



Análisis de la neurogénesis cortical en el desarrollo cerebral de ratones carentes del receptor de ácido lisofosfatídico LPA₁

Memoria de Tesis presentada por

D. PEDRO FERNÁNDEZ-LLEBREZ ZAYAS

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga

Málaga 2016



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Pedro Fernández-Llebrez Zayas

 <http://orcid.org/0000-0003-3316-3757>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



D. GUILLERMO ESTIVILL TORRÚS, Doctor en Biología, Investigador de la Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Neurociencias de los Hospitales Universitarios Regional de Málaga y Virgen de la Victoria, y Director del Grupo de Investigación en Neuropsicofarmacología de Transmisores Lipídicos, y D. PEDRO FERNÁNDEZ-LLEBREZ Y DEL REY, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, como directores

CERTIFICAN:

Que, D. PEDRO FERNÁNDEZ-LLEBREZ ZAYAS ha realizado en los laboratorios de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga, y en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado: *“Análisis de la neurogénesis cortical en el desarrollo cerebral de ratones carentes del receptor de ácido lisofosfatídico LPA₁”*, y que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, considerando que reúne el rigor científico y las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 3 de noviembre de 2015.

Fdo.- Guillermo Estivill Torrús

Fdo.- Pedro Fernández-Llebrez y del Rey



D^a. ISABEL DE DIEGO BARBADO, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia de la Universidad de Málaga, actuando como tutora del presente trabajo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo realizado por D. PEDRO FERNÁNDEZ-LLEBREZ ZAYAS, objeto de su Tesis Doctoral y titulado: "*Análisis de la neurogénesis cortical en el desarrollo cerebral de ratones carentes del receptor de ácido lisofosfatídico LPA1*", reúne el contenido y rigor científico necesarios para optar al grado de Doctor.

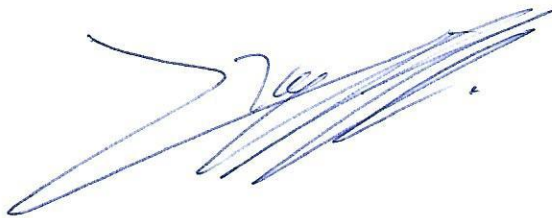
Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga a 4 de noviembre de 2015.

Fdo.- Isabel De Diego Barbado

Yo, Pedro Fernández-Llebrez Zayas, DECLARO que soy autor del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en los laboratorios de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga, y en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, bajo la dirección del Dr. Guillermo Estivill Torrús y el Dr. Pedro Fernández-Llebrez y del Rey.

Igualmente DECLARO que parte del mismo se ha realizado en el Laboratorio del Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Málaga, bajo la supervisión de los Dres. Isabel de Diego Barbado, tutora del presente trabajo, y Anibal Smith-Fernández.

Y para que así conste, firmo esta declaración en Málaga, a 3 de noviembre de 2015.



Fdo. Pedro Fernández-Llebrez Zayas

Este trabajo se ha realizado al amparo del grupo de investigación del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo; Junta de Andalucía), código CTS643, **Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta**, dirigido por el Dr. Guillermo Estivill Torrús, y establecido en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) en Hospital Universitario Regional de Málaga, así como del grupo de investigación **Neuropsicofarmacología de la adicción (CTS433, PAIDI)**, dirigido por el Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca, del mismo centro, y en colaboración con el grupo de Investigación dirigido por el Dr. Pedro Fernández-Llebrez y del Rey, del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga.

Igualmente, ha contado con la colaboración del Dr. Jerold Chun, del Departamento de Neurociencia Celular y Molecular en el Centro Dorris de Neurociencia, en el Instituto de Investigación Scripps en La Jolla, Estados Unidos; la del Dr. José Angel Aguirre, del Departamento de Fisiología Humana y Educación Físico-Deportiva de la Universidad de Málaga; y la del Dr. Francisco Tejedor Rescalvo, director del Grupo de Neurogenética Molecular en el Instituto de Neurociencias (Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Alicante.

El estudio se ha realizado en las siguientes **instalaciones y Estructuras Comunes de Apoyo la Investigación (ECAI)**:

- Laboratorios de Investigación (ECAI de Servicios Generales) y Unidad de Microscopía (ECAI de Imagen), Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga.
- ECAI Centro de Experimentación Animal, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga.
- Laboratorio del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga.

El trabajo ha sido financiado por las siguientes agencias:

Ministerio de Economía y Competitividad

- Título del proyecto: *Participación del ácido lisofosfatídico en la plasticidad del sistema nervioso central. Papel en la regulación de los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria* (Exp.: FIS, PI01/3032 y PI02/1643). Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (expediente asociado actualmente al Ministerio de Economía y Competitividad). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Guillermo Estivill Torrús.

- Título del proyecto: *Papel del ácido lisofosfatídico (LPA) en la neurogénesis embrionaria y de adultos. Estudio de ratones mutantes para el receptor LPA₁* (Expediente: FIS PI02/ 1517). Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (expediente asociado actualmente al Ministerio de Economía y Competitividad). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Pedro Fernández-Llebrez y del Rey

- Título del proyecto: *Alteraciones cognitivas y emocionales inducidas por estrés: papel del ácido lisofosfatídico* (Expediente: FIS PI07/ 0629). Ayudas del Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud. 2007. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (expediente asociado actualmente al Ministerio de Economía y Competitividad). Ayuda cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigador principal: Guillermo Estivill Torrús.

Consejería de Economía y Conocimiento

- Incentivos a grupos de investigación no universitarios. Grupos PAIDI del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación, código CTS643, *Neuropsicofarmacología de los Transmisores Lipídicos. Génesis neural y conducta* (Investigador principal: Guillermo Estivill Torrús) y código CTS433, *Neuropsicofarmacología de la Adicción* (Investigador principal: Fernando Rodríguez de Fonseca).

Financiación internacional

- *Role of Lysophosphatidic acid in memory processes. Human Frontier Science Program 2000-2003*. Investigador Principal: Dr Fernando Rodriguez de Fonseca

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su ayuda y participación en esta etapa. Ha pasado tiempo desde que comencé este proyecto y durante el mismo he tenido la gran suerte de coincidir con grandes compañeros, los cuales me han ayudado a crecer como profesional y sobre todo como persona. De todos ellos me llevo no solo recuerdos, sino la suerte de haber ganado grandes amigos.

Antes de nada, constatar que este trabajo no sería posible sin la gran ayuda y guía del Dr. Guillermo Estivill. Gracias Guillermo por acogerme en el equipo como uno más desde el primer día, en aquellos inicios del grupo, y confiar en mí para la realización de este proyecto. Incluso en los momentos de flaqueza estabas siempre ahí para guiarme y reforzar el camino a seguir. Tanto en una dura mañana de estabulario, como en una tarde de “western-blot”... en las que ya el cansancio hacia mella... tú siempre conseguiste hacerme seguir con un mensaje de optimismo. Más allá, gracias por haber estado ahí, desde los comienzos hasta la parte final de este proyecto, sin importar los altos en el camino. Este trabajo es fruto de tu visión y guía. Darte las gracias de corazón. Siempre he podido contar contigo.

A Isabel de Diego, gracias. Creo que no hubiera podido tener una tutora más comprensiva y colaboradora. Te agradezco toda la ayuda durante el tiempo que estuve en tu laboratorio de medicina, siempre estuviste disponible para guiarme en esos días y, últimamente, has soportado estoicamente todas mis peticiones, dándome siempre el mejor soporte necesario.

A Fernando Rodríguez de Fonseca, gracias por el soporte dado y tus sabias palabras desde mis comienzos en la fundación, y por aceptarme como uno más del grupo desde el principio. Siempre pude contar con tu colaboración y por ello te doy las gracias de corazón.

A TODOS mis compañeros del hospital civil. Fue mucho tiempo compartido y muchos cafés y risas en aquel sótano. Siempre me sentí muy arropado por todos los compañeros de los diferentes grupos. No quiero olvidar a nadie, pero claro, no puedo evitar agradecer especialmente a Eli, Yanina, Néstor, Bea, Javi, Toñi, Javi Pavón, Pepe, Begoña, Cristina, Yolanda, Lourdes, Jose, Eva, Maria Jesús, Juanmi, Manuel, Belén... gracias por todos los buenos momentos compartidos.

Si cierro los ojos y pienso en momentos divertidos de esta etapa... me veo con Yanina y Néstor en la sala genotipando... gracias chicos por las risas, los días se hacían cortos con vosotros.

Gracias Eli por ser la gran compañera de aventuras en el LPA, que gran equipo hicimos, con la adición estelar de Bea. Fue una gran etapa en la que trabajamos duro y también pasamos muy buenos momentos.

Mamá, GRACIAS. A pesar de que a veces me queje de tu insistencia... eres el motor de la mayoría de cosas buenas que me han pasado en la vida. Haces todo posible.

Gracias a mis hermanas Rosi, Ana, y gracias Helen por ser la pequeña que siempre me entiende y me acompaña.

Agradecer al Dr. Pedro Fernández-Llebrez del Rey, que casualmente responde también al título de “Padre”. Gracias Papá por ser tú, no hace falta detallarlo más. Sencillamente, y olvidando la parte académica...no sería la persona que soy hoy en día sin tu ejemplo.

Por ultimo... agradecer a la persona que ha vivido conmigo de manera más intensa la larga andadura de este proyecto. Si, esa persona que se dedicaba a ordenar eppendorfs en el tiempo libre para hacerlo todo más eficiente, aquella que se dedicaba a poner “post its” de frases del equipo, aquella que se “escudaba en la ironía”, aquella que nunca tenía un “No” a poner una inmuno sea la hora que fuera sin importar la cantidad de portas, aquella que repetía el arroz con leche del materno, aquella que ha vivido este trabajo junto a mi hasta el final.

Gracias Elvira, por acompañarme en la andadura de la vida y ser coautora de las dos mejores obras que podríamos haber creado: Julia y Lara.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known”
-Carl Sagan

A mi Familia

RESUMEN

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un fosfolípido sencillo con propiedades de señalización extracelular mediadas por receptores de membrana específicos acoplados a proteínas G. Actualmente se conocen hasta 6 tipos de receptores diferentes para el LPA. El receptor LPA₁ se expresa en la zona neurogénica del cerebro en desarrollo, en la zona ventricular (VZ), lo que sugiere su implicación en la neurogénesis. A pesar de los numerosos estudios farmacológicos que han aportado datos de los efectos del LPA en el sistema nervioso central (SNC) utilizando modelos in vitro, no es sino hasta que se dispuso de animales carentes del receptor, cuando se avanzó en el estudio de la función específica del receptor. Los primeros ratones obtenidos que permitían el estudio de pérdida de función del receptor LPA₁ mostraron una alta mortalidad perinatal pero abrían una puerta excelente a nuevos estudios de caracterización del SNC en ausencia de vías específicas de señalización por LPA.

En el presente trabajo se muestran resultados que demuestran una función destacada del receptor LPA₁ en los precursores neuronales corticales durante el desarrollo cerebral, resultantes del análisis de la neurogénesis en una variante, que hemos venido a denominar *Málaga*, de un ratón nulo para-LPA₁. Esta variante surge de forma espontánea durante la expansión de la colonia original y porta un fenotipo con defectos observables en el SNC, a la vez que muestra una viabilidad perinatal casi completa, lo que ha permitido su caracterización.

Nuestros resultados muestran alteraciones significativas en la neurogénesis cortical embrionaria, en el patrón proliferativo de la zona ventricular, afectando al tipo de división y la posterior diferenciación, con expresión de marcadores neuronales de forma prematura en la capa cortical y alteración de la expresión de factores de transcripción. Estos defectos de la neurogénesis en ausencia de la vía de señalización por LPA₁ se asocian con defectos en el patrón migratorio neuronal, indicativos de alteraciones de tipo estructural y funcional, y que generan, en última instancia, una reducción del grosor de la pared cortical y del número de neuronas en diferentes capas corticales, especialmente las profundas donde se detecta, además, un nivel inusualmente mayor de apoptosis.

Los resultados que mostramos en esta memoria reflejan, con ello, la necesidad del receptor LPA₁ para el desarrollo normal cerebral y acentúan el importante papel que el modelo de animal nulo para LPA₁ de la variedad *Málaga* ha representado para el estudio de la señalización mediada por este receptor. A la fecha actual, el uso de este ratón ha permitido un avance muy significativo en el campo y sigue siendo objeto de estudio por nuestro grupo de investigación y por diferentes colaboradores a nivel nacional e internacional.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION

1.1 El ácido Lisofosfatídico (LPA)	2
1.1.1 Síntesis y Metabolismo del LPA	3
1.1.2 Receptores de LPA	7
1.1.3 Tipos de receptores de LPA	10

1.2 Neurogénesis cortical y desarrollo del sistema nervioso central (SNC).	13
1.2.1. Formación del tubo neural.	13
1.2.2. El epitelio germinativo. Zona ventricular y subventricular	16
1.2.3. Migración nuclear intercinética.	18
1.2.4. Tipos de divisiones: simétricas y asimétricas	20
1.2.5. Estructura de la corteza cerebral	22
1.2.6. Factores reguladores de la neurogénesis cortical analizados en este estudio.	26

1.3. Efectos biológicos del LPA e implicación en el desarrollo del SNC	29
---	-----------

1.4. El ratón nulo para el receptor LPA₁ y la variedad Málaga. Neurogénesis e implicaciones en el ratón adulto.	39
---	-----------

<u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	45
--	-----------

<u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	49
-------------------------------------	-----------

3.1. Animales de experimentación	51
---	-----------

3.2. Genotipado	54
------------------------	-----------

3.3. Fijación y procesamiento del material para microscopía óptica	56
---	-----------

3.3.1. Fijación del tejido y procesamiento en parafina para microtomo convencional	56
---	----

3.3.2. Fijación del tejido y procesamiento para microtomo de congelación	57
--	----

3.3.3. Fijación del tejido y procesamiento de secciones para criostato	58
--	----

3.3.4. Fijación del tejido y procesamiento de secciones para vibratomo	58
--	----

3.4. Histoquímica e inmunohistoquímica	59
---	-----------

3.4.1. Tinción de hematoxilina – eosina	59
---	----

3.4.2. Inmunohistoquímica	59
---------------------------	----

3.4.2.1. Antígenos analizados y anticuerpos usados para su detección	59
--	----

3.4.2.2. Tinción inmunohistoquímica	62
-------------------------------------	----

3.4.2.3. Inmunodetección y cuantificación de la bromodeoxiuridina	64
---	----

3.4.2.4. Inmunodetección y cuantificación neuronal. Estereología	66
--	----

3.5. Análisis de la muerte celular por apoptosis durante el desarrollo	67
---	-----------

3.6. Hibridación in situ	69
---------------------------------	-----------

3.6.1. Marcaje de sondas	69
--------------------------	----

3.6.2. Procesamiento e hibridación	71
------------------------------------	----

3.6.3. Detección de la sonda	72
------------------------------	----

3.7. Análisis in vitro: cultivos celulares e inmunocitoquímica	73
---	-----------

3.7.1. Variables analizadas. Morfología celular	75
---	----

3.7.2. Variables analizadas. Marcaje con bromodesoxiuridina y cinética celular	76
---	----

3.7.3. Variables analizadas. Detección de bromodesoxiuridina y marcadores de diferenciación	77
3.7.4. Tinción inmunocitoquímica	78
3.8. Electroforesis, transferencia e inmunotinción de proteínas	81
3.8.1. Extracción de proteínas	82
3.8.2. Electroforesis de proteínas	84
3.8.3. Transferencia e Inmunodetección	85
3.9. Análisis estadístico de los datos y edición de imágenes	87
3.10. Anexo I	89
4. RESULTADOS	93
4.1. Fenotipo de los ratones <i>Málaga</i> nulos para LPA₁	94
4.2. Características generales del cerebro de los ratones <i>Málaga</i> nulos para LPA₁	99
4.2.1. Anatomía del encéfalo en ausencia del receptor LPA ₁	99
4.2.2 Expresión del receptor LPA ₁ en el encéfalo de los ratones maLPA ₁ -nulos	101
4.3. Análisis de la zona proliferativa cortical en los ratones <i>Málaga</i> nulos para LPA₁	103
4.3.1. Alteración del patrón de proliferación y diferenciación cortical en ausencia del receptor LPA ₁	103
4.3.2. Expresión anómala de genes reguladores de neurogénesis cortical en ausencia del receptor LPA ₁	110
4.3.3. Inversión de la proporción del tipo de división adoptado por los precursores corticales apicales en ausencia del receptor LPA ₁	112
4.3.4. Dinámica de proliferación y diferenciación de neuroblastos corticales en ausencia del receptor LPA ₁	114
- <i>Respuesta a LPA en neuroblastos corticales de ratones en E14.5</i>	115
- <i>Proliferación y diferenciación en neuroblastos corticales de ratones en E14.5</i>	116
- <i>Cinética del ciclo celular en neuroblastos corticales de ratones en E14.5</i>	118
4.4. Alteraciones en la formación cortical en los ratones <i>Málaga</i> nulos para LPA₁	120
4.4.1. Migración cortical y diferenciación anómalos en ausencia del receptor LPA ₁	120
4.4.2. Apoptosis cortical embrionaria y postnatal en ratones maLPA ₁ -nulos	127
4.4.3. Reducción neuronal en la corteza cerebral de ratones maLPA ₁ -nulos	129
5.- DISCUSIÓN	133
6.- CONCLUSIONES	143
7. BIBLIOGRAFÍA	147

Relación de figuras

- Figura 1.** Modelo molecular espacial y estructura química del LPA.
- Figura 2.** Vías de producción extracelular de LPA.
- Figura 3.** Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA.
- Figura 4.** Filogenia y distribución de los receptores LPA.
- Figura 5.** Imágenes de la neurulación en el embrión.
- Figura 6.** Esquema de desarrollo cortical.
- Figura 7.** Migración nuclear intercinética en los progenitores apicales.
- Figura 8.** Huso mitótico y división en los progenitores apicales.
- Figura 9.** Evolución del tipo de división celular durante la neurogénesis.
- Figura 10.** Estructura de la corteza cerebral .
- Figura 11** Formación de capas corticales.
- Figura 12.** Corticogénesis durante los estadios de desarrollo de ratón .
- Figura 13.** Expresión del gen *Lpar1* en la zona ventricular telencefálica.
- Figura 14.** Acción propuesta para el LPA durante la neurogénesis cortical.
- Figura 15.** Posibles funciones del LPA en las neuronas postmitóticas.
- Figura 16.** Expresión temporal y celular de los diferentes receptores de LPA.
- Figura 17.** Alteraciones morfológicas y defectos neuronales en ratones adultos nulos para el receptor LPA₁.
- Figura 18.** Esquema de la delección del gen *Lpar1* en la cepa original de ratones nulos para LPA₁
- Figura 19.** Vista de embriones de ratón tras su extracción.
- Figura 20.** Esquema del ensayo de detección de la delección de *Lpar1* en los animales de experimentación.
- Figura 21.** Región utilizada para el aislamiento de neuroblastos corticales en embrión de ratón de estadio E14.5.
- Figura 22.** Esquema de áreas de recuento celular en hemocitómetro.
- Figura 23.** Representación usada para el cálculo de parámetros de cinética celular.
- Figura 24.** Representación de la placa de 96 pocillos utilizada para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras a través del ensayo de Bradford.
- Figura 25.** Esquema de la colocación del gel y la membrana para la electrotransferencia.
- Figura 26.** Reducción de masa corporal en ausencia del receptor LPA₁ en los ratones maLPA₁-nulos.
- Figura 27.** Reducción de tamaño corporal en los ratones maLPA₁-nulos.
- Figura 28.** Ausencia de defectos de amamantamiento en los ratones maLPA₁-nulos.
- Figura 29.** Anatomía y peso del cerebro en la variedad *Málaga* nula para LPA₁.
- Figura 30.** Histología general y de la corteza cerebral de los ratones *Málaga* nulos para LPA₁.
- Figura 31.** Corteza cerebral de ratones *Málaga* nulos para LPA₁ en edad P0.
- Figura 32.** Detección del receptor LPA₁ en la zona ventricular durante el desarrollo.
- Figura 33.** Patron proliferativo y postmitótico cortical en estadio E11.5 para ratones *Málaga* normales, heterocigotos y nulos para LPA₁
- Figura 34.** Patron proliferativo y postmitótico cortical en estadio E14.5 para ratones *Málaga* normales, heterocigotos y nulos para LPA₁
- Figura 35.** Patron proliferativo y postmitótico cortical en estadio E16.5 para ratones *Málaga* normales y nulos para LPA₁.
- Figura 36.** Reducción del número de mitosis en ausencia del receptor LPA₁.
- Figura 37.** Patron de expresión de *Pax6*, *Tbr2*, *Tis21*, *Ngn1* y *Ngn2* en la neurogénesis cortical temprana de ratones normales y nulos para LPA₁.
- Figura 38.** La ausencia del receptor LPA₁ en los precursores neurales invierte la proporción del tipo de orientación del plano de división.
- Figura 39.** Efecto de la adición de LPA en cultivos celulares de neuroblastos corticales obtenidos de embriones normales y nulos para LPA₁.

