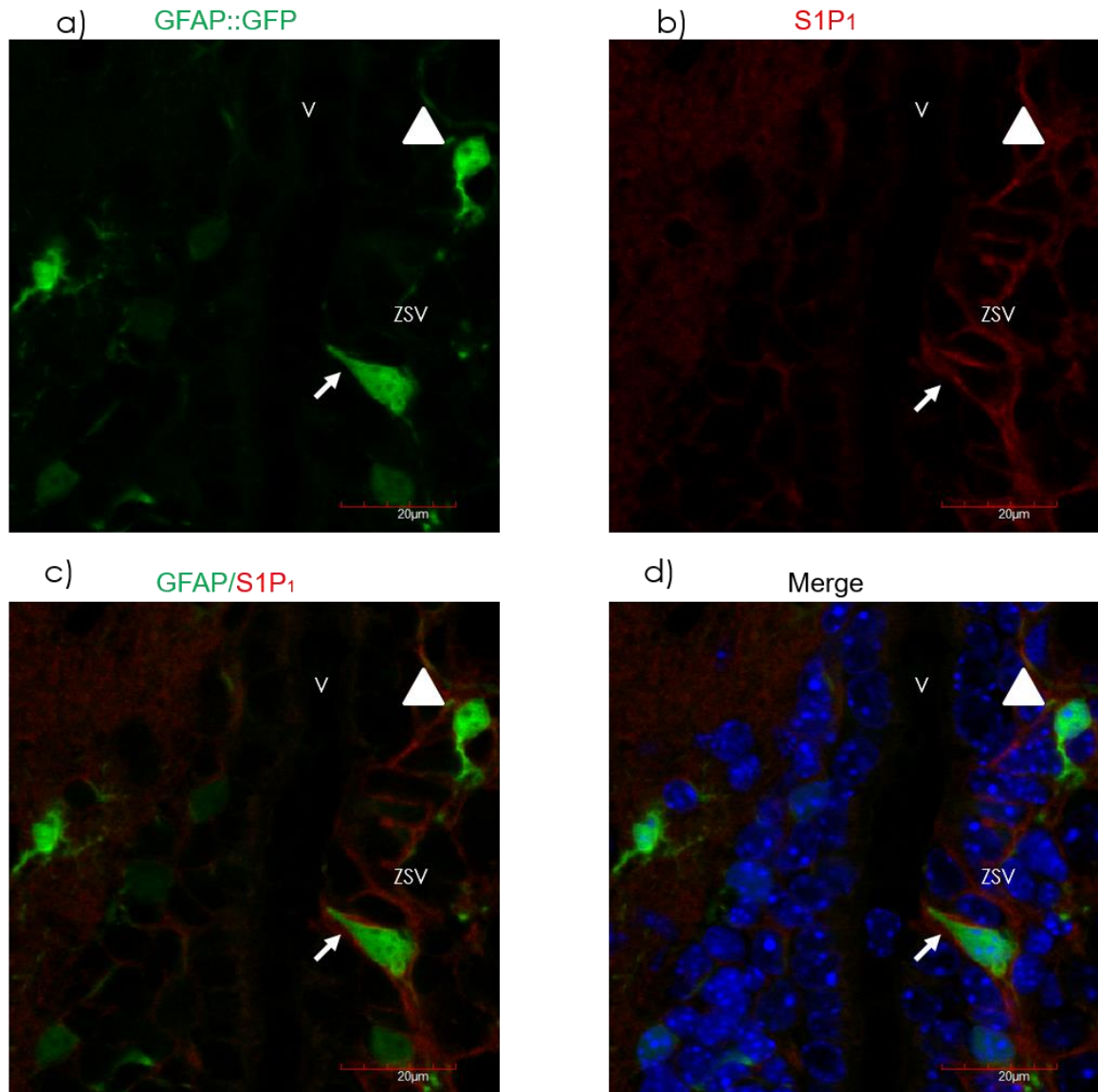
Como se mencionó en la introducción la S1P es importante para mantener la quiescencia en las CTN de este nicho y el mRNA del receptor *S1pr1*, es el que más abundantemente se expresa en las paredes de los ventrículos laterales sin embargo, se desconoce cómo

está distribuida la proteína y en qué tipos celulares se expresa en este nicho. Por este motivo decidimos analizar la expresión del S1P<sub>1</sub> en secciones de cerebros de ratones que portaban el reportero *GFAP::EGFP*, para así establecer si su expresión muestra alguna similitud con PLPP3. No pudimos realizar dobles inmunolocalizaciones debido a que ambos anticuerpos están derivados en la misma especie.