- Figura 40.** Análisis in vitro de los precursores neurales de ratones maLPA₁-nulos.
- Figura 41.** Cinética del ciclo celular de los precursores neurales de ratones maLPA₁-nulos.
- Figura 41. Figura 42.** Migración cortical temprana alterada en ausencia del receptor LPA₁.
- Figura 43.** Migración anómala a capas superiores en ausencia del receptor LPA₁.
- Figura 44.** Conexión talamocortical y corticotalámica en ausencia del receptor LPA₁.
- Figura 45.** Deficiencia cortical de GAP-43 como consecuencia de las alteraciones de desarrollo en ratones nulos para LPA₁.
- Figura 46.** Aumento de apoptosis en la corteza cerebral de ratones *Málaga* nulos para LPA₁.
- Figura 47.** Reducción neuronal en la corteza cerebral de ratones maLPA₁-nulos

Relación de tablas

Tabla 1. Resumen de las funciones identificadas de los receptores de LPA en enfermedades relacionadas con el SNC y periférico.

Tabla 2. Análisis del genotipado de la camada de ratones maLPA₁-nulos según el genotipo específico parental.

Tabla 3. Cuantificación estereológica del número de neuronas corticales en los ratones adultos de los diferentes genotipos estudiados.

1. INTRODUCCIÓN

Si tuviéramos que elegir una estructura biológica en la que tuviéramos aún más preguntas por responder a día de hoy, seguramente elegiríamos el sistema nervioso central (SNC). De entre todas las cuestiones en las que nos planteamos incógnitas, una de las más importantes es la formación de nuevas células neuronales. En mamíferos, incluido el propio ser humano, la formación de nuevas neuronas es parte constitutiva del desarrollo cerebral y las alteraciones de la misma pueden tener repercusiones no sólo en edades tempranas sino durante el resto de la vida del individuo dando lugar a diferentes patologías. Además, la neurogénesis no es un proceso restringido al desarrollo, sino que tiene lugar también en determinadas áreas del cerebro adulto. La neurogénesis adulta es esencial en respuestas plásticas ante diferentes acontecimientos de variado origen, participando en procesos esenciales para el correcto funcionamiento cerebral y representado, por otra parte, una diana terapéutica para diferentes patologías de índole neurodegenerativo y neuropsiquiátrico, como en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, los trastornos de tipo emocional o la adicción.

Es, por ello, preciso conocer cómo se regulan todos estos procesos. Aún estando claramente diferenciadas, la neurogénesis adulta y la que tiene lugar durante el desarrollo guardan similitudes en numerosos aspectos, entre ellos, determinados factores intrínsecos y extracelulares que afectan, de manera común, a la morfología, división, migración y supervivencia celular (Urban y Guillemot, 2014; Zhang y Jiao, 2015).

La lista de estos factores reguladores que modulan la neurogénesis ha ido creciendo de manera continuada.

De entre todos estos posibles factores, hace unos años se identificó al ácido lisofosfatídico (LPA, del inglés *lysophosphatidic acid*), una molécula lipídica de pequeño tamaño que se ha demostrado tener un papel significativo en la regulación del SNC. En esta introducción desarrollaremos la estructura y modo de acción del mismo e, igualmente, revisaremos el desarrollo del sistema nervioso central y la implicación de esta molécula en los procesos de desarrollo del SNC, de manera preliminar a la exposición de los objetivos del presente trabajo de investigación.

Es importante destacar que la presente memoria refleja una investigación llevada a cabo durante el período transcurrido entre los años 2003 y 2007, parte de la cual ha sido ya difundida en revistas del área de estudio. A objeto de no generar confusión en la memoria y dar sentido al desarrollo de hipótesis y objetivos, se han excluido de la introducción las aportaciones fruto de esta investigación, aún cuando buena parte de los trabajos en

efectuados posteriormente por nuestro grupo de investigación así como diferentes grupos en otros centros, y que sí se mencionan, se apoyen en los mismos.

1.1 El ácido Lisofosfatídico (LPA)

El 1-*sn*-glicerol-3-fosfato o ácido lisofosfatídico (LPA, del inglés *lysophosphatidic acid*) es un lisofosfolípido endógeno bioactivo formado por un grupo fosfato y una molécula de glicerol unida a una cola de ácidos grasos de grado de saturación y de longitud variables, con uniones de tipo éster, generalmente (Fig. 1). Inicialmente, se le atribuyó la función de ser un precursor en la biosíntesis de diferentes complejos lipídicos, tanto en células procariontas como eucariotas (Pieringer y Hokin, 1962). En 1986 se comprobó que las moléculas de ácido fosfatídico (PA, del inglés *phosphatidic acid*) podían servir como ionóforos naturales de calcio (Ca²⁺), actuando como factores de crecimiento (Moolenaar et ál., 1986). Años más tarde el mismo grupo comprobó que el LPA, en fibroblastos, generaba movilización de Ca²⁺, y mostraba una importante capacidad mitogénica (van Corven et ál., 1989; Jalink et ál., 1990), y actuando a través de, al menos, dos proteínas G heteroméricas (van Corven et ál., 1989). En 1996, el grupo dirigido por Jerold Chun en el Instituto de Investigación Scripps en La Jolla, aisló e identificó, en mamíferos, el gen del primer receptor funcional del LPA en la zona ventricular cerebral embrionaria, correspondiente a un receptor acoplado a proteína G (GPCR, del inglés, *G-protein-coupled receptor*), y que denominaron inicialmente, por la zona de expresión *vzg-1* (del inglés, *ventricular zone gen-1*, conocido posteriormente como *Edg2*; actualmente *LPAR1/Lpar1*, según atiende a humano o roedores) (Hecht et ál., 1996).

Este fue el punto de partida para que diferentes grupos de investigación empezasen a caracterizar las funciones del LPA en los diversos sistemas biológicos.

A día de hoy se ha demostrado que el LPA, el cual no es sino un pequeño lípido bioactivo endógeno, influye en la regulación de procesos tales como la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia de células, funciones que son reguladas por medio de receptores específicos (LPA₁₋₆) ampliamente distribuidos en el organismo en diferentes tejidos y tipos celulares (Noguchi et ál., 2009; Choi et ál., 2010; Mutoh et ál., 2012; Kihara et ál., 2014, 2015). Estos receptores presentan un alto nivel de conservación, no sólo en mamíferos, sino en vertebrados, si bien, en el hombre, muestran algunos aminoácidos en sus secuencias, críticos para la unión del ligando al receptor (Fukushima et ál., 2015).

La variedad de procesos biológicos donde está presente su señalización es ciertamente amplia y de índole muy diverso, interviniendo en procesos biológicos tales como la neurogénesis, la mielinización, la formación de vasos sanguíneos, la fertilidad y la reproducción, inducción del dolor neuropático o progresión tumoral, el desarrollo óseo, o el mantenimiento del pelo, entre otros, así como en diversas patologías como la hidrocefalia, la fibrosis pulmonar o la fibrosis renal (Noguchi et ál., 2009; Choi et ál., 2010; Aikawa et al., 2015 Sheng et al., 2015) o, incluso, en procesos cognitivos tales como la consolidación de la memoria espacial a largo plazo (Dash et ál., 2004). A lo largo de este trabajo se citará genéricamente LPA sin especificar la especie concreta del mismo si bien, la más abundante y común en la mayor parte de órganos y tejidos, así como la más ampliamente estudiada en administración exógena, es la correspondiente al oleil-LPA, insaturado y de 18 átomos de carbono en su cadena.

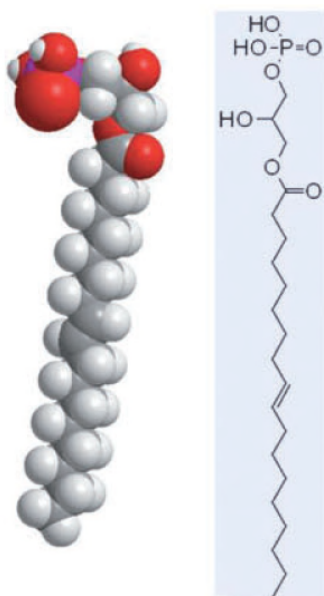


Figura 1. Modelo molecular espacial y estructura química del LPA. El LPA es un lisofosfolípido con un grupo fosfato en su extremo anclado, junto al glicerol, a la cadena hidrocarbonada lipídica. En la imagen se ha representado la especie de LPA correspondiente al oleil-LPA, LPA C18:1⁹, insaturado, de 18 átomos de carbono en su cadena, enlace doble en posición 9, por tratarse del más común (imagen obtenida de Mutoh et al., 2012).

1.1.1 Síntesis y Metabolismo del LPA

El LPA se encuentra presente en suero (Tigyi y Miledi, 1992; Baker et ál., 2000; Aoki et ál., 2002; Sano et ál., 2002), saliva (Sugiura et ál., 2002), fluido seminal (Hama et ál., 2002), fluido

folicular (Tokumura et ál., 1999), clara de huevo de gallina (Nakane et ál., 2001) y líquido cefalorraquídeo (Sato et ál., 2005). La mayor cantidad de LPA se encuentra en el suero y en el plasma sanguíneo y, por tanto, es donde ha sido estudiado mayormente (Tigyi y Miledi, 1992; Baker et ál., 2000; Aoki et ál., 2002). Es importante destacar que se ha visto que los niveles séricos de LPA se pueden encontrar elevados en condiciones fisiopatológicas específicas como ocurre en el cáncer de ovario (Nakane et ál., 2001), la aterosclerosis (Siess et ál., 1999) o en daños en el sistema nervioso (Kusaka et ál., 1998). En los fluidos biológicos el LPA se encuentra asociado a proteínas, siendo en sangre, principalmente, la albúmina, presente de manera abundante, la proteína a la cual se asocia casi en exclusividad, y crítica, no sólo para el transporte, sino para la activación del receptor (Hama et ál., 2002).

El LPA es producido extra e intracelularmente a partir de los fosfolípidos de membrana. La síntesis extracelular (Fig. 2) puede ser llevada a cabo tanto por activación plaquetaria, como independiente de dicha activación. Cada una de estas vías son responsables de, aproximadamente, la mitad de la producción de LPA presente en el suero (Aoki et ál., 2002). En ambas vías es vital la acción de la autotaxina (ATX, del inglés, *autotaxine*), enzima con actividad lisofosfolipasa D (Aoki, 2004), que interviene en la síntesis de LPA bien a partir de lisofosfolípidos (lisofosfatidilcolina -LPC-, lisofosfatidilserina -LPS-, o lisofosfatidiletanolamina -LPE-; respectivamente, del inglés, *lysophosphatidyl-choline*, *-serine*, *-ethanolamine*) que proceden de la acción de las fosfolipasas A₁ y A₂, sobre fosfolípidos liberados por las plaquetas; o bien de lisofosfolípidos (p. ej., LPC) procedentes de la hidrólisis de lipoproteínas plasmáticas por la acción de enzimas como la lectin-colesterol acetil-transferasa o similares a la fosfolipasa A₁ (Aoki et al., 2002, 2004, 2008).

Por otra parte, encontramos una ruta de biosíntesis alternativa que tiene lugar en las membranas celulares. En esta vía, el elemento principal es el ácido fosfatídico (PA) que se genera en la región citosólica de la célula bien a partir de los fosfolípidos, (por acción de la fosfolipasa D (PLD, del inglés, *phospholipase D*) o bien a partir del diacilglicerol (por acción de la diacilglicerol quinasa). El PA generado se dirige a la región extracelular por un mecanismo de translocación y, una vez en la capa externa de la bicapa lipídica, y por acción de las fosfolipasas A₁ y A₂ dará lugar a LPA (Aoki et ál., 2002; Aoki, 2004; Aoki et ál., 2008). Esta vía genera una menor cantidad de LPA que las anteriores, debido a la menor proporción de PA en los diferentes tipos celulares (Sano et ál., 2002). Sin embargo permite generar rápidamente LPA en respuesta a diferentes estímulos, lo cual nos conduce a pensar que la concentración de LPA en el suero es altamente regulable ya que no sólo se puede inducir su síntesis sino que también se puede

inhibir su producción constitutiva actuando sobre sus precursores o sus enzimas de síntesis (Shen et ál., 1998; Eder et ál., 2000).

A nivel intracelular la síntesis se produce a partir de fosfolípidos y triacilglicerol y tiene lugar en el retículo endoplasmático o en las mitocondrias a partir de la acilación del glicerol-3-fosfato y la acil-coenzima A por la acción de la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa y a partir de la fosforilización del monoacilglicerol por la enzima monoacilglicerol quinasa (Bektas et ál., 2005). Esta vía tiene lugar en organismos más simples en los cuales la acción del LPA extracelular no ha sido observada. Es más, no hay certeza de que el LPA sea liberado al medio extracelular (Dircks y Sul, 1999), y se piensa que el LPA sintetizado intracelularmente no llega a ser empleado como mensajero extracelular sino como intermediario para la biosíntesis de otros fosfolípidos (Okudaira et ál., 2010).

En cuanto a la degradación, se identifican tres vías principales de degradación del LPA: acción de fosfatasa, conversión a PA, y por último, a través de la formación de glicerol fosfato (PG, del inglés, phosphoglycerol) (Tigyi y Parrill, 2003).

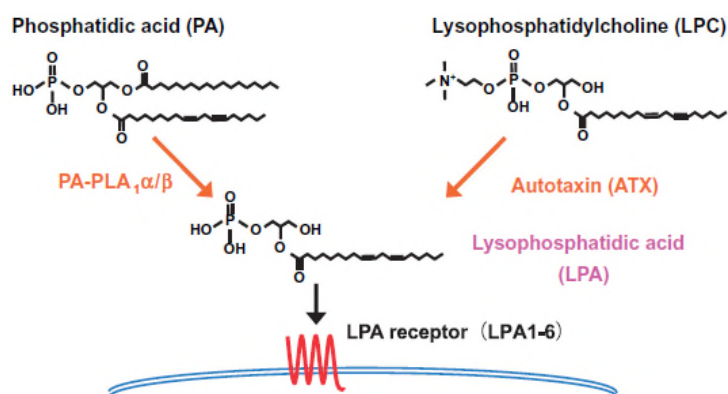


Figura 2. Vías de producción extracelular de LPA. La ATX hidroliza lisofosfolípidos, principalmente LPC, procedente tanto de vía dependiente, como independiente, de actividad plaquetaria, convirtiéndolo en LPA. En la vía alternativa se genera LPA a partir del PA, que será objeto de la actividad catalítica de las fosfolipasas A₁ y A₂. En la imagen se representa la fosfolipasa A₁ específica de ácido fosfatídico (PA-PLA₁, del inglés *PA-selective phospholipase A₁*). El LPA actúa a través de receptores acoplados a proteínas G estimulando diferentes respuestas celulares (proliferación celular, migración, supervivencia).

Como se ha mencionado, la enzima clave en la síntesis de LPA es la ATX (gen: *Enpp2*), de la familia de las ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa. Se trata de una glucoproteína con actividad lisofosfolipasa D que actúa catalizando la hidrólisis de lisofosfolípidos a LPA (Tokumura et ál., 2002; Umezu-Goto et ál., 2002; Ferry et ál., 2003). La ATX se expresa

intensamente en el riñón, en el cerebro (sobre todo en los plexos coroideos), y en los órganos linfoides (Nakasaki et ál., 2008; Nakamura et ál., 2009), existiendo, además, una correlación directa entre la concentración sérica de LPA y la actividad enzimática de la ATX de tal manera que, en ausencia de ésta, no se produce LPA (Tanaka et ál., 2006; Tsuda et ál., 2006; Aoki et ál., 2008). En condiciones fisiológicas especiales su concentración en sangre puede aumentar notablemente, como ocurre en el embarazo (Iwasawa et ál., 2009), la hepatitis C crónica (Watanabe et ál., 2007) o el cáncer (Nam et ál., 2000; Nakamura et ál., 2007c).

En el sistema nervioso se ha observado la presencia de una isoforma, la fosfodiesterasa- α /autotaxina (PD- α /ATX) (Narita et ál., 1994; Kawagoe et ál., 1995; Fuss et ál., 1997). La PD- α /ATX es imprescindible para el desarrollo embrionario, etapa transcurrida la cual, su expresión se ve disminuida (Tanaka et ál., 2006; van Meeteren et ál., 2006; Savaskan et ál., 2007). En el adulto, se ha detectado expresión de la enzima en la sustancia blanca, los plexos coroideos, las células leptomeningiales, la zona subventricular (Savaskan et ál., 2007) y en el líquido cefalorraquídeo (Sato et ál., 2005). Una de las células implicadas en la secreción de ATX al medio extracelular son los oligodendrocitos (Kawagoe et ál., 2005; Fuss et ál., 1997). Se ha observado secreción de ATX por los oligodendrocitos en diferenciación durante los estadios iniciales de mielinización, y que dicha ATX estimula procesos de adhesión y conectividad celular por una vía independiente de su actividad lisofosfolipasa D (Narita et ál., 1994; Fuss et ál., 1997; Cervera et ál., 2002; Jaillard et ál., 2005; Dennis et ál., 2008). Estos estudios coinciden con las observaciones que sugieren un papel importante para el LPA en la mielinización, merced a su expresión en oligodendrocitos durante la mielinización (Weiner et ál., 1998; Handford et ál., 2001; Cervera et ál., 2002). A raíz de esta vinculación con procesos mielinizantes se ha investigado la expresión de ATX en patologías desmielinizantes, observando sobreexpresión en pacientes con esclerosis múltiples (Hammack et ál., 2004). La sobreexpresión de ATX también se ha relacionado con la activación de los astrocitos en cerebros lesionados (Savaskan et ál., 2007), y se ha identificado en la corteza cerebral de pacientes con demencia senil tipo Alzheimer (Umemura et ál., 2006).

Los ratones nulos para la ATX presentan importantes alteraciones funcionales ya que los embriones no sobreviven debido a los déficits vasculares (Tanaka et ál., 2006; van Meeteren et ál., 2006) y a la malformación del tubo neural (Fotopoulou et ál., 2010).

1.1.2 Receptores de LPA

El ácido lisofosfatídico es un mensajero que actúa uniéndose a receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR), de amplia distribución en diferentes órganos y tejidos. (Fukushima et ál., 1998, 2001; Fukushima y Chun, 2001; Goetzl y Tigyi, 2004).

Hasta la fecha se han descrito 6 receptores (LPA₁₋₆), los cuales se diferencian según su localización tisular y la vía de señalización intracelular que generan, dependiendo ésta del tipo de proteína G asociado: G_{α12/13}, G_{αi/0}, G_{αq/11} y G_{αs} (Hecht et ál., 1996; Moolenaar et ál., 2004; Choi et ál., 2009; Choi et ál., 2010; Mutoh et ál., 2012; Choi y Chun, 2013; Kihara et ál., 2014). Según el mismo, se obtendrían respuestas celulares mediante cascadas de señalización y que, de manera resumida, son las citadas a continuación y representadas en la figura 3:

- G_{α12/13}: activa la proteína RhoA, de la familia de las Rho GTPasas, responsable, a través de la activación de ROCK (quinasa asociada a Rho, del inglés, *Rho-associated kinase*) o de SRF (factor de respuesta sérico, del inglés, *serum response factor*) de activar respuestas neuronales tales como proliferación y migración (Yan et ál., 2003), cambios en el citoesqueleto, formación de fibras de estrés y retracción de neuritas (Fukushima et ál., 1998; Ishii et ál., 2004), y se activan procesos de apoptosis (Ye et ál., 2002).
- G_{αq/11}: Activa la vía de la fosfolipasa C (PLC, del inglés, *phospholipase C*) resultante, en última instancia, de acumulación y movilización de Ca²⁺ intracelular (Choi et ál., 2010). La activación de PLC activa, a su vez, las vías de inositol-3-fosfato (IP₃, del inglés, *inositol 1,4,5-trisphosphate*) y diacilglicerol (DAG, del inglés, *diacylglycerol*), y éstas, a su vez y respectivamente, la de la proteína quinasa C (PKC, del inglés, *protein kinase C*) y la movilización de calcio.
- G_{αi/0}: activa la vía mediada por Ras, DAG, y de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés *phosphoinositol 3-kinase*), además de inhibir la mediada por la adenilato ciclasa (AC). Mientras que la vía de Ras activa la de la proteína quinasa activada por mitógeno MAPK (del inglés, *mitogen activated protein kinase*), la del PI3K activa las vías de las proteínas Akt y Rac. Se identifica con efectos anti-apoptóticos (Ye et ál., 2002) y migración / proliferación celular a través de la vía Akt (Yan et ál., 2003; Kim et ál., 2006).
- G_{αs}: Activa la vía de la adenilato ciclasa (AC), responsable de producir acumulación de adenosín monofosfato cíclico o AMPc (cAMP, del inglés, *cyclic AMP*, *cyclic adenosine monophosphate*) intracelular (Lee et ál., 2008).

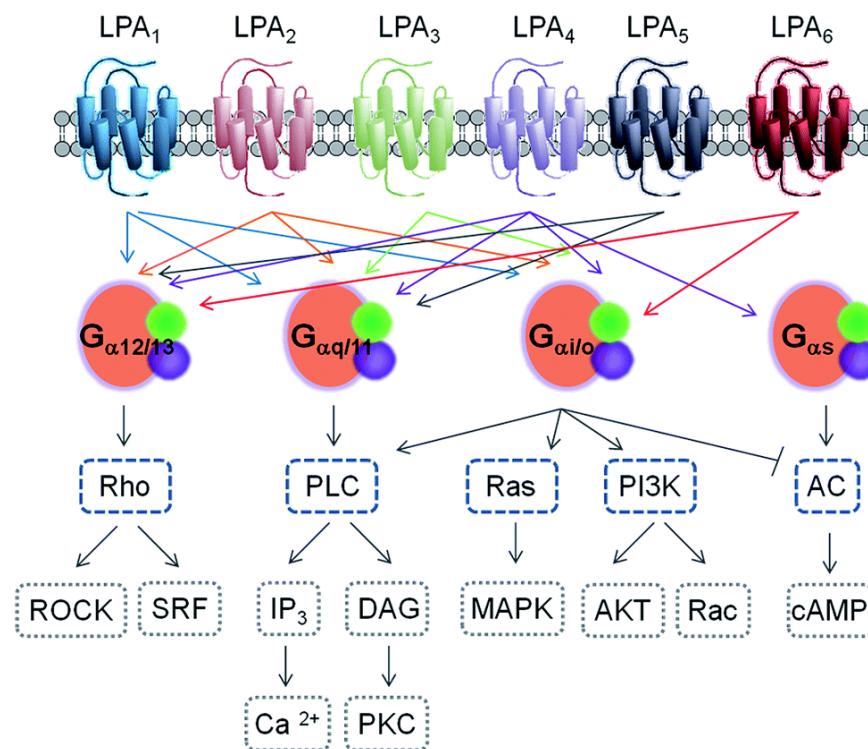


Figura 3. Vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de LPA. Los receptores de LPA₁₋₆ se acoplan, en la cara interna de la superficie de la membrana celular, a proteínas G, heterotrímeros que constan de una unidad G_α y las correspondientes subunidades G_{βγ} asociadas. Un receptor puede unirse a diferentes tipos de unidad G_α para activar una determinada red de señalización (Tomado de Gonzalez-Gil et ál., 2014).

Los receptores de LPA pueden clasificarse en dos subgrupos en función al grado de homología presente en su estructura química (Choi et ál., 2010). En el primer subgrupo se encuentran los receptores LPA₁, LPA₂ y LPA₃. Dentro de esta familia también se hallan los receptores para la esfingosina-1-fosfato (S1P, del inglés, *sphingosine-1-phosphate*) molécula altamente relacionada estructuralmente con el LPA, compartiendo un 50 % de los aminoácidos que conforman la estructura química con el receptor LPA₁ (Aoki et ál., 2008). En el segundo subgrupo se incluyen los receptores LPA₄, LPA₅, y LPA₆, quienes comparten entre sí aproximadamente un 35% de homología, no así con los receptores LPA₁₋₃ (Aoki et ál., 2008). La Figura 4 muestra la relación filogenética entre los distintos receptores, así como una gráfica de la expresión de los distintos receptores en órganos y tejidos en el ratón y en el hombre.

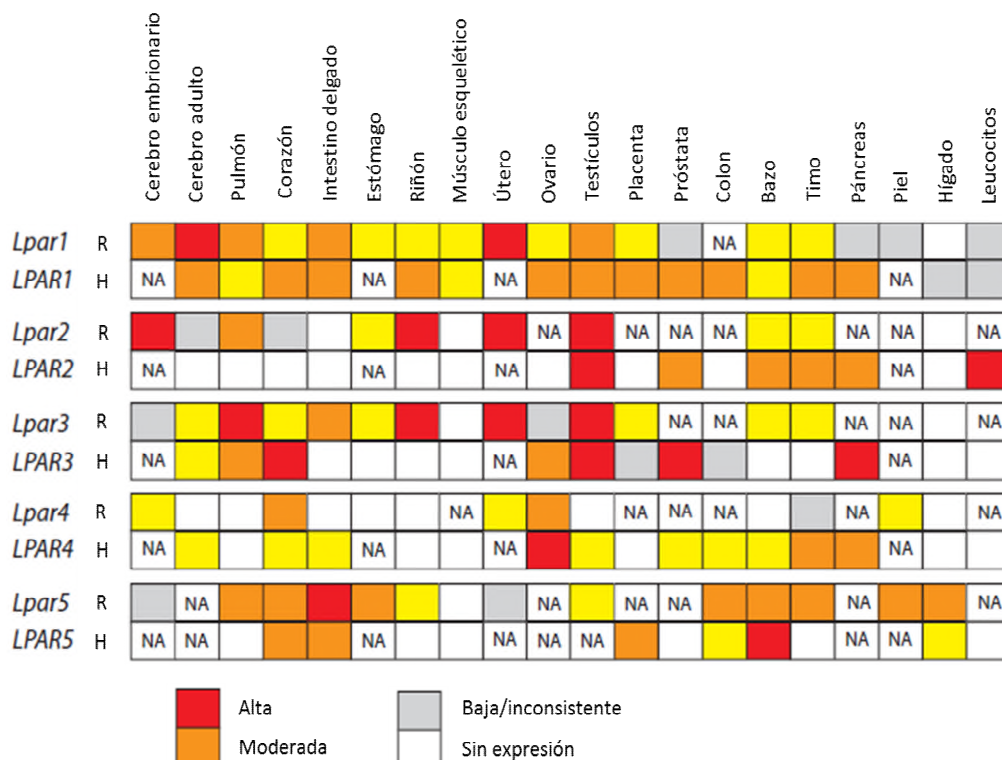
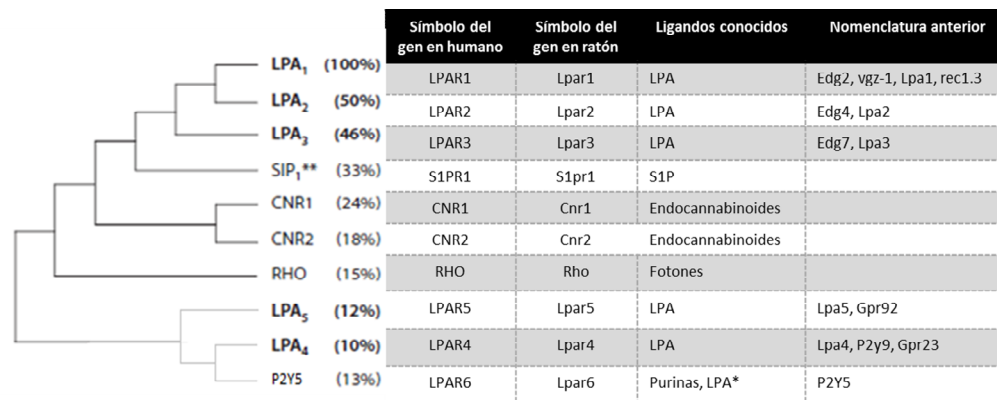


Figura 4. Filogenia y distribución de los receptores LPA. Panel superior: Relación filogenética de los receptores LPA en función de su grado de homología (representado entre paréntesis). Se representa entre paréntesis el porcentaje de homología de aminoácidos que comparten con el receptor LPA₁. Panel inferior: Expresión de los receptores LPA₁₋₅ en ratón (R) y humano (H). (Ambas imágenes cedidas por la Dra. Rosell del Valle y modificada de Choi y Chun, 2013).

Actualmente, ambos, los receptores de LPA y los de S1P, han sido identificados como imprescindibles para el desarrollo del SNC (Choi y Chun, 2013) y están implicados en diferentes neuropatologías como la esclerosis múltiple (Brinkmann et ál., 2010; Chun y Brinkmann, 2011), la hipoxia fetal e hidrocefalia (Harrison et ál., 2003; Brinkmann et ál., 2010; Chun y Brinkmann, 2011; Herr et ál., 2011; Yung et ál., 2011), el dolor neuropático (Inoue et ál., 2004; Nagai et ál., 2010; Lin et ál., 2012), la isquemia cerebral (Li et ál., 2008; Czech et ál., 2009), los traumatismos (Goldshmit et ál., 2010), la pérdida de audición (MacLennan et ál., 2001; Herr et ál., 2011; Kono et ál., 2007), la convulsiones (MacLennan et ál., 2001; Trimbuch et ál., 2009; Akahoshi et ál., 2011) y en la enfermedad de Sandhoff (Wu et ál., 2008).

1.1.3 Tipos de receptores de LPA

Receptor LPA₁

El gen del receptor LPA₁ fue el primer gen de un receptor de LPA que fue clonado (Hecht et ál., 1996). Es una proteína con siete dominios transmembrana, masa molecular de aproximadamente 42 kDa y con 364 aminoácidos (Choi et ál., 2010). Existe una variante del receptor, MREC1.3, que presenta 18 aminoácidos menos en el extremo N-terminal (Contos y Chun, 1998), pero su significado biológico aún no ha sido evaluado. El receptor LPA₁ muestra una alta afinidad para un amplio rango de especies de LPA, tanto ligadas a ácidos grasos saturados como a insaturados (Bandoh et ál., 2000). El receptor LPA₁ se acopla a tres tipos de proteínas G: G_{ai/o}, G_{aq/11}, G_{α12/13}, activando las vías de señalización MAPK, (del inglés, mitogen-activated protein kinases), fosfolipasa C, Akt, Rho, e inhibición de la adenilciclasa (Choi et ál., 2010). Se pueden, a su vez, distinguir dos vías principales de activación del receptor LPA₁, en función de la sensibilidad a la inhibición de la toxina del bacilo *Bordetella pertussis* (PTX, del inglés, *pertussis toxin*). Distinguimos así una vía PTX-sensible y una vía PTX-insensible. (Goetzl y Tigyi, 2004; Anliker y Chun, 2004) El receptor LPA₁ activa específicamente al subtipo PTX-sensible G_{ai/o} y PTX-insensible G_{αq/11/14} y G_{α12/13} (Fukushima, 2004).

La cascada de señalización desemboca en variadas respuestas celulares, siendo las más relevantes, las de proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular, cambios en el citoesqueleto y movilización de calcio intracelular (Fukushima et ál., 2001; Goetzl et ál., 2002; Lynch y Macdonald, 2002; Ye et ál., 2002; Fujiwara et ál., 2003; Ankiler y Chun, 2004; Pilpel y Segal, 2006; Rhee et ál., 2006; Noguchi et ál., 2009; Choi et ál., 2010). Las respuestas biológicas más comunes del LPA afectan la división celular y la activación de elementos de respuesta a sueros (Perkins et ál., 1994). Además, la vía dependiente de Rho actúa sobre el

citoesqueleto celular (Ridley, 1994). El LPA induce la formación de fibras de estrés y reorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto (Sayas et ál., 2002). Estos resultados de la acción de la activación del receptor son precisos para entender el funcionamiento de procesos como el de la esfericidad celular (*cell rounding*) y el de migración nuclear intercinética. Desarrollaremos este punto en los siguientes apartados. El receptor LPA₁ muestra una alta afinidad para un amplio rango de especies de LPA, tanto ligadas a ácidos grasos saturados como a insaturados (Bandoh et ál., 2000).

La expresión del receptor LPA₁, tanto en ratones como humanos, está ampliamente distribuida en diferentes tejidos y tipos celulares (Contos et ál., 2000; Ye et ál., 2002; Choi et ál., 2010), aunque inicialmente se observó de manera destacada en la zona ventricular de la corteza embrionaria, región donde fue originalmente descubierto (Hecht et ál., 1996).

Entre las funciones de este receptor en los diferentes sistemas, tiene especial relevancia las que lleva a cabo en el sistema nervioso. Hasta la fecha de realización de los estudios en desarrollo cerebral presentados en esta memoria de tesis se había demostrado que el receptor LPA₁ presentaba una alta expresión en la zona ventricular durante el periodo de neurogénesis (et ál. (Hecht et ál., 1996). Asimismo, también presenta una elevada expresión en el bulbo olfatorio (Contos et ál., 2000; Yan et ál., 2003) y en los oligodendrocitos (Weiner et ál., 1998) y las células de Schwann durante el periodo de mielinización (Li y et ál., 2003). La expresión del receptor disminuye gradualmente conforme la neurogénesis cortical llega a su fin, lo cual ocurrirá justo antes del nacimiento. Por su relevancia en el SNC dedicaremos primero un capítulo a analizar los procesos que tienen lugar durante el desarrollo cortical para, después, detallar los estudios que muestran la vía mediada por el receptor LPA₁ esencial para el SNC.

Receptor LPA₂

Se trata de una proteína de alrededor de 39 kDa de masa molecular y con 348 aminoácidos (Contos y Chun, 2000; Choi et ál., 2010). Si comparamos su grado de expresión frente al receptor LPA₁, vemos que está más restringida en ratones adultos y en humanos. Al igual que el receptor LPA₁, el receptor LPA₂ se expresa en el cerebro embrionario y su expresión disminuye considerablemente en el adulto. El receptor LPA₂ se acopla a las proteínas G_{α12/13}, G_{αi/o} y G_{αq/11} activando las respuestas asociadas a estas vías (Ishii et ál., 2004). La activación del receptor LPA₂ se ha relacionado con procesos de supervivencia, migración celular y cambios morfológicos (Choi et ál., 2010). Además, se ha relacionado, junto al receptor LPA₃, con la invasión y metástasis de células cancerosas de ovario, de endometrio, de mesotelioma y de colon (Shida et ál., 2003; Jeong et ál., 2008; Hope et ál., 2009). En estudios in vivo e in vitro, se

ha mostrado su sobreexpresión en varios tipos celulares cancerígenos (Shida et ál., 2003; Kitayama et ál., 2004; Shida et ál., 2004, Lee y Yun, 2010). Los ratones nulos para LPA₂ no muestran ninguna alteración de su fenotipo anatómico o cerebral (Contos et ál., 2000a). A diferencia del LPA₁, el receptor LPA₂ no parece ser limitante para el desarrollo normal.