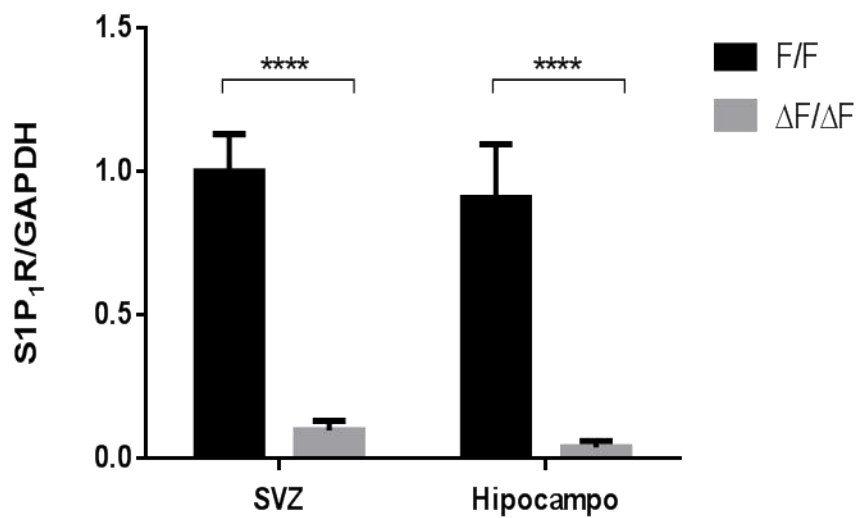
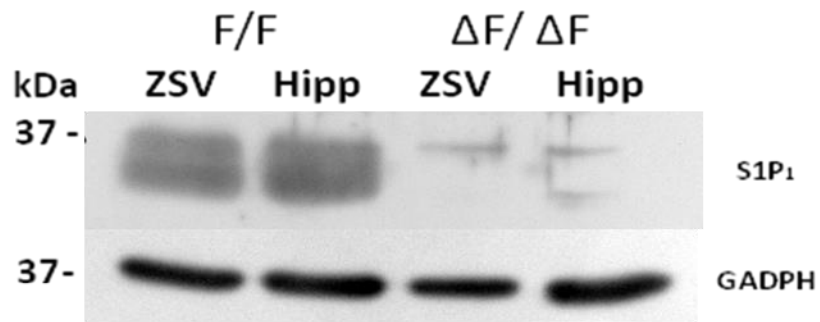
Sorprendentemente, el patrón de expresión observado para el S1P<sub>1</sub> fue extraordinariamente similar al de la PLPP3, tanto topográficamente como subcelularmente (proteína en membrana plasmática). Su distribución también es amplia en el cerebro de ratón adulto con una señal notablemente más intensa en la ZSV. Dentro de esta última, se observaron células positivas al reportero EGFP con morfología de células B1 y B2, ambas rodeadas por una intensa señal del receptor (Figuras 17).

### **13.3 Efecto de la ausencia de la PLPP3 en la expresión del receptor S1P<sub>1</sub>.**

En conjunto nuestras observaciones sugirieron que la expresión de la PLPP3 podría estar jugando un papel relevante en la función de las CTN y progenitores neurales a través de la regulación de lípidos bioactivos producidos en este nicho. Con la finalidad de saber si la señalización mediada por el S1P<sub>1</sub> podía estar afectada en animales deficientes en PLPP3 en el SNC, medimos la expresión del receptor a partir de extractos proteicos obtenidos de muestras que contenían la ZSV y del hipocampo de animales mutantes (*Plpp3<sup>ΔF/ΔF</sup>*) y control (*Plpp33<sup>F/F</sup>*) (Figura 18). Como puede verse en el panel a) se observó una reducción muy drástica de la expresión de las bandas de 37-39 kD, correspondientes al S1P<sub>1</sub>, en ambos tejidos neurogénicos mutantes en comparación con sus tejidos control. Este resultado puede explicarse por una desensibilización del receptor causada por un exceso de S1P disponible en tejido mutante, lo cual provoca que el receptor se internalice y degrade. Un resultado similar se observó al analizar la expresión del receptor por inmunofluorescencia (Figura 19). Notablemente, la expresión del receptor se regula a la baja no sólo en la ZSV sino en todo el parénquima, sitio donde también se expresa la PLPP3.

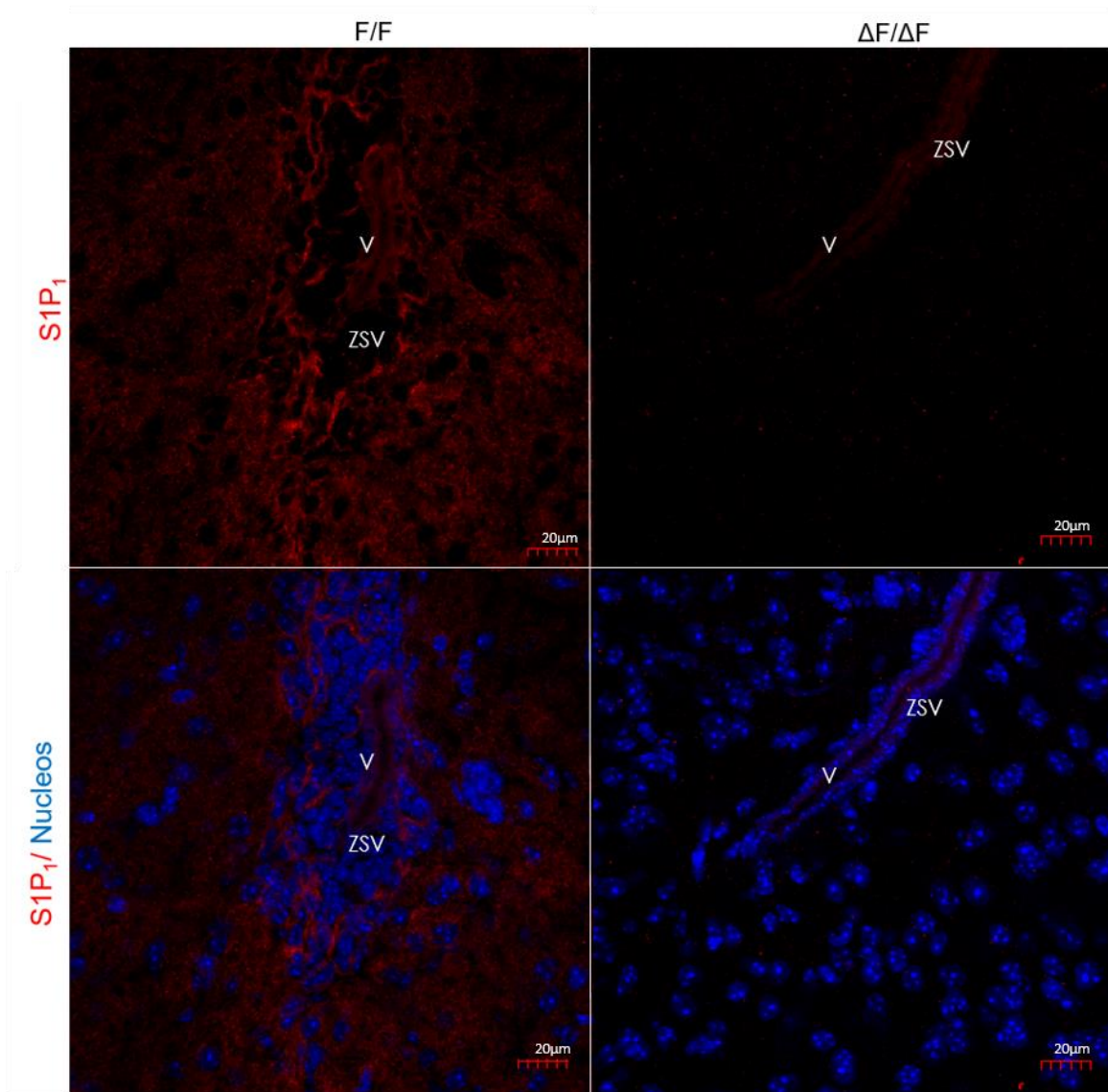


**Figura 17** Expresión del receptor  $S1P_1$  y de GFAP (GFAP:EGFP) en una sección vista con microscopio confocal (60x, zoom 2.5x). a) Se observan células positivas a EGFP en una región de la ZSV. Algunas de estas se ven rodeadas por la tinción del  $S1P_1$ . También se puede observar que el patrón de expresión del receptor es muy parecido al de la PLPP3. Nótese que células con morfología típica de célula tipo B1 y B2 en la ZSV (flechas y puntas de flecha respectivamente). d) conjunción de los canales.



**Figura 18.** Western blot para detectar la presencia del S1P<sub>1</sub>. En el ratón mutante, es posible ver que el receptor está disminuido con respecto al ratón control, lo que podría deberse a un fenómeno de desensibilización.





**Figura 19.** *Inmunofluorescencia para el S1P<sub>1</sub>. Se puede observar que la tinción del receptor en la ZSV y el parénquima es casi inexistente. La tinción remanente en las células endocelulares corresponde a pegado inespecífico.*

### 13.4 Alteraciones en la generación de neuroblastos en ausencia de la PLPP3

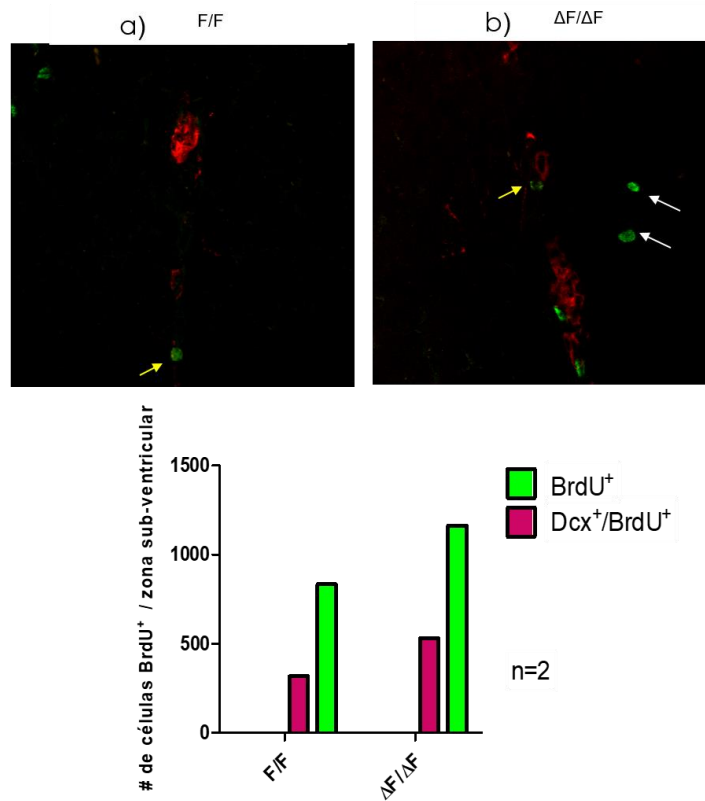
Nuestros datos en conjunto sugirieron que la PLPP3 efectivamente puede estar jugando un papel importante en regular el estado de activación de las CTN de nicho de la ZV-ZSV a través de la regulación de los niveles extracelulares de S1P. Con la finalidad de corroborar esta idea evaluamos si existían cambios en la proporción de neuroblastos generados a partir de precursores neurales. Se siguió un protocolo de incorporación de BrdU que consiste de administración de BrdU cada 12 horas durante cuatro días, más 14 días de

espera antes de sacrificar a los individuos. Hasta la fecha, se han preparado y analizado dos parejas de animales control y mutantes marcados con este protocolo. Se analizaron las imágenes tomadas con el microscopio confocal FV10i y se contaron las células positivas a BrdU así como las doblemente marcadas con BrdU y Dcx.SZV. El análisis preliminar de estas muestras sugiere que en los animales mutantes hay un número mayor de neuroblastos positivos a BrdU comparado con los animales control (Figura 20).