Receptor LPA₃

Es un receptor acoplado a proteína G, de aproximadamente 40 kDa, que comparte un 50 % de aminoácidos con los receptores LPA₁ y LPA₂ (Bandoh et ál., 1999; Im et ál., 2000; Choi et ál., 2010). Se expresa principalmente, en pulmón, riñones, testículos, sistema reproductor femenino, y en menor medida, cerebro (Choi et ál., 2010). En el útero, su expresión se relaciona con la fase de implantación del óvulo y está regulada por estrógenos y progesterona (Choi et ál. 2010). El receptor LPA₃ se acopla a las proteínas G_{αi/o} y G_{αqi/11} para mediar activación de la vía de la fosfolipasa C, movilización de calcio, activación o inhibición de la adenilciclasa y activación de MAPK (Ishii et ál., 2000). Los ratones nulos para el receptor LPA₃ son viables, pero las hembras presentan alteraciones en la reproducción, ya que se ve alterada la implantación y localización del embrión, así como al tamaño de la camada (Ye et ál., 2005). A pesar de que se ha encontrado expresión del receptor LPA₃ en estructuras cerebrales como el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala, los animales nulos para el receptor LPA₃ no muestran ninguna alteración observable en el sistema nervioso (Choi et ál., 2010).

Receptor LPA₄

Presenta una masa de 42 kDa y 370 aminoácidos (Janssens et ál., 1997). Se expresa principalmente en el ovario y, en menor medida, en el cerebro embrionario, el corazón, el timo y el páncreas. Se acopla a proteínas G_{α12/13}, G_{αi/o}, G_{αqi/11} y G_{αs} (Lee et ál., 2007), derivando en respuestas tales como esfericidad celular, formación de fibras de estrés o movilización de calcio intracelular (Choi et ál., 2010). Los ratones nulos para LPA₄ no presentan alteraciones evidentes (Lee et ál., 2008) aunque hay una disminución de la supervivencia prenatal causada por hemorragias relacionadas con anomalías de desarrollo vascular, así como afectación del sistema linfático (Sumida et ál., 2010). El receptor LPA₄ se ha demostrado relacionado con la osteogénesis, donde parece actuar contrarrestando la acción de LPA₁ (Liu et ál., 2009, 2010).

Receptor LPA₅

El receptor LPA₅ es estructuralmente diferente a los receptores LPA₁₋₃, compartiendo un 35 % de homología con el receptor LPA₄. Se identificó por primera vez en el año 2006, a partir de un receptor huérfano de 41 kDa y 372 aminoácidos que demostró tener afinidad por el LPA (Kotarsky et ál., 2006; Joo et ál., 2007). Se ha visto expresión del receptor en el cerebro

embrionario de ratones, implicando un papel durante el neurodesarrollo (Ohuchi et ál., 2008). A través de su unión a las proteínas G_{α12/13} y G_{αq} (Lee et ál., 2006), induce la retracción de neuritas, formación de fibras de estrés e incremento del calcio intracelular. Igualmente, promueve el incremento de los niveles de calcio intracelular y la acumulación de AMPc (Lee et ál., 2006). Los ratones nulos para el receptor LPA₅ muestran una reducción del umbral nociceptivo y exhiben un fenotipo comportamental menos ansioso que los ratones normales, por lo que parece tratarse de un receptor fundamental en la regulación de la nocicepción y la hipersensibilidad al dolor, así como de la conducta emocional (Callaerts-Vegh et ál., 2012).

Receptor LPA₆

El receptor de LPA más recientemente identificado. Su vía media cambios en la morfología celular y en la acumulación de AMPc (Yanagida et ál., 2009). Tiene mayor afinidad por las formas saturadas del LPA y necesita de concentraciones más altas (superiores a 10 μM) para tener un efecto, en comparación con la concentración del orden nanomolar necesaria para activar al resto de los receptores de LPA (Yanagida et ál., 2009). Se ha relacionado con el desarrollo del folículo piloso y su acción parece tener relación con evitar la pérdida del cabello (Pasternack et ál., 2008; Shimomura et ál., 2009; Nahum et ál., 2011)

1.2. Neurogénesis cortical y desarrollo del SNC

1.2.1. Formación del tubo neural

En los vertebrados, la línea media del ectodermo dorsal embrionario es el origen de todo el sistema nervioso central. La notocorda subyacente, de origen mesodérmico, es el principal emisor de las señales inductoras que inician la formación del tubo neural. La región medial y dorsal del ectodermo embrionario, llamada placa neural, se invagina y pliega hasta el punto que acaban fusionándose sus extremos dorsales, formando un tubo cuyas paredes interiores, por un proceso de proliferación y migración, darán lugar a todas las estructuras del sistema nervioso central (SNC) en un proceso denominado neurulación (Fig. 5) (Kandel et ál., 2000; Squire et ál., 2008).

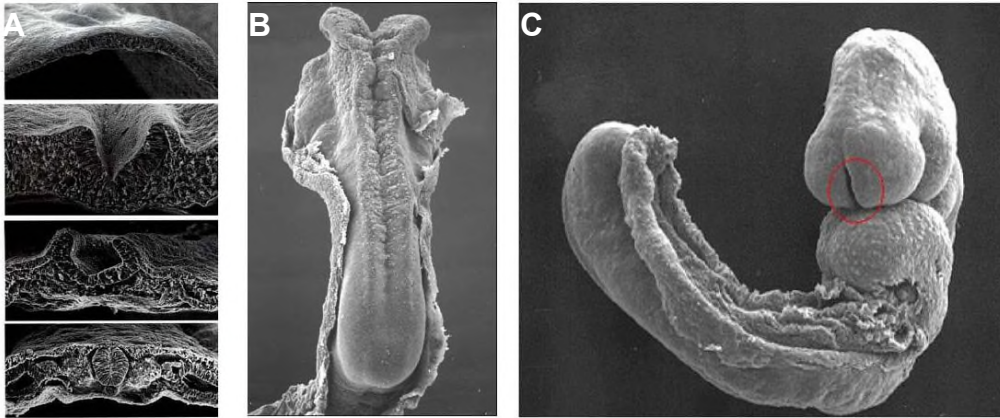


Figura 5. Neurulación en el embrión. Formación del tubo neural en un embrión humano, a partir de la cuarta semana de gestación. **(A)** Esquema del plegamiento del neuroectodermo para dar lugar al tubo neural. **(B)** El cierre del tubo es asimétrico, la parte anterior se cierra antes que la posterior. **(C)** Sobre la imagen, en el círculo rojo se observa el cierre del tubo, formando una abertura denominada neuroporo. (Fuente: <https://locosporlabiologia.wordpress.com/2011/06/10/autoconstruccion-en-35-fotogramas/>)

La primitiva luz del tubo neural es el origen de las cavidades del sistema ventricular del SNC, a la vez que las células neuroepiteliales del tubo serán la fuente de todas las células del SNC. Mediante diferentes tipos de división, migración y diferenciación, se originarán neuronas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y endimocitos). Otros elementos del SNC, tales como son las células microgliales y vasos sanguíneos, tienen un origen mesodérmico externo al tubo neural. La región más anterior del tubo neural se caracteriza por el desarrollo temprano de tres vesículas de paredes gruesas que darán lugar a las distintas regiones del encéfalo adulto. Estas tres regiones son, en sentido rostro-caudal, el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. La zona posterior del tubo neural dará lugar a la médula espinal.

La producción, diferenciación y muerte de las distintas células que constituyen el SNC es consecuencia de un complejo programa dirigido por la expresión de genes específicos en el interior de cada célula. En este programa confluyen factores internos y externos. Existen factores inductores, que pueden difundirse libremente entre las células por los espacios intercelulares, y factores de transcripción que se expresan en el interior celular, normalmente por mediación de activación de receptores de superficie que responden a otros estímulos. Por lo tanto el destino de una célula viene determinado, en parte, por las señales a las que se ve expuesta que, a su vez, son consecuencia de su localización en el embrión y, en parte, por el perfil de los genes expresados.

La identidad de los factores endógenos inductores ha sido investigada durante decenios. Hoy día, conocemos algunos factores inductores importantes en la determinación de los ejes dorso-ventral y antero-posterior. La señalización ejercida por *Sonic hedgehog* (SHH) y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, del inglés, bone morphogenetic protein) estructuran el tubo neural a lo largo de su eje dorsoventral (Ulloa y Briscoe, 2007). La notocorda y la placa basal del tubo neural son dos estructuras que secretan SHH. El ectodermo epidérmico y la placa tectal del tubo neural secretan BMP. La señalización ejercida por estos factores proviene, en primera instancia, de células no neurales (notocorda y epidermis) que se encuentran cerca de la placa basal y tectal del tubo neural.

Por su parte, el eje rostrocaudal del tubo neural se estructura progresivamente durante los varios estadios del desarrollo. Una vez en el estadio de tres vesículas anteriores, el romboencéfalo se organiza en unidades segmentarias. Los genes responsables de estas segmentaciones, denominadas rombómeros, son los genes *Hox* (Narita y Rijli, 2009; Tümpel et ál., 2009). Estos genes codifican proteínas que tienen un dominio de unión al ADN de sesenta aminoácidos muy conservado, denominado homeodominio. Los genes *Hox* de los vertebrados se expresan en dominios que se superponen a lo largo del eje anteroposterior del rombencéfalo y la médula espinal en desarrollo. El mesencéfalo se encuentra más allá del límite rostral de la expresión de los genes *Hox* y, a diferencia del rombencéfalo, no está dividido en segmentos. El patrón celular del mesencéfalo está controlado por la acción de largo alcance de señales procedentes del istmo, que es un centro de organización secundario situado en la unión entre el mesencéfalo y el metencéfalo. Las células del istmo secretan dos moléculas de señalización, Wnt-1 y FGF8, que controlan la diferenciación del mesencéfalo (Canning et ál. 2007).

Las neuronas del prosencéfalo de los mamíferos intervienen en las funciones cognitivas más avanzadas. El prosencéfalo comprende la corteza cerebral, los ganglios basales, el hipotálamo y el tálamo. En contraste con otras regiones del SNC, los fenómenos moleculares responsables del desarrollo del prosencéfalo son menos conocidos. Sin embargo, todo indica que la configuración precoz de esta área está controlada de manera similar a la de los niveles más caudales del tubo neural. El prosencéfalo se divide a lo largo del eje rostrocaudal en dominios organizados de forma transversal. A estos dominios se los conoce como prosómeros. Como sucede en el rombencéfalo, los límites de los prosómeros coinciden con los de expresión de señales inductoras y de factores de transcripción (Puelles y Rubenstein, 2003). En esta área se han identificado procesos migratorios de células progenitoras y señales que modulan el

proceso migratorio. Algunas neuronas de la neocorteza se desarrollan a partir de células que emigran desde la subdivisión estriada del telencéfalo. Estas células progenitoras expresan dos proteínas con homeodominio, DLX-1 y DLX-2. En ausencia de estas proteínas, las células neuroprogenitoras del estriado no migran a la corteza (Eisenstat et ál., 1999). En el prosencéfalo seguimos conservando el principio de que señales inductoras podrán ejercer control sobre la expresión de genes con homeodominio implicados en el desarrollo.

1.2.2. El epitelio germinativo. Zona ventricular y subventricular

Como hemos comentado, en las primeras fases del desarrollo, el tubo neural está formado por una sola capa de células neuroepiteliales con carácter germinativo, a partir del cual se originarán todas las futuras células neuronales y gliales que formarán la totalidad del SNC, con excepción de la microglía y el endotelio vascular (Sidman et ál., 1959; Squire et ál. 2003).

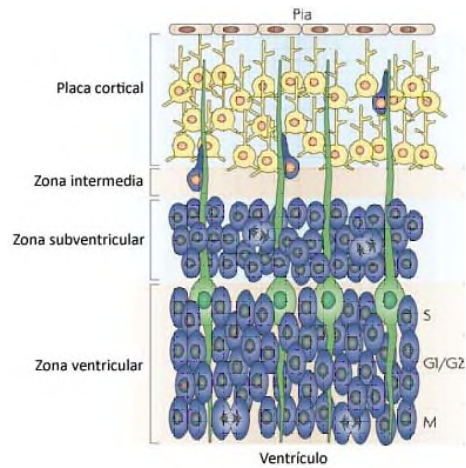
La proliferación de este neuroepitelio desemboca en la formación de una pared multicelular, adyacente a los ventrículos, denominada zona ventricular (ZV), con capacidad de división mitótica y que originará las células del SNC (Noctor et ál., 2004) y, en última instancia, la futura corteza cerebral (Caviness et ál., 1995; Takahashi et ál., 1999; Rakic, 2002). Los progenitores neurales se localizan en la zona ventricular (ZV), en la que se producen la gran mayoría de las divisiones mitóticas y en otra zona adyacente, justo por encima de ella, la zona subventricular (ZSV), generada a partir de la ZV. A pesar de que la zona ventricular posee un mayor protagonismo, en la ZSV también se producen divisiones celulares activas de células neuroprogenitoras (Noctor et ál., 2004), siendo, hoy día, una de las zonas más importantes en la neurogénesis en estadios postnatales y adultos (Luskin, 1993, Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Götz y Huttner, 2005; Merkle y Alvarez-Buylla, 2006).

En el proceso de formación de la corteza encontraremos dos factores igualmente necesarios: una intensa actividad neurogénica y unos masivos procesos de migración.

Durante las primeras fases del desarrollo, se crea una población suficiente de células progenitoras, precursores neuronales, en la ZV, con morfología bipolar que contactan con el líquido cefalorraquídeo embrionario (LCR) apicalmente y con la membrana limitante externa del tubo neural en la zona basal, mediante una, más o menos larga, prolongación (Sidman y Rakic, 1973). La división simétrica que tiene lugar en las etapas tempranas generará a partir de las células neuroepiteliales dos células hijas y cuya población se expandirá lateralmente y radialmente transformándose, en este último caso, en las denominadas (por razones históricas) células de la glia radial (CGR) (Fig. 6). Las largas prolongaciones de estas células se

expandirán por el neuroepitelio y servirán de guía para la migración de las neuronas formadas (Noctor et ál., 2004; Götz y Huttner, 2005; Tan y Shi, 2013).

A



B

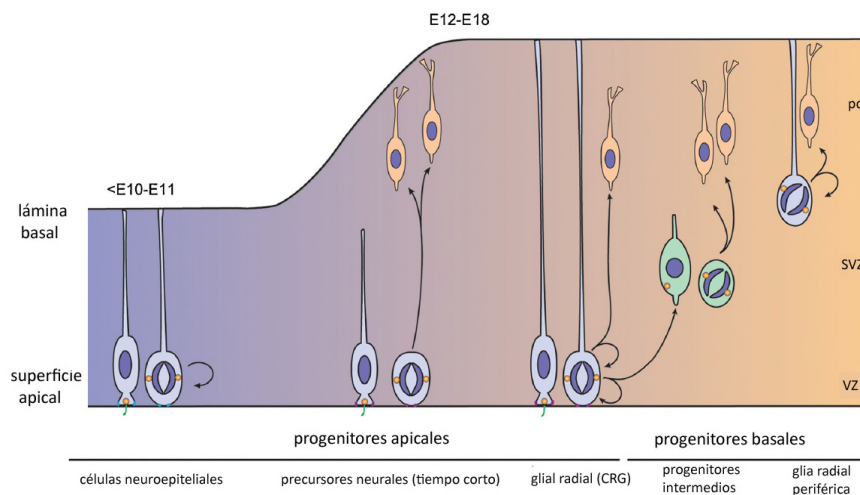


Figura 6. Esquemas de desarrollo cortical. (A) Esquema de un corte transversal de la corteza cerebral en desarrollo. En la zona ventricular (VZ) las células neuroepiteliales (en azul) en diversos estadios del ciclo celular (G1, S, G2 y M) ocupan diferentes niveles. En la zona subventricular (ZSV) continúa la actividad mitótica. Los precusores migran desde la ZV y ZSV hacia la superficie pial por las prolongaciones de la glia radial (en verde) y se diferencian en neuronas que ocupan las diferentes capas de la corteza (tomado de Herrup y Yang, 2007). **(B) Esquema mostrando los diferentes tipos de células progenitoras en relación al curso del desarrollo.** Los progenitores se clasifican de acuerdo a la localización de su fase de mitosis. Así, al comienzo de la neurogénesis son apicales e incluyen los precusores neuroepiteliales de origen y los de fase corta, además de las células de la glía radial (CRG). Conforme madura la corticogénesis, la glia radial se dividirá directamente, de forma asimétrica, para dar lugar a más glía radial y neuronas, o indirectamente, generando progenitores basales, intermedios que también darán lugar a neuronas desde posiciones más basales (modificado de Laguesse et ál., 2015).

A pesar de presentar morfología y características de células gliales, las CGR son células troncales neurales (CTN), progenitoras capaces de generar otro tipo de progenitores, neuronas y células gliales. Estas CGR constituyen la mayoría de la población progenitora de la ZV. Frecuentemente son denominadas como progenitores apicales, debido a la localización de su cuerpo celular próximo a la superficie ventricular o apical de la ZV, hacia donde emiten una corta prolongación, mientras extienden radialmente una larga prolongación basal hacia la superficie pial de la corteza (Cameron y Rakic, 1991). La división de las CGR apicales suele ser simétrica en estadios iniciales, para dar lugar a la propia renovación de las CGR pero conforme avanza la neurogénesis será asimétrica para dar lugar a una CGR y una célula hija que, bien migrará radialmente hacia la superficie y diferenciará en una neurona, o bien migrará a la ZSV para dar lugar a un progenitor intermedio, también llamado progenitor basal intermedio. En la ZV también existe otro tipo de célula progenitora, los denominados "precursores neurales breves", con un ciclo celular más corto que las CGR con quienes coexiste, sin capacidad de auto-renovación y que sólo generan pares de neuronas por medio de divisiones simétricas (Gal et ál., 2006).

Según avanza la neurogénesis, también se observan dos subtipos de progenitores basales derivados de glia radial basal, localizados mayormente en la parte más alejada de la ZSV con características de glia radial pero con bien un proceso únicamente basal, hacia la superficie pial cortical o bien con morfología bipolar, cuya función, en ambos, parece estar relacionada con la girificación del cerebro (Noctor et ál., 2004; Götz y Huttner, 2005; Shitamukai et ál., 2011; Pilz et ál., 2013; Tan y Shi, 2013).

1.2.3. Migración nuclear intercinética.

Durante el periodo de proliferación y a lo largo del ciclo celular, las células progenitoras apicales presentan una dinámica morfológica característica que hace que el núcleo se mueva hacia un punto u otro de acuerdo al momento del ciclo celular en el que se encuentre. A este proceso se le conoce como migración nuclear intercinética (Hollyday, 2001; Miyata et ál. 2004; Miyata, 2008).

El núcleo y el pericarion de la célula progenitora migran acercándose o alejándose del ventrículo en sentido radial y por acción de las fibras del citoesqueleto (Messier, 1978). La mitosis sucede siempre cuando el núcleo está más próximo a la línea ventricular. (Fig. 7). Tras el reparto del material hereditario en la mitosis, se produce la citocinesis y la célula se divide

en dos. De las dos células producidas, una seguirá manteniendo las características de célula madre mientras que otra migrará siguiendo la dirección de la prolongación de la célula progenitora. La que queda como célula madre continúa el ciclo celular, y ambos núcleo y pericarión se desplazan alejándose de la capa ventricular. En la fase S del ciclo celular, momento en el que se produce la síntesis de nuevo material genético, es en la que encontramos el núcleo celular más desplazado.

Durante el proceso de neurogénesis, y conforme terminan su ciclo mitótico, las neuronas generadas abandonan la zona ventricular y se mueven hacia la superficie pial a través de procesos de migración neuronal estrictamente coordinados. Una vez que la neurona alcanza su posición en la corteza cerebral se produce su diferenciación terminal mediante remodelación dendrítica y axonal.

Son los procesos proliferativos y migratorios tempranos los que determinan el número y la localización de las neuronas corticales siendo esenciales para la formación de una corteza cerebral laminada y funcional (Takahashi et ál., 1995; Caviness et ál., 1995; Rakic, 1995). En este trabajo de tesis doctoral nos centraremos en estos procesos tempranos, determinantes de la correcta neurogénesis cortical.

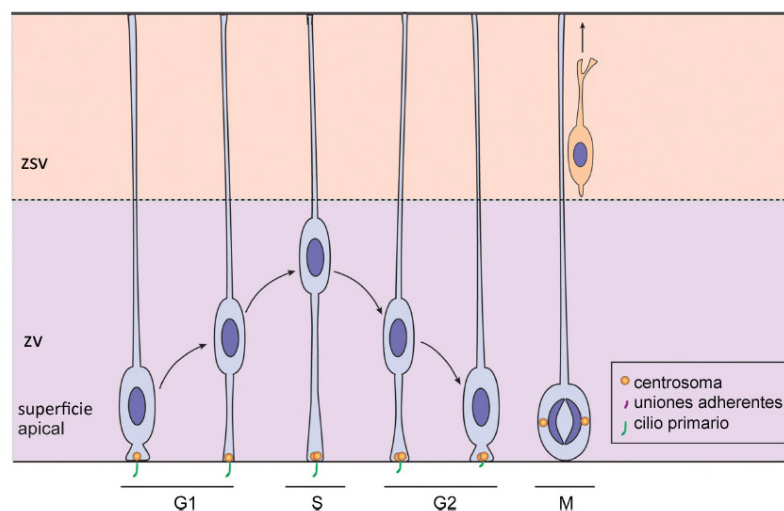


Figura 7. Migración nuclear intercinética en los progenitores apicales. El núcleo de las células se mueve entre las regiones apicales y basales de la ZV durante la progresión del ciclo celular. Durante la fase S el núcleo muestra una localización basal. En G2 migra hacia la zona apical, entrando en fase mitótica (M) cuando alcance la superficie apical. Tras la división celular el núcleo se mueve, de nuevo, hacia la parte basal de la ZV, durante G1, para alcanzar su posición más basal en fase S (modificado de Laguesse et ál., 2015).

1.2.4. Tipos de divisiones: simétricas y asimétricas

El número, la diversidad y la localización de las células en la corteza cerebral se debe, en gran medida, al modo de división de las células progenitoras apicales en la zona proliferativa ventricular durante el desarrollo embrionario (Haydar et ál. 2003). De manera característica y durante la neurogénesis, es la orientación del huso mitótico y, con ello, el plano de división celular, la que controla la producción y el destino de las nuevas neuronas. Así, los planos de división verticales, (perpendicular a la superficie ventricular), producen un modo de división simétrica, generando dos células precursoras hijas idénticas que permanecen en la zona ventricular. Este tipo de división tiene la misión principal de producir un número suficientemente grande de células progenitoras.

Por el contrario, cuando el plano de división es, en sentido amplio, horizontal, (paralelo a la superficie ventricular, si bien, en los mamíferos, éste suele ser algo oblicuo), la división se denomina asimétrica y se generan dos células hijas diferentes. La que ocupe la posición más apical, más próxima al ventrículo, se mantendrá como progenitora mientras que la otra migrará hacia la placa cortical para contribuir a la formación diferenciada de la corteza cerebral o bien dará lugar un progenitor intermedio (Fig. 8). Las divisiones simétricas predominan en las fases tempranas del desarrollo dando lugar a una expansión exponencial de la población celular en la VZ mientras que, conforme la neurogénesis avanza, aumenta el porcentaje de divisiones asimétricas que darán lugar a neuronas y células glía de manera secuencial (Chenn y McConnell, 1995; Hatten, 1999; Haydar et ál. 2003; Noctor et ál., 2004; Gotz y Huttner, 2005; Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; Paridaen y Huttner, 2014).

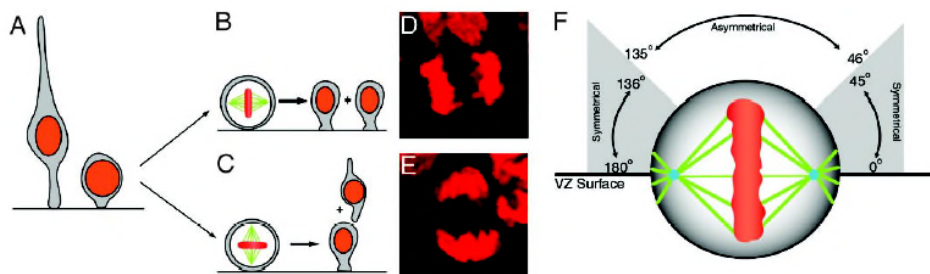


Figura 8. Huso mitótico y división en los progenitores apicales. (A) representación esquemática de los progenitores neurales de la ZV. (B, D) Planos de orientación vertical (B,D) y horizontal (C,E) en la división mitótica en la ZV determinantes de divisiones simétricas y asimétricas, respectivamente. F, Según la orientación y ángulo del plano de división (F) que tome el huso mitótico las células resultantes tendrán uno u otro comportamiento. (Tomado de Haydar et ál., 2003).

El resultado de una división asimétrica presenta un mayor grado de compromiso con el destino celular y la organización de la arquitectura celular. La duración de la fase temprana de división simétrica y el momento en el que se produce la transición a la fase de división asimétrica (y la duración de la misma) son los parámetros críticos del crecimiento cortical durante el desarrollo embrionario. Conocer los factores implicado en el control de las divisiones simétricas y asimétricas es por tanto de primordial importancia para entender el correcto desarrollo de la corteza cerebral. En estadios avanzados de la neurogénesis cortical encontramos de nuevo un comportamiento en las células neuroprogenitoras de la VZ similar al de una división simétrica. Sin embargo, el destino de ambas células hijas es un destino neuronal, (Fig. 9). Este último tipo de división se le conoce como simétrica diferencial (Haydar et ál., 2003). En la ZSV las células progenitoras se denominan progenitores basales o progenitores intermedios; carecen de polaridad y todas las divisiones son simétricas generándose dos neuronas. Por lo tanto se piensa que la pérdida de polaridad restringe la capacidad para producir diferentes tipos celulares y solo se pueden generar neuronas (Noctor et ál. 2007; Attardo et ál. 2008)

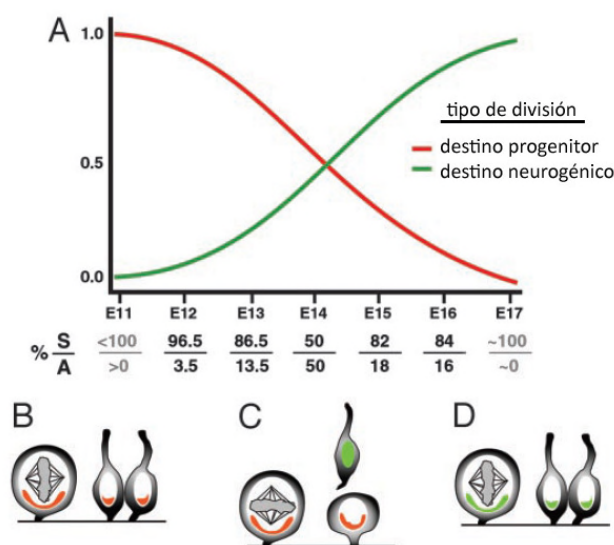


Figura 9. Evolución del tipo de división celular durante la neurogénesis. (A) Porcentaje de divisiones simétricas (rojo)/asimétricas (verde) durante el periodo de neurogénesis cortical embrionaria entre los estadios embrionarios E11-E17.. **(B-D)** Esquemas representativos de cada división y las células hija que genera.. Se observa cómo varía la proporción entre ambas divisiones durante la neurogénesis. Los planos de división verticales **(B)** predominan en la neurogénesis temprana. Alrededor del estadio embrionario de E14, hay una proporción similar de divisiones simétricas **(B)** y asimétricas **(C)**. **(D)** Al final del periodo neurogénico, encontramos de nuevo planos verticales, pero esta vez de división simétrica diferencial. (Modificado de Haydar et ál., 2003).

Los diferentes destinos que pueden tomar las células hijas se basan no solamente en el plano de división celular determinado por la orientación del huso mitótico, como hemos comentado, sino también por la diferente localización citoplasmática de factores inductores que resulta en una distribución desigual en las células hijas (Haydar et ál., 2003; Guillemot 2007; Paridaen y Huttner, 2014).

Tal y como sugieren las divisiones simétricas diferenciales, deben existir múltiples vías de señalización además de la mera distribución polarizada de moléculas citoplasmáticas.

De manera adicional, se ha comprobado que las células adyacentes en la ZV están interrelacionadas, y muchas de ellas poseen uniones de tipo *gap* importantes para su comportamiento proliferativo (Sutor y Hagerty, 2005). La naturaleza y localización de las señales que durante el desarrollo controlen la rotación y alineamiento del plano de división, y por lo tanto el modo de división, no están totalmente descritas si bien si se ha demostrado el papel de algunas de ellas (Haydar et ál., 2003; Paridaen y Huttner, 2014). El conjunto de señales que actúan sobre esta toma de decisión de la célula neuroprogenitora es muy complejo, e incluye factores inductores citoplásmicos, señalización extracelular mediante receptores de superficie específicos y señalización intercelular. Los genes reguladores neurales ejercen un control a este nivel asegurando la correcta migración y diferenciación de las células neuronales.

1.2.5. Estructura de la corteza cerebral

La estructura de la corteza cerebral adulta presenta característicamente seis capas que suelen expresarse en números romanos: I, capa molecular; II, capa granular externa; III, capa piramidal externa; IV, capa granular interna; V, capa piramidal interna o ganglionar; VI, capa multiforme o de células polimórficas en continuidad con la capa ependimaria y subependimaria. Entre estas capas celulares se sitúan capas de fibras más o menos gruesas particularmente las de las capas I, IV, V y VI (Fig. 10). Este patrón de seis capas está presente en mamíferos, tanto en el hombre como en el ratón, con independencia del grosor y desarrollo posterior de determinadas áreas según la complejidad y evolución de cada especie.

En el ratón, objeto del presente estudio, la mayoría de las neuronas corticales se generan entre los días embrionarios 12.5 y 17.5 (*post-coitum*), requiriendo un número total estimado de 11 ciclos celulares durante la neurogénesis. Funcionalmente la corteza comprende cuatro tipos de células neurales que incluyen dos clases de neuronas, piramidales glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas, así como dos tipos de células gliales, oligodendrocitos y astrocitos.

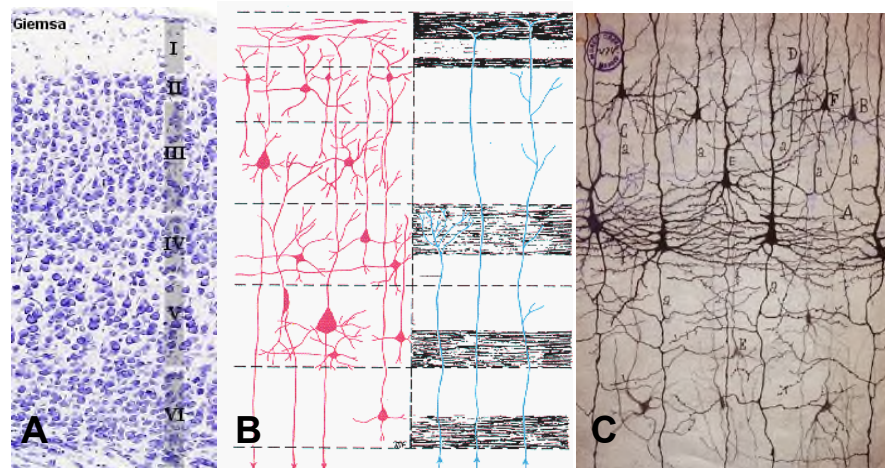


Figura 10. Estructura de la corteza cerebral. (A) Estructura de la corteza cerebral humana en tinción Nissl (Giemsa). Tomado de [www.herrera.unt.edu.ar/.../ pagina3.htm](http://www.herrera.unt.edu.ar/.../pagina3.htm). (B) Esquema de los tipos celulares en cada una de las capas en tinción de plata. También se muestran las principales zonas de fibras. Tomado de www.javeriana.edu.co/.../corteza.htm. (C) Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal de las células corticales según se observan tras tinción con plata. Instituto Cajal, Madrid.

Durante la corticogénesis estos tipos celulares proceden dos conjuntos de progenitores, localizados en el telencéfalo dorsal y en el ventral. Los progenitores del telencéfalo dorsal primero diferencian en neuronas piramidales glutamatérgicas, entre los días E10 a E17, en el ratón. Tan pronto se diferencian salen de la ZV y migran radialmente hacia la superficie pial, formando las seis capas neuronales de la corteza madura en un maneragradoal “de dentro hacia fuera”, es decir, siendo las más internas las antecesoras y las más superficiales las más recientes (Fig. 11). El proceso, regulado por factores de transcripción y diferentes señales y factores de crecimiento, controlará, no sólo la laminación cortical, sino también el tamaño de la corteza cerebral, el del cerebro y el de la cabeza, y comienza desde la migración de los neuroblastos desde la ZV, de manera coordinada con el proceso proliferativo. Las neuronas de las futuras capas VI y V, se generan durante los ciclos 1-8, mientras que las destinadas a las capas IV y III/II lo hacen durante los últimos tres ciclos terminales.

En los últimos estadios de desarrollo tiene lugar el cambio a gliogénesis, generándose primero los astrocitos, mientras que las células precursoras de oligodendrocitos lo harán en el período peri y postnatal. De manera similar, en el telencéfalo ventral los progenitores neurales se diferencian secuencialmente, formando primero las neuronas GABAérgicas y, posteriormente, cediendo lugar a astrocitos y precursores de oligodendrocitos. Un subtipo de neuronas GABAérgicas derivadas de precursores ventrales, junto a precursores de

oligodendrocitos, penetrarán en la corteza por medio de migración tangencial (Marín 2013; Marín y Rubenstein, 2013).

A medida que una rápida división celular ensancha la capa proliferativa en la zona ventricular, la primitiva estructura cortical va avanzando desde ser un simple neuroepitelio monocapa hasta formar una estructura mucho más compleja (Kandel et ál., 2000; Squire et ál., 2008). Dentro de este proceso, en primer lugar distinguimos una preplaca, en la que ya no observamos movimientos de los núcleos celulares en la dinámica de la migración nuclear intercinética. Asimismo, se observa otra intermedia en la que solo vemos axones provenientes del tálamo. Por lo tanto, en un primer estadio del desarrollo distinguimos una zona ventricular, en la que se localizan las células que están proliferando, una zona intermedia, en la que sólo encontramos axones, y una preplaca en la que se ubican los precursores neuronales post-mitóticos (Fig. 11) (Kandel et ál., 2000; Squire et ál., 2008).

Más tarde podemos distinguir una primitiva corteza embrionaria que formará la placa cortical que irá agrandándose y albergando las diferentes capas de la corteza. Alrededor de E18 la corteza embrionaria presenta ya varias capas bien diferenciadas (Fig. 12). La placa cortical es la precursora de la mayoría de la corteza. Casi la totalidad de las neuronas de la placa cortical se han generado entre los días 11 y 17 del desarrollo embrionario (Molnár et ál., 2006). Así pues, esta capa en estadios tardíos del desarrollo (Ej. 18 días de gestación) nos puede servir de indicativo para intuir cómo será la futura corteza cerebral adulta.

Como se mencionó anteriormente (Fig. 11) la preplaca, en los primeros estadios del desarrollo embrionario, se subdivide en una zona marginal ,futura capa I de la corteza, y una subplaca (Fig.s 11 y 12), entre ambas, la incorporación de las células a la placa cortical formará las restantes capas desde la II a la VI. (De Carlos y O'leary, 1992). La temprana diferenciación de la subplaca llevó a pensar que las neuronas de esta zona podían jugar un papel importante en el desarrollo cortical. La relación que existe entre la zona marginal y la subplaca constituye el primer circuito funcional identificado en el desarrollo de la corteza en mamíferos (Kostovic y Rakic, 1990). Se ha sugerido que las células de la subplaca actúan en la diferenciación neuronal y la conexión de circuitos en la placa cortical (Friauf et ál., 1990) incluido el cuerpo calloso. Las neuronas de la subplaca parecen participar en las conexiones eferentes y aferentes entre la corteza y estructuras subcorticales, de hecho, las proyecciones eferentes de la corteza proceden exclusivamente de las capas V y VI (De carlos y O'leary, 1992). La función de la subplaca en el desarrollo de los sistemas de proyección cortical es de vital importancia.