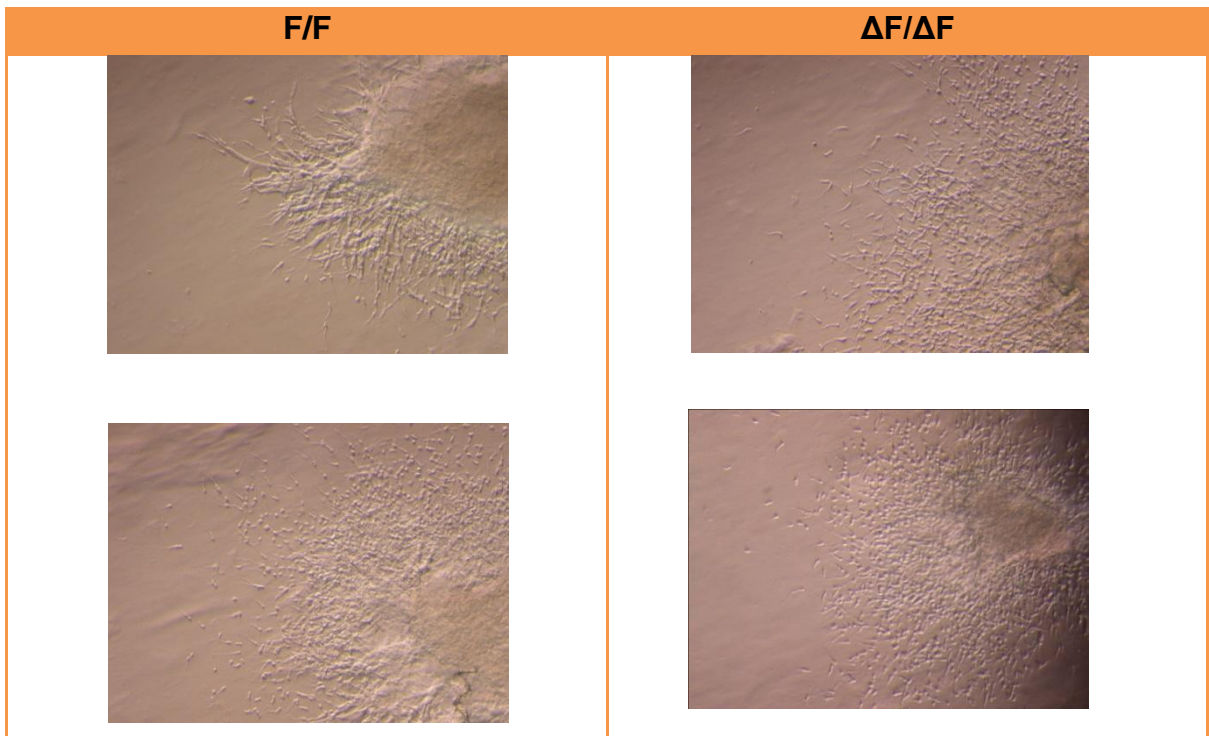
Estos resultados preliminares pueden explicarse de diferentes maneras. 1) Que las CTNq de este nicho se activan con más frecuencia o 2) que los neuroblastos tengan una migración retrasada por alteraciones en el microambiente que promueva que un número mayor de ellos permanezcan más tiempo en la ZSV. Establecer si se trata de la primera opción requiere de experimentos complejos y de largo plazo por lo que decidimos explorar la segunda hipótesis.

### **13.5 Ensayos de migración de neuroblastos *in vitro***

Para evaluar la capacidad de migración de los neuroblastos, se hicieron ensayos de migración *in vitro* empleando explantes de ZSV de animales postnatales de ambos genotipos. Para comparar si la migración de neuroblastos mutantes se modifica, se tomaron fotografías a las 24 y 48 horas de cultivo (Figura 21). A simple vista no fue posible observar grandes diferencias entre el grupo control y el grupo mutante sin embargo, será necesario realizar análisis más detallados que nos permitan concluir si existen o no diferencias en el comportamiento migratorio de los neuroblastos provenientes de explantes de la ZSV de animales que carecen de la PLPP3.



**Figura 20** (a,b) Inmunofluorescencias representativas de ventrículos laterales realizadas de acuerdo al segundo protocolo de incorporación de BrdU, las flechas amarillas indican células que co-localizan para BrdU y Dcx mientras que la flecha blanca muestra una célula que sólo es positiva para BrdU. c) Gráfica de células positivas para BrdU totales en las que en rojo se muestra la proporción de células que fueron positivas para DCX y BrdU.



**Figura 21.** Explantes de ventrículo para analizar la migración de neuroblastos, fotografías tomadas 48 horas después de la obtención de los cultivos de zona subventricular. Se pueden observar la formación de cadenas migratorias en la periferia de los explantes las cuales se desplazaron en distintas direcciones.

## 14 Discusión

Como se mencionó en la introducción, no ha sido sino hasta fechas recientes que se comenzó a indagar qué papel juegan algunos lípidos bioactivos en la neurogénesis adulta, y el conocimiento en este tema aún es escaso. De particular interés para nuestro grupo, que está enfocado en entender el papel de un grupo de lisofosfolípidos bioactivos en la regulación de diversos procesos del desarrollo a través de estudiar una enzima que los metaboliza, es el aparente papel de la S1P en la regulación del estado quiescente de las CTN del nicho de la ZV-ZSV (Codega et al., 2014a). En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo y colaboradores demostraron que la PLPP3 regula la disponibilidad de la S1P y la señalización del receptor S1P<sub>1</sub> en varios sistemas, produciendo una importante regulación a la baja de la expresión en superficie del S1P<sub>1</sub> (Bréart et al., 2011; Gomez-Lopez et al., 2016; Lopez-Juarez et al., 2011) Adicionalmente el transcrito, tanto de *Plpp3* como del receptor *S1pr1* son muy abundantes en ambos nichos neurogénicos adultos es decir la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, y en la zona subventricular de los ventrículos laterales. Estas evidencias nos sugirieron que la concentración de S1P, y por lo tanto de su señalización, puede ser regulada por la PLPP3 en el nicho de la ZV-ZSV y de esa forma regular la neurogenesis de este nicho.

Como una primera aproximación para resolver algunas de estas interrogantes en este trabajo realizamos un análisis de la expresión de la PLPP3 y el S1P<sub>1</sub>, en combinación con otros marcadores, y exploramos si la ausencia de la enzima tiene algún efecto sobre el receptor y la neurogénesis del nicho de la ZV-ZSV.

Empleando una batería de marcadores pudimos establecer que las CTN de este nicho expresan a la enzima en niveles aparentemente más abundantes que en astrocitos maduros. Adicionalmente establecimos que la PLPP3 no se expresa en células del epéndima, TAPs o neuroblastos.