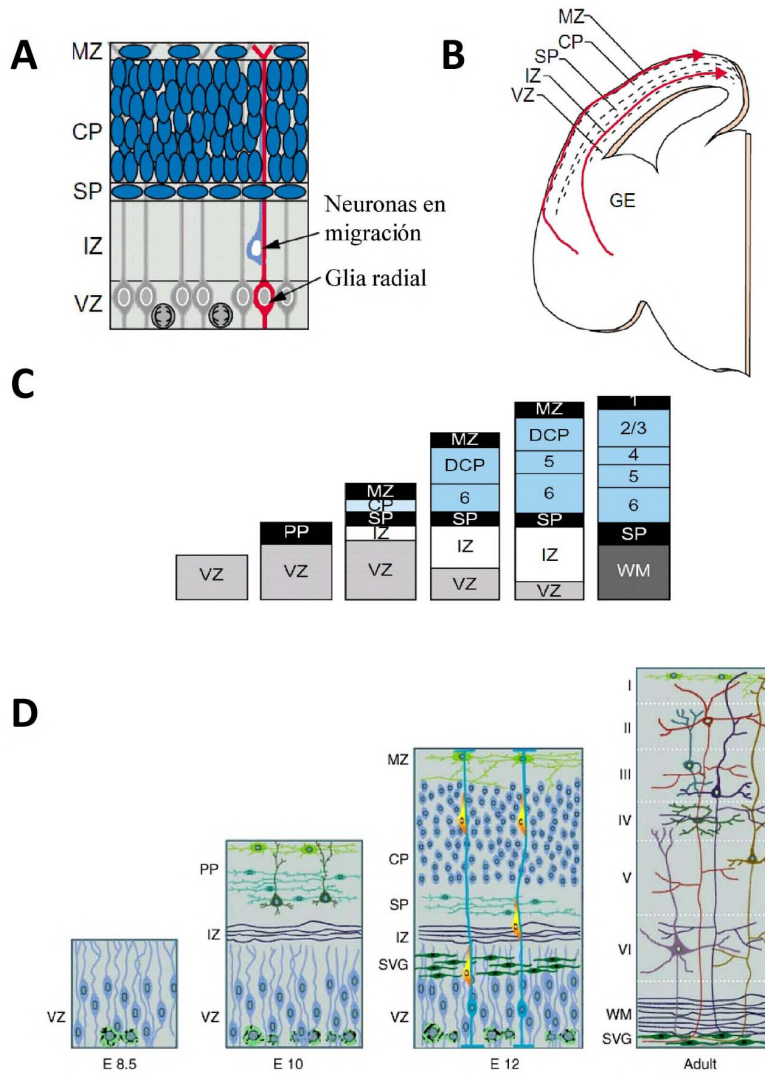


Figura 11. Formación de capas corticales. (A) La mayoría de las neuronas corticales y las de proyección glutaminérgicas se generan en la zona ventricular (VZ) y migran radialmente sobre prolongaciones de la glía radial a través de la zona intermedia (IZ) para agregarse en la placa cortical (CP, del inglés, *cortical plate*). (B) La mayoría de las interneuronas GABAérgicas corticales se generan en las eminencias ganglionares (GE, del inglés, *ganglionic eminence*) y migran tangencialmente a través de la IZ y la zona marginal (MZ, del inglés, *marginal zone*) para distribuirse en el neocórtex. (C) Desarrollo de las capas corticales en roedores. Las primeras neuronas generadas en la VZ se agregan en la zona cercana a la superficie pial y forman la preplaca (PP) que más tarde se divide para formar la zona marginal (MZ) y la subplaca (SP) quedando separadas por las neuronas de la placa cortical (CP) generadas posteriormente. Las neuronas de la CP se van incorporando siguiendo un esquema de dentro hacia afuera, en el que las neuronas nacidas antes forman las placas más profundas mientras que las más recientes migran sobrepasándolas para formar progresivamente las capas más superficiales. WM, sustancia blanca (del inglés, *white matter*). (D) Estadios de desarrollo de la corteza de ratón según los diferentes días del desarrollo embrionario (E8.5, E10, E12) y en adulto. La zona subventricular germinativa (SVG, del inglés *subventricular germinal zone*) es patente desde el estadio E12 (o E13 según los autores). Tomado, con modificación, de O’Leary y Nakagawa, 2002)

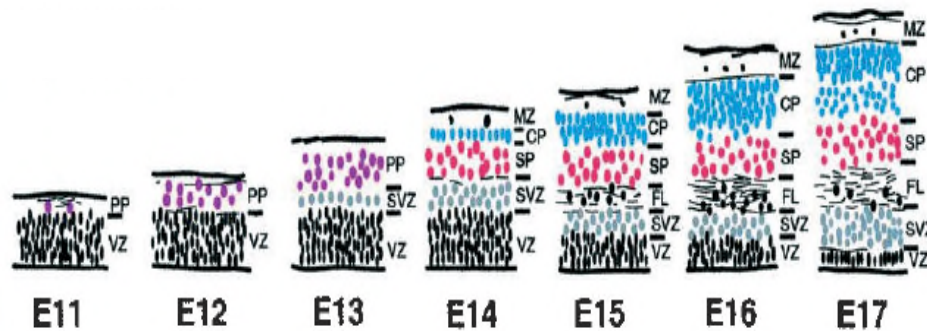


Figura 12. Corticogénesis durante los estadios de desarrollo de ratón. CP, placa cortical; FL, capa fibrosa; MZ, zona marginal; SP, subplaca; SVZ, zona subventricular (proliferativa); VZ, zona ventricular (proliferativa). Tomado de Molnár et ál., 2006.

1.2.6. Factores reguladores de la neurogénesis cortical analizados en este estudio

Durante el desarrollo cortical están presentes una amplia gama de moléculas que controlan los procesos de migración, laminación, y de la formación de las capas corticales. A su vez, los diferentes linajes celulares generan una amplia diversidad celular a lo largo del proceso que se caracteriza por expresar una serie de marcadores celulares que diferencia cada tipo específico celular del conjunto de progenitores neurales. No es propósito de esta tesis, por motivos de extensión, profundizar en este apartado en la acción de cada uno de ellos pero sí queremos mencionar específicamente alguno de los que se han estudiado en este trabajo y que han permitido caracterizar mejor la función del receptor LPA₁ en esta etapa del desarrollo.

-Pax6. El factor de transcripción Pax6 pertenece a un grupo relativamente pequeño de factores de transcripción que ejercen un control esencial en el desarrollo cortical y cuya delección o mutación en el embrión causa defectos cerebrales y una amplia variedad de alteraciones del neurodesarrollo. Presenta un alto grado de conservación y se expresa en gradiente en la corteza en desarrollo, siendo esencial para la corticogénesis (revisado en Manuel et al., 2015).

Durante el período neurogénico *Pax6* se expresa en los progenitores apicales de la ZV en gradiente elevado en sentido rostral-lateral y bajo en sentido caudal-medio. Los progenitores apicales que dan lugar a los progenitores basales expresan, de manera transitoria el factor de transcripción proneural Neurogenina 2 (*Ngn2*; Britz et al., 2006). *Pax6* no se expresará en los progenitores basales que, sin embargo, se caracterizarán por expresar otro factor de transcripción, *Tbr2*. De esta manera, en la corticogénesis del ratón (en primates existe un mayor solapamiento y una estructura diferente de cada área), tendrá lugar una secuencia de

expresión que caracteriza la transición de un progenitor apical a un progenitor basal y de éste a una neurona postmitótica, siendo ésta: *Pax6* → *Ngn2* → *Tbr2* → *Tbr1*.

A nivel celular *Pax6* es un factor esencial para la regulación de la proliferación de los progenitores corticales. Como hemos mencionado, la regulación de la proporción de división simétrica/asimétrica es esencial en la neurogénesis. La longitud del ciclo celular de los progenitores apicales de ratón se incrementa desde 8h (en estadio embrionario E10) a 18h en el final de la neurogénesis (E18) debido al aumento de duración de la fase G1 (Takahashi et al., 1995; Estivill-Torrús et al., 2002). El alargamiento de la duración de G1 actúa promoviendo el número de progenitores basales, que muestran un ciclo celular más largo (Arai et al., 2011). *Pax6* es crítico para el control espacial y temporal de la duración del ciclo celular en los progenitores corticales. Su pérdida durante la corticogénesis termina por acortar la duración del ciclo celular de los progenitores, forzando su salida de ciclo y maduración temprana, aumentando el número de divisiones asimétricas y el de neuronas postmitóticas (Estivill-Torrús et al., 2002). Su función afecta igualmente a la posición laminar final así como al subtipo de neurona de proyección cortical ya que son dependientes del tiempo empleado por los progenitores para salir del ciclo celular. *Pax6* ejerce una acción represiva sobre la progresión del ciclo celular en los progenitores corticales, estando sus niveles de expresión correlacionados con la duración de ciclo, siendo los de mayor expresión en las áreas donde la duración de ciclo es mayor, y los de menor expresión, en las de ciclo celular más corto (Mi et al., 2013). Además, su acción no sólo se restringe al control de ciclo sino que se ha demostrado como un determinante de destino neuronal en los progenitores corticales (Heins et al., 2002).

- **Tbr2.** De la misma manera que *Pax6* caracteriza a los progenitores apicales, la expresión del factor de transcripción *Tbr2* lo hace en los progenitores intermedios basales, marcando el final de expresión del primero y el comienzo de la del segundo, la transición de génesis de un progenitor a otro. La relación entre ambos es tal que la pérdida de expresión de *Pax6* genera pérdida de expresión de *Ngn2* en la ZV y una bajada de expresión de *Tbr2* en la ZSV; a su vez, una sobreexpresión de *Pax6* termina en aumento de expresión de *Ngn2* y *Tbr2* (Sansom y Livesey, 2009). Los estudios usando animales con delección de *Tbr2* han mostrado una disminución del grosor de las capas corticales, similar tanto en las capas profundas como las más superficiales, y pérdida de progenitores intermedios (Sessa et al., 2008). Por contra, su sobreexpresión aumenta las células positivas al marcador de células en fase de mitosis fosfohistona H3, el grosor de la ZV y ZSV, y la proporción de progenitores intermedios basales (Vasistha et al., 2015)

- **Neurogeninas 1, 2 (Ngn1 y Ngn2).** Al igual que acabamos de citar con Ngn2, Ngn1 es un factor proneural, cuyo gen pertenece a la familia de factores de transcripción caracterizada por el motivo estructural de dos hélices alfa conectadas por un bucle, expresado como "hélice-bucle-hélice" básico (bHLH, del inglés, *basic helix-loop-helix*). Ngn1 participa igualmente durante la especificación de destino neuronal en el progenitor, y activa simultáneamente el programa de determinación neurogénica, a la vez que inhibe la determinación de tipo astrogliogénica por medio del secuestro e inhibición de coactivadores y reguladores génicos progliales. Durante la neurogénesis, entre E12-E15 en el ratón, los niveles de expresión de *Ngn1* permanecen elevados, mientras que están muy reducidos durante la astrogliogénesis (P0-P4, siendo estos, días postnatales) (Sun et ál., 2001; He et ál., 2005).

- **p27^{kip1}** (también llamada **p27**) La progresión durante el ciclo celular en mamíferos está regulada y dirigida por la activación secuencial de los complejos ciclina-quinasa dependientes de ciclina (Cdk, del inglés, *cyclin dependent kinase*). La actividad de las Cdk está regulada negativamente por la familia de proteínas Cip/kip, proteínas inhibidoras de Cdk, que incluye p21, p27 y p57, las cuales se asocian a complejos de ciclina-Cdk inhibiendo su actividad quinasa en puntos de control de transición de fases del ciclo celular G1/S y G2/M, siendo el punto G1/S donde actúa p27^{kip1} para impedir la progresión de la fase G1 (Sherr y Roberts, 1999). El potencial neurogénico de los precursores apicales viene medido por la proporción de células que salen del ciclo celular frente a las que permanecen proliferando, reentrando en ciclo. Durante la corticogénesis la proporción de salida de ciclo aumenta a expensas de la segunda, en un control orquestado por diferentes mecanismos capaces de controlar y activar el modo de división en un momento dado, entre ellos p27^{kip1}, de manera que las alteraciones de su expresión tendrían efectos inmediatos en la neurogénesis. Así, la sobreexpresión de p27^{kip1} provoca un incremento en la proporción de células de la ZV que salen del ciclo celular y migran a las capas superficiales, alterando la laminación cortical (Tarui et ál., 2005). Además, p27^{kip1} también participa en funciones adicionales a las propias de ciclo celular, interactuando con Ngn2 para inducir la activación de sus genes diana, o bien promoviendo la migración y la morfología de las neuronas postmitóticas a través de la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la formación de complejos e interacciones con Cdk5 y conexina 43 (Kawauchi et ál., 2013).

- **Tis21.** *Tis21* (*Tis21* en ratón; *PC3* en rata; *BTG2* en humano) es un gen antiproliferativo implicado en el control de la progresión del ciclo celular, en la transición de la fase G1 a S y que, durante el periodo de corticogénesis se asocia con la longitud de ciclo celular y las divisiones neurogénicas de los progenitores, no expresándose hasta que comienza la

neurogénesis y haciéndolo, además, en la fase de división asimétrica, marcando selectivamente los progenitores neurogénicos, no los proliferativos, así como tampoco las neuronas postmitóticas (Iacopetti et ál., 1999). Prácticamente todas las neuronas tempranas derivan de progenitores apicales que expresaban *Tis21*, y la mayoría de progenitores basales que expresan *Tis21* terminan por generar una división neurogénica, sin embargo, se ha observado que las células que expresan *Tis21* no suelen generar neuronas directamente, sino que generan progenitores basales que darán lugar a neuronas (Attardo et ál., 2008, 2010).

En el desarrollo del ratón, entre E10.5-E18.5, las divisiones de progenitores apicales son más numerosas que las de los basales, pero éstas son más neurogénicas (10%-20% son neurogénicas en apicales vs. 40%-80% en basales) (Kowalczyk et ál., 2009). A efectos de su uso como marcadores las divisiones de células que expresan *Pax6*, apicales en su mayoría, son más numerosas, pero las de células que expresan *Tbr2*, basales, son más neurogénicas. A su vez, la mayoría de todas las células con división asimétrica (es decir, presumiblemente neurogénicas) quedarían señaladas por la expresión de *Tis21*. De manera llamativa, la mayoría de los progenitores intermedios producen la mayor parte de la interneuronas de proyección en la preplaca así como en las capas profundas y superficiales de la corteza (Kowalczyk et ál., 2009).

1.3. Efectos biológicos del LPA e implicación en el desarrollo del SNC

La participación de la señalización mediada por LPA en el SNC ha sido ampliamente documentada durante la última década. El LPA actúa sobre la mayoría de los tipos celulares del SNC y participa en una amplia variedad de procesos tanto del desarrollo como en el adulto o en condiciones patológicas, incluyendo neurogénesis, dolor neuropático, daño neural, esquizofrenia, epilepsia o déficit cognitivo (revisado en Frisca et ál., 2012; Choi y Chun 2013; Yung et ál., 2015). Como hemos mencionado, la expresión *Lpar1* en la ZV durante el desarrollo sugería un papel relevante en el desarrollo cortical (Hecht et ál., 1996; Figura 13). La caracterización de animales carentes del receptor LPA₁ (LPA₁-nulos) ha permitido demostrar fenotipos neurales asociados específicamente al receptor. Desde un punto de vista de desarrollo cortical, determinados modelos de delección de LPA₁ generan un 50% de muerte perinatal asociada con defectos olfatorios y algunos defectos de sistema nervioso (Contos et ál., 2000; Harrison et ál., 2003). Además, la administración exógena de LPA genera un aumento del grosor cortical en cultivos de corteza de ratón debida, no a efectos proliferativos, sino a la inhibición de muerte celular, aumentando de manera notable la población postmitótica

neuronal (Kingsbury et ál., 2003). En ese sentido, también se ha descrito una acción supresora de apoptosis del LPA en estudios in vitro en células H197, una línea celular embrionaria de progenitores hipocampales Sun et ál., 2013).

El LPA tiene múltiples efectos sobre los progenitores neurales. Los primeros estudios demostraban cambios en la conductancia a calcio mediados por el receptor LPA₁ en respuesta a glutamato y GABA (revisado en Dubin et ál., 2010), cambios que son bien conocidos por ser relevantes para la proliferación, diferenciación y funcionalidad de las células. También, se ha propuesto su participación, a través de cambios citoesqueléticos, en la migración nuclear intercinética, activando el LPA la fase de esfericidad de los progenitores apicales durante este proceso e induciendo desplazamiento mitótico, incrementando el porcentaje de células mitóticas en posición basal (Fukushima et ál., 2000; Kingsbury et ál., 2003; Herr et ál., 2011; Yung et ál., 2011).

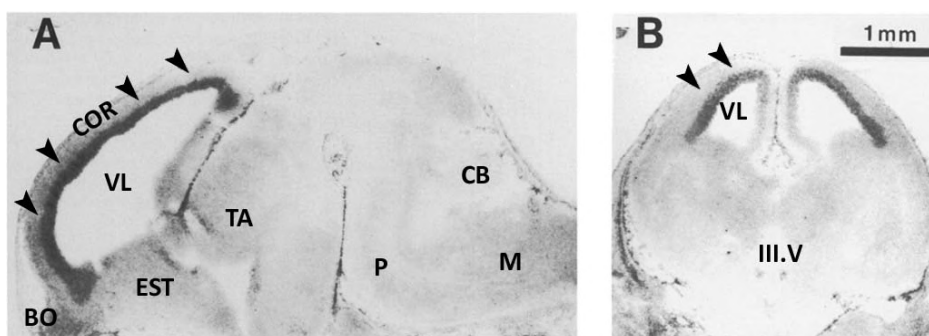


Figura 13. Expresión del gen *Lpar1* en la zona ventricular telencefálica. Imágenes de hibridación in situ con una ribosonda de *Lpar1* sobre corte sagital (A) y coronal (B) del cerebro embrionario de ratón en estadio E14 mostrando la expresión del receptor en la ZV (flechas). VL: ventrículo lateral, BO: Bulbo olfatorio, Est: Estriado, TA: Tálamo, P: Puente, CB: Cerebelo, M: Médula, TV: tálamo ventral (Hecht et ál., 1996).

En relación a su papel en procesos proliferativos también se ha demostrado su papel en neuroesferas de ratón obtenidas en período perinatal, donde el LPA induce la proliferación y diferenciación clonal (Svetlov et ál., 2005). La participación del LPA no sólo se restringe a la división sino que también actuaría sobre la migración celular. Así, en estudios in vitro en la línea celular B103, progenitores corticales y explantes de corteza cerebral, ambos de ratón en E12, se observó que el LPA, a través de la vía dependiente de Rho, y las fibras de retracción de F-actina, inducía en ellos la retracción de conos de crecimiento y lamelipodios (Fukushima et ál., 2002). Los estudios in vitro de administración exógena de LPA sobre neuroblastos permitieron proponer a las neuronas postmitóticas como fuente exógena de LPA que actuaría

sobre los precursores neurales a modo de control por retroalimentación (Fukushima et ál., 2000) (Fig. 14).

Los receptores LPA₁ y LPA₂ son los únicos que median efectos sobre el citoesqueleto, por medio de las vías de activación de la subunidades de proteína G, G_{αi/0} y G_{α12/13} (Fukushima, 2004). La reorganización del citoesqueleto está regulada por las Rho-GTPasas, en concreto RhoA, Cdc42 y Rac (Ridley, 1994; Moolenaar et ál., 2004). Estas enzimas ejercen su acción sobre los microfilamentos y la polimerización de filamentos de actina (Sayas et ál., 2002). Los dominios citoplasmáticos de los conos de crecimiento axonal están compuestos de filamentos de actina (F-actina) y complejos de proteínas ligadoras de actina. La estimulación de la vía de Rho y la consiguiente activación de las proteínas ROCK producen una fosforilación de cadenas ligeras de miosina y activan, al mismo tiempo, a la miosina fosfatasa, la cual retira residuos de fosfato de las cadenas de miosina, teniendo por resultado final el incremento de la reorganización de filamentos de actina y la contracción celular (Fukushima, 2004). El LPA, como citamos a continuación, también favorece la retracción de fibras del citoesqueleto ya que actúa sobre los microtúbulos, polímeros de α/β tubulina, principal componente de la parte central del cono de crecimiento axonal y esenciales para la formación y mantenimiento de las prolongaciones axonales y neuritas, favoreciendo a los microtúbulos dinámicos frente a los estables.