Dentro de las CTN nuestros datos también sugieren que la enzima se expresa tanto en CTNq como CTNa, y que se regula a la baja conforme progresa la formación de neuroblastos. Esta observación se apoya en el hecho de que las CTNq no expresan al marcador Nestina (Lim and Alvarez-Buylla, 2016) y que nosotros observamos células positivas a PLPP3 con morfología de células B1 (con su proceso apical viendo hacia el ventrículo) que no expresaron al mencionado filamento intermedio. Adicionalmente, observamos células con morfología de células B que aparentemente co-expresaron ambos marcadores. Expresamos cierta reserva respecto a la co-expresión visual ya que ambas proteínas se expresan en compartimientos diferentes de la célula (PLPP3, principalmente en la membrana plasmática y nestina en filamentos intermedios dentro del citoplasma), lo que dificulta establecer concluyentemente la co-expresión. Un análisis empleando otros marcadores, como por ejemplo el EGFR que también se expresa en membrana plasmática, nos permitirían confirmar nuestra observación.

A pesar de lo anterior, nuestra sugerencia de que la PLPP3 se expresa sólo en ambos tipos de CTN está apoyada por análisis transcriptómicos de poblaciones o células únicas aisladas de este nicho (Codega et al., 2014a; Llorens-Bobadilla et al., 2015b). Doetsch y colaboradores en el 2014, encontraron que el transcrito de *Plpp3* es uno de los tantos transcritos que se expresan diferencialmente entre ambos tipos de CTN, encontrando hasta 5 veces mayor número de transcritos en las células CTNq (GFAP<sup>+</sup>; CD133<sup>+</sup>; EGFR<sup>-</sup>) que en las CTNa (GFAP<sup>+</sup>; CD133<sup>+</sup>; EGFR<sup>+</sup>; Nestina<sup>+</sup>). Nosotros no observamos, de forma evidente, la existencia de dos poblaciones con niveles diferentes de expresión de PLPP3 en las células de la ZSV. Esto puede deberse a que la enzima tenga una vida media tal que no refleje tan estrechamente el nivel de transcripción de su gen o que la técnica de inmunofluorescencia no nos permitió detectar cambios.

Codega y colaboradores sólo analizaron el transcriptoma de las CTNq y las CTNa por lo que en su estudio no se realizó un análisis de otros tipos de células del nicho. Nosotros observamos que la PLPP3 deja de expresarse una vez que las células toman el fenotipo de células C (TAPs).

En la literatura se ha establecido a las células tipo B1, es decir con un proceso apical de vista a los ventrículos, como los elementos activos de la neurogénesis, sin embargo se ha hecho de lado la población de células tipo B2, probablemente por la falta de marcadores específicos que permitan la diferenciar ambas poblaciones. Por la distribución topológica de las células positivas a PLPP3 en la SZV y los análisis transcriptómicos existentes, es tentador especular que la mayoría de las células B2 representen a la población de CTNq y que durante el proceso de activación (CTNq>CTNprimed>CTNa1>CTNa2, (Llorens-Bobadilla et al., 2015b) estas se transloquen a la porción ventricular. A la fecha no existen evidencias que apoyen esta idea principalmente por la falta de marcadores, sin embargo recientemente se ha descrito que las células con morfología B1 son capaces de transitar a células con morfología B2 (Obernier et al., 2018), lo cual pone de manifiesto el comportamiento dinámico de la población de CTN.

En este sentido, y dado que se expresa en la superficie celular, PLPP3 podría emerger como una herramienta importante para estudiar las CTN de este nicho. La limitante actual es contar con un buen anticuerpo que reconozca a una región extracelular de la proteína, los actuales reconocen sólo a la proteína de humano y no son muy específicos. De contar con este anticuerpo se podría emplear para separar poblaciones celulares por su grado de expresión y posterior caracterización.

Una conclusión colateral de nuestro estudio es que, al igual que GLAST y GLT1, PLPP3 parece un marcador más general de astrocitos en el cerebro. Esto se desprende de los experimentos de inmunolocalización en el ratón reportero *Gfap::Egfp* y dobles tinciones contra S100B. Observamos muchas más células que expresaron la PLPP3 en la región del estriado que los que expresaron ambos marcadores. Estas observaciones pueden explicarse de dos maneras. Una es que el promotor de GFAP usado en este transgénico no sea muy eficiente en ratón. Otra posibilidad, y que es por la que nos inclinamos, es que la PLPP3 detecta a una población más amplia de astrocitos. Se sabe por ejemplo que no

todos los astrocitos expresan GFAP y que del grupo de astrocitos que sí expresan esta proteína, sólo somos capaces de ver una pequeña proporción de sus procesos, ya que la mayoría de los finos procesos astrocíticos son GFAP negativos. Es decir GFAP sólo permite visualizar el 15% del total de un astrocito (Kimelberg, 2004; Oberheim et al., 2012). Estas observaciones apoyan la heterogeneidad de los astrocitos cuyos marcadores pueden indicar cierta especialización entre ellos. Por ejemplo, PLPP3 se expresa en el cerebelo adulto en la glía de Bergmann pero está ausente en los astrocitos protoplásmicos de la región de la médula cerebelar (Lopez-Juarez et al., 2011). GLAST, GLT1 y PLPP3 se expresan en la mayoría de los astrocitos del bulbo olfatorio, pero en los tubos gliales que rodean a las cadenas de neuroblastos migratorios GLT1 no se expresa o se expresa en niveles muy reducidos, mientras que PLPP3 se expresa en este tipo de astrocitos muy abundantemente (Rivera-Álvarez, 2017), Rivera-Alvarez et al, en preparación. Sería interesante identificar las regiones regulatorias que permiten la expresión del *Plpp3* en las CTN y no es otro tipo de astrocitos para lograr manipulaciones genéticas restringidas a esta población.