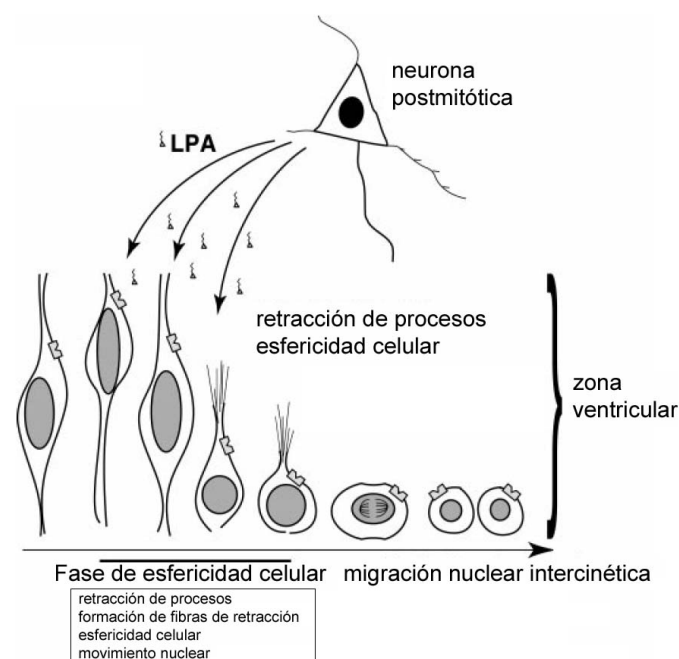


Figura 14. Acción propuesta para el LPA durante la neurogénesis cortical. El LPA extracelular producido por neuronas postmitóticas interactuaría con alta afinidad sobre los receptores de LPA presentes en los neuroblastos de la ZV. Esto, activaría la

señalización conduciendo a la retracción de prolongaciones celulares, la esfericidad celular y la migración nuclear. (Modificado de Fukushima et ál., 2000).

A nivel neuronal la administración de LPA, a través de la vía $G_{\alpha i/0}$ promueve la diferenciación a linaje neuronal (Kingsbury et ál., 2003; Fukushima et ál., 2007), y, vía $G_{\alpha 12/13}$, la reorganización citoesquelética (Fukushima et ál., 2002; Fukushima y Morita, 2006) y la retracción de neuritas, siendo esta mediada, cuando menos, por la vía de señalización de ROCK (Tigyí et ál., 1996) y por los receptores transitorios TRMP2 (del inglés, *transient receptor potential channel, subfamily M, member 2*) y, con ello, actuando, igualmente, sobre el cono de crecimiento axonal, la morfología, y la movilidad de las neuronas postmitóticas (Fukushima et ál., 2004; Moolenaar et ál., 2004; Yamazaki et ál., 2008) (Fig. 15).

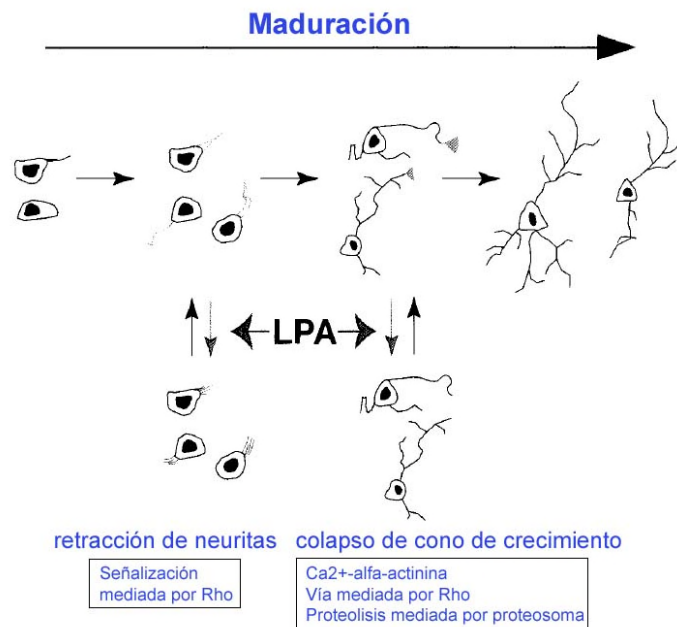


Figura 15. Posibles funciones del LPA en las neuronas postmitóticas. El LPA causa retracción de neuritas y esfericidad celular en neuronas jóvenes, mientras que en neuronas más viejas causa una parada del cono de crecimiento axonal y una modulación de su orientación. (Modificado de Fukushima, 2004).

El papel del LPA en el desarrollo no se circunscribe únicamente a procesos proliferativos o estructurales sino que actúa también sobre la diferenciación funcional de la neurona joven. Así, en cultivo de neuronas hipocámpales induce la ramificación neurítica, proceso éste fundamental para el desarrollo de las redes neuronales (Furuta et ál., 2012) e incluso condiciona la polaridad de la neurona, induciendo cambios en la localización del aparato de Golgi y en la posición del inicio del axón (Yamane et ál., 2010). En este sentido y, dada la

necesidad de trabajar con modelos in vivo, más allá de lo que supone la administración exógena de LPA, los estudios con modelos de ratones nulos para el receptor LPA₁ de la variedad *Málaga* han demostrado, en esta misma línea, la necesidad del receptor LPA₁ para la neurogénesis hipocampal así como para el correcto desarrollo del árbol dendrítico en las nuevas neuronas que se forman a nivel hipocampal, tanto en condiciones normales como patológicas (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2010).

Además de en roedores, las funciones del LPA se han descrito en cultivos de células troncales y progenitores neurales humanos tanto de origen embrionario como de células troncales pluripotentes inducidas, demostrándose que el LPA inhibía, en ambas poblaciones, la formación de neuroesferas, su expansión y diferenciación neuronal, induciendo también la retracción de neuritas, y que dicha actividad antidiferenciadora era mediada a través de las rutas de activación por Rho/ROCK, PI3K y Akt (Frisca et ál., 2013). No obstante, las condiciones de cultivo pueden determinar variaciones de efecto ya que, años antes, Hurst et ál. (2008) demostraban en una línea celular humana neuroepitelial derivada de células troncales embrionarias que el LPA inducía proliferación y esfericidad celular.

En el momento en que los trabajos expuestos en esta memoria se llevaron a cabo se acababa, con ello, de dar un paso adelante al poner de manifiesto, por primera vez, aspectos concretos del papel del receptor LPA₁ en el desarrollo del SNC en modelos in vivo. Sin embargo aún quedaban por analizar numerosos aspectos, entre ellos, la participación del receptor en relación a otras poblaciones celulares como los astrocitos, oligodendrocitos o, incluso, microglia. Los astrocitos expresan mayoritariamente el receptor LPA₁, si bien en cultivo amplían el rango de receptores (LPA₁₋₅), y, durante el desarrollo, el LPA, cuando es administrado, induce en ellos proliferación, generación de especies de oxígeno reactivas, reorganización citoesquelética, y la expresión, entre otros, del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, *nerve growth factor*) y de las interleucinas (IL), IL-1 β , IL-3, y IL-6 (Tabuchi et ál., 2000; Shano et ál., 2000; Spohr et ál., 2008). Especialmente interesante es la inducción de diferenciación neuronal y de crecimiento axonal que ejercen, en cultivo, los astrocitos activados por LPA, por medio de proteínas de matriz extracelular, sobre progenitores corticales (Spohr et ál., 2011).

También han tenido especial desarrollo los estudios de señalización por LPA en las poblaciones de células mielinizantes. Durante el desarrollo del sistema nervioso, el receptor LPA₁ se expresa en precursores neuronales localizándose en la zona subventricular embrionaria donde tiene lugar la neurogénesis cortical (Hecht et ál., 1996; Estivill-Torrús et ál., 2008). Tras el nacimiento, esa expresión disminuye pero continúa en los oligodendrocitos y las

células de Schwann, coincidiendo con la mielinización (Hecht et ál., 1996; Weiner et ál., 1998) por lo que se ha propuesto desde hace tiempo su participación en dicho proceso. Si, de una parte, periféricamente, se ha demostrado que el receptor LPA₁ regula la migración y desarrollo de la célula de Schwann, además de protegerla de muerte celular por medio de las vías de Akt y PI3K (Weiner y Chun et ál., 1999; Contos et ál., 2000; Anliker et ál., 2013), a nivel cortical, junto a la constatada relación entre el periodo de mielinización cortical postnatal y la expresión del receptor LPA₁ en oligodendrocitos (Allar et ál., 1998; Weiner et ál., 1998; Handford et ál., 2001; Cervera et ál., 2002), se ha demostrado que el LPA afecta a las prolongaciones celulares en oligodendrocitos aún no mielinizantes y en las primeras fases de su diferenciación, aunque no en precursores (Dawson et ál., 2003), así como en los últimos estadios de maduración (Matushita et ál., 2005; Nogaroli et ál., 2009). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado, mediante el estudio de ratones nulos para LPA₁ de la variedad *Málaga*, que el receptor LPA₁ interviene en la diferenciación de los oligodendrocitos, así como en la mielinización, actuando sobre la estabilidad celular y el transporte intracelular de la proteína mielínica PLP/DM20 (García-Díaz et ál., 2015).

Como hemos mencionado, además de neuronas, astrocitos o células mielinizantes, también expresan receptores de LPA otras poblaciones neurales. Los receptores LPA₁₋₃ se expresan en microglía, tanto de roedores como humana (Möler et ál., 2001; Tham et ál., 2003), regulando proliferación, cambios morfológicos celulares y de membrana, y quimioquinesis (Schilling et ál., 2004; Fujita et ál., 2008; Muessel et ál., 2013). Igualmente, se ha demostrado expresión de receptores de LPA en los plexos coroideos, tanto en condiciones normales como en patológicas (Ohuchi et ál., 2008; Turner et ál., 2014). Por último, y en relación al desarrollo del SNC es importante destacar la participación de la señalización mediada por LPA en la vasculatura cerebral ya que, durante el período de neurogénesis tiene lugar, igualmente, el de formación de vasos a nivel cerebral así como de la barrera hematoencefálica. Junto a las observaciones de hematomas frontales en el cerebro de determinados animales nulos para los receptores LPA₁ y LPA₂ (Contos et ál., 2000, 2002), y la presencia de defectos vasculares en animales carentes de la enzima ATX (Tanaka et ál., 2006; van Meeteren et ál., 2006) se ha demostrado que el LPA puede inducir la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés, *vascular endothelial growth factor*) por medio de la vía mediada por el factor NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y que, a su vez, el VEGF puede inducir la expresión de LPA₁ y de la enzima ATX en las células endoteliales (Lin et ál., 2008; Ptaszynska et ál., 2010; Dutta et ál., 2011).

El siguiente esquema (Fig. 16) muestra la participación de la señalización por LPA en la corteza cerebral en etapa embrionaria y adulta, reflejando los tipos celulares donde actúa, tal como hemos mencionado.

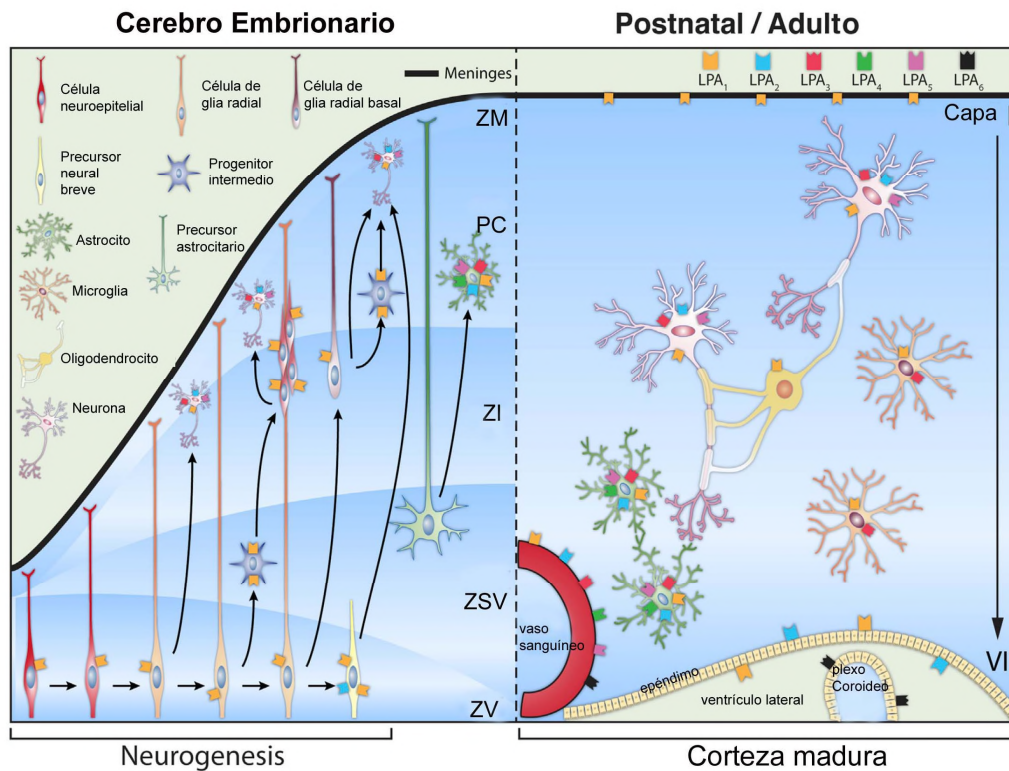


Figura 16. Expresión temporal y celular de los diferentes receptores de LPA. Panel izquierdo: en el cerebro en desarrollo es el receptor LPA₁ el que se expresan mayoritariamente y en las células progenitoras, entre otros tipos celulares, mediando en la migración nuclear intercinética, la retracción de neuritas, supervivencia, morfología, y migración. La expresión varía entre áreas y tipos celulares según avanza la neurogénesis y progenitores intermedios, neuronas y astrocitos van ocupando la ZV, ZSV, zona intermedia (ZI) y placa cortical (PC), según corresponda. La expresión de otros receptores de LPA se suma entonces a neuronas y astrocitos. Panel derecho: todos los principales tipos celulares en la corteza cerebral madura expresan receptores de LPA, llegando también esta expresión a observarse en epéndimo, barrera hematoencefálica, y meninges. La participación postnatal de los receptores de LPA afectará a la mielinización, las respuestas astrocitaria y microglial, la estabilización vascular e incluso procesos de tipo cognitivo. (Modificado de Yung et ál., 2015).

Considerando los tipos celulares en los que se expresan los receptores de LPA y la variedad amplia de respuestas inducidas por LPA en el sistema nervioso es fácil presumir una diversidad de funciones también bajo condiciones patológicas. La siguiente tabla (Tabla 1) expone buena parte de las funciones que se han reconocido reguladas por el LPA en determinadas neuropatologías. Buena parte de los estudios que han permitido la descripción de estas funciones se han realizado sobre modelos animales que, por su importancia en este estudio y en las diferentes aportaciones a las investigaciones en el SNC trataremos a continuación.

Patología	Receptor	Función validada
Dolor neuropático	LPA ₁	Reducción de las respuestas al dolor a través de un mecanismo periférico (Inoue et ál., 2004; Inoue et ál., 2008; Xie et ál., 2008; Choi et ál., 2010; Nagai et ál., 2010)
	LPA ₃	Reducción de los niveles de LPA (Ma et ál., 2009)
	LPA ₅	Reducción de las respuestas al dolor a través de un mecanismo distinto en el SNC (Lin et al 2012)
Ictus Isquémico	LPA ₁	Aumento de los niveles de LPA o S1P en pacientes o modelos animales (Eichholtz et ál., 1993; Kimura et ál., 2008; Li et ál., 2008)
		Regulación al alza de LPA ₁ y LPA ₂ por lesión isquémica retiniana (Savitz et ál., 2006)
		Disminución de muerte de células ganglionares de la retina por la hipoxia (Yang et ál., 2009)
<u>Neurotrauma</u>		
Traumatismo craneoencefálico	LPA ₁₋₃	Aumento de LPA ₂ y parcialmente de LPA ₁ en astrocitos reactivos en pacientes (Frugier et ál., 2011)
		Aumento de LPA ₂ o LPA ₃ en astrocitos reactivos o en neuronas después del daño (Goldshmit et ál., 2010)
Lesión de la médula espinal	LPA ₁₋₃	Aumento de LPA ₁ y LPA ₂ en astrocitos reactivos y LPA ₃ en neuronas tras el daño (Goldshmit et ál., 2010)

<u>Neuropsiquiátricas</u>		
Esquizofrenia	LPA ₁	Inhibición prepulso, alteración de la síntesis de 5-HT y dimorfismos craneofacial en ratones nulos (Harrison et ál., 2003)
		Cambios neuroquímicos y bioquímicos relacionados con la esquizofrenia en los ratones nulos (Roberts et ál., 2005; Cunnigham et ál., 2006; Musazzi et ál., 2011)
		Disminución de la regulación del LPA ₁ en pacientes (Bowden et ál., 2006)
Comportamiento disfuncional	LPA ₁	Alteración de la ansiedad, las alteraciones motoras y la memoria en los ratones nulos (Dash et ál., 2004; Matas-Rico et ál., 2008; Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010)
		Atenuación de la actividad locomotora inducida por la cocaína en ratones nulos (Blanco et ál., 2012)
		Defectos sobre la neurogénesis hipocampal en los ratones nulos en condiciones de estrés crónico (Castilla-Ortega et ál., 2010)
Enfermedad de Alzheimer		Disminución de la producción de LPA o S1P en pacientes (Umemura et ál., 2006, Takasugi et ál., 2011)
		LPA reduce la muerte neuronal causado por la acumulación de β -amiloide (Zheng et ál., 2005)
<u>Trastornos del desarrollo</u>		
Hipoxia fetal	LPA ₁	Atenuación de la desorganización cortical inducida por hipoxia en los ratones nulos (Herr et ál., 2011)
		Desarrollo del modelo de hidrocefalia fetal mediante la inyección de LPA en embrión (Yung et

		ál., 2011)
Hidrocefalia fetal	LPA ₁	Atenuación de la hidrocefalia fetal inducida por LPA en los ratones nulos (Yung et ál., 2011)
Otros		
Convulsión	LPA ₁₋₂	Hiperexcitabilidad neuronal evocado por LPA o S1P (MacLennan et ál., 2001; Sim-Selley et ál., 2009; Trimbuch et ál., 2009; Chi y Nicol, 2010)
	LPA ₂	Atenuación de la deficiencia mediada por PRG-1 en las convulsiones en los ratones nulos (Trimbuch et ál., 2009)
Fibrosis pulmonar	LPA ₁	Los niveles de LPA aumentan en el fluido broncoalveolar después de la lesión pulmonar (Tager et ál., 2008)
Fibrosis renal	LPA ₁	El LPA está involucrado en la obstrucción del túbulo intersticial (Pradere et ál., 2007)
Obesidad	LPA ₁	Un mecanismo dependiente de LPA ejerce un control paracrino sobre el crecimiento de preadipocitos a adipocitos (Ferry e tal., 2003; Boucher et ál., 2005)

Tabla 1. Resumen de las funciones identificadas de los receptores de LPA en enfermedades relacionadas con el SNC y periférico. (Modificada de Choi y Chun, 2013 y Rosell del Valle, 2014).