Respecto a la expresión del receptor S1P<sub>1</sub> en la SZV fue sorprendente observar una gran similitud en el patrón de expresión de este receptor con respecto al de la PLPP3 en la ZSV, incluyendo la presencia de células que expresan el receptor y que tienen una localización y morfología típicas de CTN tipo B1 y B2. Por lo anterior sugerimos que tanto la enzima como el receptor se co-expresan en los mismos tipos celulares. Dado que ambos anticuerpos fueron generados en la misma especie, en el laboratorio actualmente se trabaja en otro acercamiento que nos permita corroborar esta idea, usando un ratón que expresa a la  $\beta$ -galactosidasa dirigida por las regiones regulatorias endógenas del gen *Plpp3* (Escalante-Alcalde et al., 2009). A pesar de estas dificultades técnicas vale la pena hacer notar que en los trabajos de (Codega et al., 2014a; Llorens-Bobadilla et al., 2015b), se observó que el receptor *S1pr1* es el único receptor de S1P que se expresa en la población de CTN de la ZSV, lo que apoya nuestras observaciones.

Reportes previos de nuestro grupo y nuestros colaboradores han demostrado que la PLPP3 juega un papel fundamental en construir gradientes de S1P en varios órganos, incluido el cerebelo, lo cual tiene un impacto en la señalización y expresión en superficie del receptor S1P<sub>1</sub> (Bréart et al., 2011; Lopez-Juarez et al., 2011; Ramos-Perez et al., 2015). Para probar la hipótesis de que la PLPP3 podría contribuir a la regulación de la activación de las CTN a través de regular los niveles de S1P en la ZSV evaluamos la expresión del S1P<sub>1</sub>, en el nicho de la zona sub-ventricular de animales que carecen de la PLPP3 en sistema nervioso. Pudimos observar que la expresión de este receptor prácticamente desaparece del tejido neural de los cerebros de ratones que carecen de la actividad de PLPP3. Esto sólo puede explicarse por un aumento en la concentración extracelular de S1P la cual a su vez produce la desensibilización homóloga del receptor.

Lo anterior nos llevó a preguntarnos si la ausencia de la enzima también tendría impacto sobre la neurogénesis de este nicho. Para abordar esta pregunta realicé experimentos donde se administraron 8 pulsos de BrdU durante 4 días para marcar la población de CTN y TAPs que se encontraban en proliferación en la ZSV durante ese

periodo. Los animales de ambos genotipos se sacrificaron 14 días después del último pulso y se cuantificó el número de neuroblastos marcados con BrdU, en una fracción representativa de toda la ZSV. Resultados preliminares del análisis de dos pares de animales (mutantes y controles) arrojaron que en los animales mutantes había 30% más células doblemente marcadas que en sus controles respectivos. Además también se encontraron 40% más células marcadas sólo con BrdU en mutantes que en sus controles. Estos resultados pueden explicarse de diferentes formas.

Por ejemplo, una activación más frecuente de las CTNq por la ausencia de la PLPP3 redundaría en un mayor número de neuroblastos doblemente marcados y el agotamiento prematuro de la poza de CTN. Alternativamente, defectos en la migración de los neuroblastos podría provocar que un mayor número de ellos no salieran de la ZSV o que sobrevivan mejor bajo el microambiente generado por la mutación. Sin embargo, también es intrigante haber encontrado mayor número de células positivas sólo a BrdU en la ZSV. Lo anterior puede sugerir que un mayor número de CTNa regresó al estado quiescente o que diferenciaron a otro tipo celular (i.e. astrocitos).

Recientemente se observó en el laboratorio (José Rivera-Álvarez et al, en preparación) que en la ZSV de ratones mutantes hay una reducción de alrededor del 20% en el número de células que se encuentran mitóticamente activas (Ki67+) respecto a los animales control. Dicha observación puede sugerir una menor activación y por lo tanto mayor número de CTNq o un agotamiento prematuro de la poza de CTN. Se requiere aumentar la n de estos experimentos y hacer cuantificaciones más extensiva para poder concluir algo de estos experimentos así como, de confirmarse estas observaciones, diseñar otras estrategias para contestar las nuevas interrogantes que surgieron.

Debe destacarse que en un trabajo realizado previamente en el laboratorio (Cotzomi-Ortega, 2015, Cotzomi-Ortega et al, en preparación) se observó un resultado inverso al realizar el mismo protocolo de administración de BrdU en el nicho neurogénico del hipocampo. Se detectó una reducción de hasta 35% en el número de neuroblastos formados respecto a los controles, y una reducción de aproximadamente 50% en el número de CTN/progenitores neurales tempranos (un pulso de dos horas) en animales mutantes también de 8 semanas. Sí estas aparentes contradicciones en la cinética de proliferación y diferenciación de neuroblastos entre los dos nichos se deben, a características particulares entre ambos nichos o a la predominancia de un sistema de señalización particular (ya sea por LPA o S1P) presente en diferentes proporciones en ambos nichos neurogénicos, deberá determinarse en el futuro.

En este punto, independientemente del mecanismo, es claro que la ausencia de la PLPP3 tiene efectos sobre la neurogénesis de este nicho. Dichas alteraciones podrían deberse al incremento de S1P extracelular lo cual no solo puede tener efectos sobre la expresión/señalización del receptor S1P<sub>1</sub> en CTN, sino sobre otros receptores expresados en otros tipos celulares del nicho.

En este sentido, la alteración más clara observada en los cerebros deficientes en



PLPP3 es la regulación a la baja del S1P<sub>1</sub> en astrocitos y CTN del nicho. Si este evento evita que la S1P mantenga el estado quiescente de las CTN (promoviendo su activación) o si la señalización remanente evita su activación aún deberá definirse. Tampoco podemos descartar que la ausencia de la enzima también tenga algún efecto en los niveles y señalización mediada por LPA ya que también se vio expresión diferencial entre CTNq y CTNa de un receptor de LPA (Lpar4, 2.7 veces de diferencia) y de la enzima que sintetiza LPA (Enpp2/Autotaxina, 9.2 veces de diferencia) en los datos transcriptómicos de Codega y colaboradores. Otros experimentos son necesarios para establecer exactamente que vías son responsables de los efectos observados.

## 15 Conclusiones

- PLPP3 se expresa en CTN del nicho neurogénico de la ZV-ZSV, así como en los astrocitos del parénquima.

La expresión de PLPP3 desaparece conforme avanza el proceso de diferenciación, estando ausente en TAPs, neuroblastos y células del epéndima.

El receptor S1P<sub>1</sub> también se expresa en CTN y tiene un patrón de distribución similar al de la PLPP3 en la ZV-ZSV.

La ausencia de la PLPP3 provoca un incremento del S1P extracelular, indicado por regulación a la baja del S1P<sub>1</sub> en el nicho neurogénico de la ZV-ZSV.

- La carencia de PLPP3 provoca un aparente incremento en el número de neuroblastos generados. Más estudios se requieren para determinar si este resultado se debe a la activación prematura de las CTNq o a otro mecanismo.

## 16 Perspectivas

- Ampliar los análisis de expresión de PLPP3 en la ZSV, usando anticuerpos específicos para la identificación de cada elemento de la ZSV, por ejemplo EGFR, para la identificación de CTNa y células tipo C.
- Corroborar la co-expresión de PLPP3 y del receptor de S1P en las CTN del nicho de la ZSV a través de la visualización indirecta de actividad de  $\beta$ -galactosidasa de nuestro reportero de *Plpp3*.
- Aumentar el número de experimentos del protocolo de administración de BrdU empleado en este trabajo para obtener información concluyente sobre la formación de neuroblastos en ausencia de PLPP3 e identificar a que tipo celular corresponden las células que permanecen marcadas con BrdU en la ZSV (i.e. CTN o atrociitos)
- Diseñar estrategias para definir si la mutación produce una menor activación y por lo tanto mayor número de CTNq o un agotamiento prematuro de la poza de CTN. Por ejemplo, implementar ensayos de administración de BrdU, que nos permitan seguir el destino a largo plazo de las poblaciones de CTN en la ZSV y marcados de corto plazo (2hrs) para evaluar la cantidad de células en división. Cuantificar el número de células mitóticamente activas (Ki67) en la ZSV de animales de diferentes edades para explorar si hay un agotamiento prematuro de las CTN del nicho.
- Establecer estrategias para analizar si la regulación a la baja del receptor S1P<sub>1</sub> en cerebros deficientes en PLPP3, es el mecanismo que da origen a las alteraciones observadas.

## 17 Bibliografía

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.

Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 629-634.

Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., and Heintz, N. (2004). Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron* 41, 881-890.

Bréart, B., Ramos-Perez, W.D., Mendoza, A., Salous, A.K., Gobert, M., Huang, Y., Adams, R.H., Lafaille, J.J., Escalante-Alcalde, D., Morris, A.J., *et al.* (2011). Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress. *208*, 1267-1278.

Brindley, D.N., and Pilquill, C. (2009). Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S225-230.

Calzolari, F., Michel, J., Baumgart, E.V., Theis, F., Gotz, M., and Ninkovic, J. (2015). Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 18, 490-492.

Campbell, K., and Gotz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25, 235-238.

Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 Is Expressed by Adult Mouse CNS Stem Cells, Identifying Them as Nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.

Castro- Hernández, R. (2015). El papel de la LPP3 en la capacidad proliferativa y de diferenciación de precursores neurales del hipocampo adulto en un modelo in vitro. . Tesis de licenciatura en IBB

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014a). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82, 545-559.

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, Angel R., DeLeo, Annina M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014b). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82, 545-559.

Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Jr., Fan, G., *et al.* (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1026-1031.

Cotzomi-Ortega, I. (2015). Efectos de la deficiencia de la LPP3 en la neurogénesis adulta del hipocampo. Tesis de maestría del posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Choi, J.W., and Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 20-32.

Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14895-14900.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron* 36, 1021-1034.

Durbec, P., Franceschini, I., Lazarini, F., and Dubois-Dalcq, M. (2008). In vitro migration

assays of neural stem cells. *Methods Mol Biol* 438, 213-225.

Emsley, J.G., and Macklis, J.D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* 2, 175-186.

Encinas, J.M., and Enikolopov, G. (2008). Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain. In *Methods in Cell Biology* (Academic Press), pp. 243-272.

Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H.S., Jr Gang, C., Sciorra, V.A., Daar, I., Spiegel, S., Morris, A.J., *et al.* (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* 130, 4623-4637.

Escalante-Alcalde, D., Morales, S.L., and Stewart, C.L. (2009). Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3 and its expression during embryogenesis. *Int J Dev Biol* 53, 139-147.

Escalante-Alcalde, D., Sanchez-Sanchez, R., and Stewart, C.L. (2007). Generation of a conditional Ppap2b/Lpp3 null allele. *Genesis* 45, 465-469.

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.-C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., *et al.* (1999). Doublecortin Is a Developmentally Regulated, Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons. *Neuron* 23, 247-256.

Fuentealba, L.C., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell stem cell* 10, 698-708.

Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161, 1644-1655.

Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*.

Goldberg, J.S., and Hirschi, K.K. (2009). Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche. *Regenerative medicine* 4, 879-897.

Gomez-Lopez, S., Martinez-Silva, A.V., Montiel, T., Osorio-Gomez, D., Bermudez-Rattoni, F., Massieu, L., and Escalante-Alcalde, D. (2016). Neural ablation of the PARK10 candidate Plpp3 leads to dopaminergic transmission deficits without neurodegeneration. *Sci Rep* 6, 24028.

Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2009). Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 27, 2032-2043.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 139-150.

Ihrle, R.A., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70, 674-686.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30, 3489-3498.

Jamal, Z., Martin, A., Gomez-Munoz, A., and Brindley, D.N. (1991). Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J Biol Chem* 266, 2988-2996.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-11950.

Johansson, C.B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., and Frisen, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 253, 733-736.

Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F., and Kanoh, H. (1996). Identification and cDNA

cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem* 271, 18931-18938.

Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F., and Kanoh, H. (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem* 272, 24572-24578.

Kim, R.H., Takabe, K., Milstien, S., and Spiegel, S. (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1791, 692-696.

Kimelberg, H.K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* 45, 191-202.

Kohwi, M., Petryniak, M.A., Long, J.E., Ekker, M., Obata, K., Yanagawa, Y., Rubenstein, J.L., and Alvarez-Buylla, A. (2007). A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 27, 6878-6891.

Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nature Neuroscience* 9, 779.

Kok, B.P., 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.

Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., and Temple, S. (2012). VCAM1 Is Essential to Maintain the Structure of the SVZ Niche and Acts as an Environmental Sensor to Regulate SVZ Lineage Progression. *Cell Stem Cell* 11, 220-230.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review of Neuroscience* 32, 149-184.

Lehtinen, Maria K., Zappaterra, Mauro W., Chen, X., Yang, Yawei J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., *et al.* (2011). The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. *Neuron* 69, 893-905.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. 96, 7526-7531.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci* 37, 563-571.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.

Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.

Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.

Lopez-Juarez, A., Morales-Lazaro, S., Sanchez-Sanchez, R., Sunkara, M., Lomeli, H., Velasco, I., Morris, A.J., and Escalante-Alcalde, D. (2011). Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. *Glia* 59, 577-589.

López-Juárez, A., Morales-Lázaro, S., Sánchez-Sánchez, R., Sunkara, M., Lomelí, H., Velasco, I., Morris, A.J., and Escalante-Alcalde, D. (2011). Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. *Glia* 59, 577-589.

Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015a). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17, 329-340.

Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba,

A. (2015b). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17, 329-340.

Mamber, C., Kozareva, D.A., Kamphuis, W., and Hol, E.M. (2013). Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Progress in Neurobiology* 111, 1-16.

Martin, R., and Sospedra, M. (2014). Sphingosine-1 phosphate and central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 378, 149-170.

Matas-Rico, E., Garcia-Diaz, B., Llebregz-Zayas, P., Lopez-Barroso, D., Santin, L., Pedraza, C., Smith-Fernandez, A., Fernandez-Llebregz, P., Tellez, T., Redondo, M., *et al.* (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci* 39, 342-355.

McDermott, M.I., Sigal, Y.J., Crump, J.S., and Morris, A.J. (2006). Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases. *Methods* 39, 169-179.

Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26, 7907-7918.

Merkle, F.T., Fuentealba, L.C., Sanders, T.A., Magno, L., Kessaris, N., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci* 17, 207-214.

Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265-278.

Moore, C.A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R.A. (2004). Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Molecular cell* 14, 833-839.

Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714.

Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814, 23-45.

Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 22, 221-234 e228.

Pastrana, E., Cheng, L.-C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 6387-6392.

Peretto, P., Dati, C., De Marchis, S., Kim, H.H., Ukhanova, M., Fasolo, A., and Margolis, F.L. (2004). Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128, 685-696.

Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1045-1054.

Pyne, N.J., Long, J.S., Lee, S.C., Loveridge, C., Gillies, L., and Pyne, S. (2009). New aspects of sphingosine 1-phosphate signaling in mammalian cells. *Adv Enzyme Regul* 49, 214-221.

Pyne, S., Kong, K.C., and Darroch, P.I. (2004). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol* 15, 491-501.

Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Fariñas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nature*

Neuroscience 9, 331.

Ramos-Perez, W.D., Fang, V., Escalante-Alcalde, D., Cammer, M., and Schwab, S.R. (2015). A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. *Nat Immunol* 16, 1245-1252.

Ribeiro Xavier, A.L., Kress, B.T., Goldman, S.A., Lacerda de Menezes, J.R., and Nedergaard, M. (2015). A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci* 35, 11848-11861.

Rivera-Álvarez, J. (2017). Implicación de la fosfatasa de fosfolípidos-3 en la integración de interneuronas en el bulbo olfatorio de ratones adultos /. Tesis de maestría del posgrado en C Bioquímicas.

Rousselot, P., Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1995). Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 351, 51-61.

Sanchez-Sanchez, R., Morales-Lazaro, S.L., Baizabal, J.M., Sunkara, M., Morris, A.J., and Escalante-Alcalde, D. (2012). Lack of lipid phosphate phosphatase-3 in embryonic stem cells compromises neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 241, 953-964.

Sawada, M., and Sawamoto, K. (2013). Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J Med* 62, 13-28.

Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., *et al.* (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629-632.

Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338-1340.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell stem cell* 3, 289-300.

Shin, J., Berg, D.A., Zhu, Y., Shin, J.Y., Song, J., Bonaguidi, M.A., Enikolopov, G., Nauen, D.W., Christian, K.M., Ming, G.L., *et al.* (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 17, 360-372.

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.

Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.

Takeda, A., Sasaki, N., and Miyasaka, M. (2017). The molecular cues regulating immune cell trafficking. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences* 93, 183-195.

Takeda, A., Umemoto, E., and Miyasaka, M.J.T.C.R. (2015). Lysophosphatidic acid as a regulator of lymphocyte trafficking in the lymph nodes. *2015* 4, 537-543.

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

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* 56, 2048-2060.

Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.

Walker, T.L., Overall, R.W., Vogler, S., Sykes, A.M., Ruhwald, S., Lasse, D., Ichwan, M.,

Fabel, K., and Kempermann, G. (2016). Lysophosphatidic Acid Receptor Is a Functional Marker of Adult Hippocampal Precursor Cells. *Stem Cell Reports* 6, 552-565.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997a). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.

Wichterle, H., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997b). Direct Evidence for Homotypic, Glia-Independent Neuronal Migration. *Neuron* 18, 779-791.

Yung, Y.C., Stoddard, N.C., and Chun, J. (2014). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Lipid Research* 55, 1192-1214.

Yung, Y.C., Stoddard, N.C., Mirendil, H., and Chun, J. (2015). Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in the nervous system. *Neuron* 85, 669-682.