Los estudios mostrados en esta memoria vienen referidos al papel del receptor LPA₁ en la neurogénesis cortical. La mayoría de los estudios disponibles hasta la fecha han sido realizados añadiendo de manera exógena fármacos reguladores del receptor, agonistas y antagonistas, cuya especificidad no es exclusiva del receptor LPA₁, sino que, en una u otra medida, también actúan sobre el resto de receptores de la misma familia. No es sino hasta el desarrollo, caracterización y estudio de animales nulos carentes del receptor, cuando se tiene un conocimiento más concreto de su función, demostrándose, así, el papel primordial del

receptor LPA₁ en el neurodesarrollo (Estivill-Torrús et ál., 2008), incluyendo el desarrollo cortical que aquí mostraremos.

1.4. El ratón nulo para el receptor LPA₁ y la variedad *Málaga*. Neurogénesis e implicaciones en el ratón adulto.

El primer ratón nulo para receptor LPA₁ fue descrito por Contos et ál. (2000), obtenido mediante la delección del exón 3 de los dominios transmembrana I-IV del gen *Lpar1* que codifica para el sitio de unión al ligando. Los ratones mostraban una elevada mortalidad perinatal, debido probablemente a déficit olfatorios, alteraciones craneoencefálicas, menor tamaño corporal, hematomas frontales e incremento de muerte celular en las células de Schwann del nervio ciático (Contos et ál., 2000; Weiner et ál., 2001). Además, sus neuroblastos, en respuesta a la administración de LPA, no respondían con cambios proliferativos o morfológicos (Contos et ál., 2000), apoyando la participación del receptor LPA₁ en estas respuestas celulares. Años más tarde, se describe otro ratón nulo para el receptor LPA₁ (Harrison et ál., 2003), independiente del primero, pero con el que compartía lo observado. Los estudios de Harrison et ál. (2003) describieron, por primera vez, alteraciones neurofenotípicas, mostrando una reducción de la actividad locomotora y un importante déficit en la inhibición pre-pulso del reflejo de sobresalto. Además, presentaban un déficit de serotonina en corteza frontal, hipocampo, hipotálamo y núcleo accumbens, entre otras áreas y, por el contrario, un incremento en estriado (Harrison et ál., 2003). En estudios posteriores del mismo grupo (Roberts et ál., 2005) se mostró que estos animales presentaban también reducción de liberación de ácido gamma-aminobutírico, GABA (del inglés, *gamma-aminobutyric acid*) y glutamato en el hipocampo, en respuesta a la estimulación. En este sentido, se ha descrito que el LPA aumenta la actividad de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la sinapsis de las neuronas piramidales del hipocampo (Lu et ál., 1999), lo que sugiere una función del LPA en la plasticidad sináptica. Además, la ausencia del receptor LPA₁ causa una reducción de las oscilaciones de la frecuencia alta, o gamma, en las capas superficiales de la corteza entorrinal, a nivel de hipocampo, así como del número de neuronas GABAérgicas (Cunningham et ál., 2006). Un estudio más reciente de Musazzi et ál. (2011) sobre sinaptosomas de hipocampo de ratones nulos para el receptor LPA₁, demostró que existe una desregulación de las subunidades alfa y beta de la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII, del inglés, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) a nivel

sináptico, donde la enzima, que actúa como un regulador clave en la potenciación a largo plazo y la excitabilidad neuronal (Lisman et ál., 2002), modula la transmisión glutamatérgica. En dicho trabajo se demostró que, a nivel postsináptico, los ratones nulos para el receptor LPA₁ mostraban cambios en la interacción de la enzima con los receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA y de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, AMPA (del inglés, *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*). Como consecuencia, los receptores AMPA mostraron una conductancia alterada y una reducción de la respuesta en las vías de señalización intracelular por NMDA (Lisman et ál., 2002). Asimismo, a nivel presináptico la carencia del receptor en estos animales genera una acumulación de los denominados complejos de proteínas SNARE, mediadores de la fusión de las vesículas sinápticas y que tienen relevancia en algunas patologías como en la esquizofrenia (Lisman et ál., 2002). En relación con la modulación glutamatérgica hipocámpal, es preciso señalar que la señalización mediada por LPA implica no solo al receptor LPA₁ sino también al receptor LPA₂, el cual se ha detectado en terminales presinápticos glutamatérgicos (Trimbuch et ál., 2009). Muchos de los mecanismos que regulan la formación de la memoria y la potenciación a largo plazo son activados y regulados por modificaciones en el estado de fosforilación de diferentes proteínas quinasas, como la quinasa activada por estímulos extracelulares, Erk (del inglés, extracelular *signal-regulated kinases*) y CaMKII cuya actividad puede ser también modulada por neurotransmisores como la serotonina (Camarrota et ál., 2008). De esta forma, el LPA por medio de sus receptores, principalmente el LPA₁, confiere un importante papel sobre estos procesos.

En el año 2002 y, durante la expansión de la colonia de la línea original nula para *Lpar1* (Contos et ál., 2000) cedida por el Dr. Jerold Chun del Departamento de Neurociencia Celular y Molecular en el Centro Dorris de Neurociencia, en el Instituto de Investigación Scripps (La Jolla, Estados Unidos), nuestro grupo de investigación obtuvo, de manera espontánea una variante viable y estable que fue denominada *Málaga* (maLPA₁, Estivill-Torrús et ál., 2008). Además de exhibir características morfológicas similares a sus predecesores, el análisis de la corteza cerebral de los ratones maLPA₁-nulos reveló una serie de datos que demostraban el papel del receptor en el desarrollo cortical y que son los que se exponen en esta memoria.

A partir de este momento se caracterizó de manera intensiva este ratón dando, como resultado una extensa variedad de trabajos que ha permitido avanzar en el conocimiento de la función del receptor LPA₁ por tratarse, precisamente, de los primeros estudios, en muchos casos, que mostraban la función in vivo del receptor.

Así, nuestro grupo demostró que el receptor LPA₁ era necesario para la neurogénesis adulta, tanto para la presente en la zona subventricular (Matas Rico, 2009) como para la

hipocampal localizada en el giro dentado, área en la que la carencia del receptor reducía significativamente la neurogénesis, tanto en condiciones basales como tras la estimulación por la combinación de la exposición al enriquecimiento ambiental y al ejercicio físico voluntario, afectándose también la supervivencia y la maduración dendrítica, así como niveles de factores neurotróficos (Matas-Rico et ál., 2008; Figura 17), defectos éstos que quedaban agravados ante reguladores negativos como el estrés (Castilla-Ortega et ál., 2011)..

Recientemente, estudios desarrollados también por nuestro grupo de investigación han mostrado que los ratones maLPA₁-nulos presentan una hiperactividad neuronal a nivel hipocampal y prefrontal en condiciones basales (Castilla-Ortega et ál., 2012). Esta alteración podría estar relacionada con las variaciones en la transmisión glutamatérgica hipocampal (Blanco et ál., 2012) y en modelos similares con ausencia del receptor, que muestran alteración de la densidad y la actividad de varios receptores de glutamato (Musazzi et ál., 2011), acumulación de los complejos de SNARE y aumento de la fosforilación de la proteína CaMKII (Musazzi et ál., 2011). Otra evidencia destacable de los ratones maLPA₁-nulos es la reducción del número de neuronas GABAérgicas que expresan proteínas ligadoras de calcio tanto en el hipocampo (Matas Rico, 2009) cómo en amígdala (Pedraza et ál., 2014). En este sentido, recientemente, y en colaboración con el grupo del Dr. Álvarez Dolado en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), se ha demostrado que, en el hipocampo, el trasplante de precursores GABAérgicos derivados del fenotipo silvestre o normal del ratón (en inglés, *wild-type*) permite compensar el déficit de interneuronas y rescatar los defectos observados en los animales nulos para LPA₁ (en inglés, *null*), demostrando la especificidad de la señalización en el desarrollo de los precursores interneuronales (Rosell del Valle, 2014).

Junto a estos defectos, la caracterización del ratón Málaga maLPA1-nulo nos ha permitido demostrar la participación del receptor en la diferenciación de oligodendrocitos, así como en la mielinización, resultando necesario para el transporte de las proteínas a la membrana celular para la formación de la mielina (García-Díaz et ál., 2007). También ha permitido determinar mejor la localización del receptor en el cerebro, mediante técnicas de autorradiografía funcional realizadas sobre el animal control normal de fenotipo salvaje y el animal nulo, así como la distribución anatómica de diferentes especies de LPA y de algunos de sus fosfolípidos precursores (González de San Román et ál., 2015).

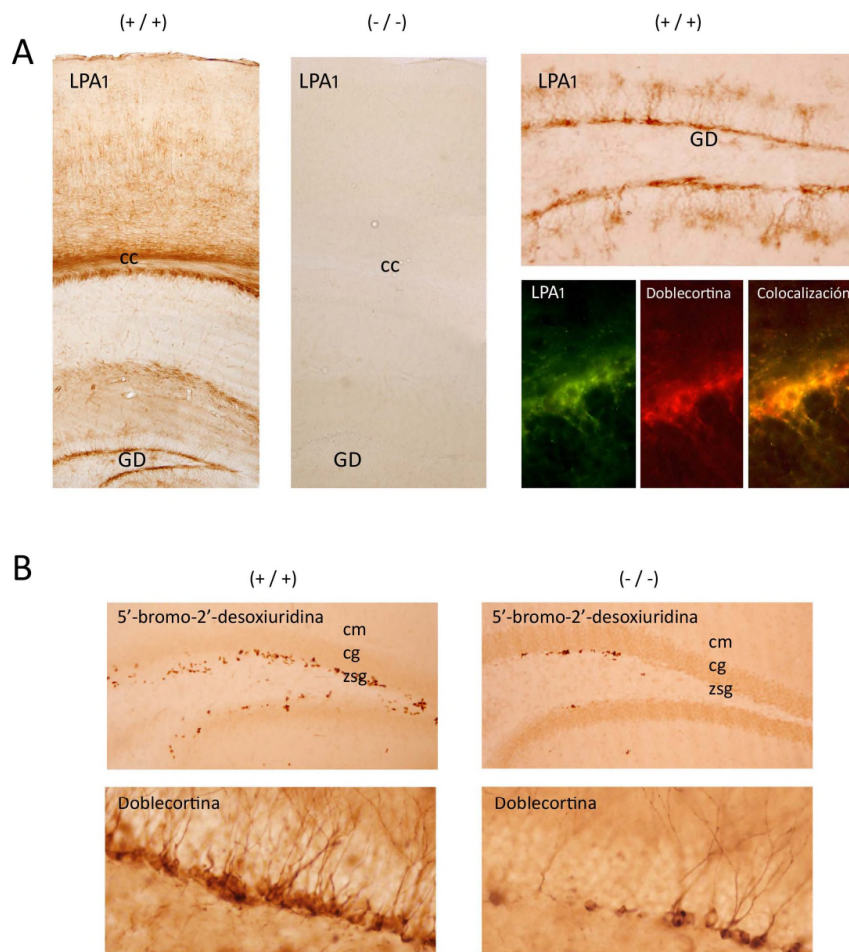


Figura 17. Alteraciones morfológicas y defectos neuronales en ratones adultos nulos para el receptor LPA₁. (A) En el animal adulto de fenotipo silvestre [(+/+)] la expresión del receptor LPA₁ se localiza en las fibras de mielina corticales radicales y del cuerpo calloso (cc) y en la zona del giro dentado (gd) del hipocampo (izquierda), donde se expresa en los precursores neuronales (derecha, arriba) como demuestra la colocalización del receptor con el antígeno doblecortina, específico de progenitores neuronales inmaduros (derecha, abajo). La imagen central corresponde al animal nulo para el receptor [(-/-)], sin reactividad detectable para LPA₁. (B) A nivel hipocampal y en comparación con los animales normales, la ausencia del receptor genera una menor neurogénesis adulta (detectada por estudios con bromodesoxiuridina) y una proliferación incompleta (detectada por la inmunohistoquímica para la doblecortina) en el giro dentado, particularmente tras la estimulación con enriquecimiento ambiental y ejercicio (Matas-Rico et ál., 2008; Castilla-Ortega et ál., 2011). Cc: cuerpo calloso, cm: capa molecular, cg: capa granular, zsg: zona subgranular, GD: giro dentado.

La señalización por LPA no sólo regula procesos durante el desarrollo y la etapa adulta sino que, como se ha demostrado por la administración de fármacos agonistas y antagonistas de los receptores, interviene en procesos más complejos (revisado en Kihara et ál., 2015; Llona-

Minguez et ál., 2015). De manera similar, el uso del ratón nulo para el receptor LPA₁ ha permitido demostrar en el SNC y en relación con la neurogénesis, la implicación específica del mismo en diversas funciones complejas, a nivel neurológico y psiquiátrico. Además de caracterizar la neurogénesis cortical durante el desarrollo, y la que tiene lugar en el adulto, a nivel hipocampal, y en relación a la plasticidad estructural, morfológica y neuroquímica nuestro grupo de investigación también realizó un exhaustivo análisis neurológico de estos animales durante los años posteriores a los resultados plasmados en esta tesis y que, en cierto modo, refuerzan los resultados y acentúan su relevancia funcional normal e incluso en condiciones patológicas. En el ratón en etapa adulta la ausencia del receptor viene acompañada de déficits moderados de tipo olfativo, somestésicos y motores, sin presentar alteraciones funcionales en la retina ni en los potenciales evocados auditivos (Santín et ál., 2009). Estos déficits sensoriomotores podrían deberse, al menos en parte, a las alteraciones en el neurodesarrollo que afectan a la mielinización (Contos et ál., 2000; García-Díaz et ál., 2007) y a la organización de regiones cerebrales tales como el bulbo olfatorio (Contos et ál., 2000) y la corteza motora (Estivill-Torrús et ál., 2008).

En los últimos años, nuestro grupo ha examinado en los ratones maLPA₁-nulos el comportamiento exploratorio, las conductas emocionales, la memoria relacional y aversiva, entre otras (Santín et ál., 2009; Castilla-Ortega et ál., 2010; Blanco et ál., 2012; Castilla-Ortega et ál., 2012; Pedraza et ál., 2014; Castilla-Ortega et ál., 2014), demostrando la relevancia de este ratón como modelo para el estudio de trastornos psicopatológicos, además de hacer evidente el papel que desempeña la señalización mediada por el receptor LPA₁ en la conducta normal (revisado en Estivill-Torrús et ál., 2013). En consonancia con el trabajo inicial de Harrison et ál. (2003), en ausencia del receptor LPA₁, y por comparación con el fenotipo silvestre, los ratones maLPA₁-nulos manifiestan un claro déficit exploratorio cuando son expuestos a contextos espaciales novedosos en la prueba de campo abierto, así como un aumento del comportamiento de tipo ansioso en la prueba del laberinto en cruz elevado (Santín et ál., 2009). Los estudios experimentales realizados por nuestro grupo de investigación han mostrado claramente la importancia del receptor LPA₁ en el aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo, tales como el aprendizaje y la memoria espacial a través de la prueba del laberinto acuático de Morris, demostrando un claro déficit en la memoria espacial a largo plazo de los ratones maLPA₁-nulos junto a un uso anómalo de las estrategias de búsqueda (Santín et ál., 2009). Estos resultados demuestran la importancia de este receptor en la memoria espacial y permiten inferir que, en experimentos de administración intrahipocampal de LPA, la mejora del aprendizaje espacial inducida por LPA (Dash et ál.,

2004), puede deberse a la estimulación del receptor LPA₁. El uso de diferentes estrategias de estudio de conducta, como el laberinto de hoyos, permitió demostrar que los animales carentes del receptor del LPA₁, presentan un grave déficit en la memoria de referencia espacial, déficit que fue mayor conforme aumentaba la dificultad de la tarea descrita, y que mostraban dificultad en aprender las reglas de la tarea de la memoria de trabajo, un componente asociado, de nuevo, con la memoria a largo plazo de tipo espacial (Castilla-Ortega et ál., 2010). En este mismo estudio, se demostró que tanto la ansiedad como el aprendizaje estaban afectados de manera específica e independiente, por la ausencia del receptor LPA₁ (Castilla-Ortega et ál., 2010). Igualmente hemos descrito defectos en memoria episódica (Castilla-Ortega et ál., 2012) o, más recientemente, hemos vinculado por primera vez el receptor LPA₁ con la capacidad para extinguir asociaciones complejas y dependientes del hipocampo, en modelos de miedo condicionado contextual (Pedraza et ál., 2014), o en el establecimiento de las asociaciones droga-contexto, una forma de memoria contextual dependiente del hipocampo (Blanco et ál., 2012).

Los estudios llevados a cabo hasta la fecha por nuestro grupo y otros equipos de investigación hacen pensar que, al igual que sucede con otros receptores en el sistema nervioso, la actividad de los receptores de LPA₁ funciona a demanda. Así, en el hipocampo, la estimulación neurogénica mediante el ejercicio y el enriquecimiento ambiental es la que acaba por hacer evidente el requerimiento del receptor en los procesos que precisan de una respuesta neurogénica (Matas-Rico et ál., 2008). De manera similar, moduladores negativos de la neurogénesis hipocampal, como el estrés, terminan por generar un cuadro dramático en ausencia de la vía de señalización por LPA₁ (Castilla-Ortega et al, 2011; García-Fernandez et ál., 2012) agravando el patrón neurogénico y conductual que mostraban los animales nulos (Castilla-Ortega et ál., 2010) y demostrando, una vez más, cómo la señalización por LPA₁ es capaz de regular de manera tan exquisita estos sistemas.

En resumen, los estudios conductuales desarrollados hasta la fecha, demuestran la importancia del receptor LPA₁ para el correcto desarrollo de funciones cerebrales, especialmente las asociadas a procesos de neurogénesis. Los estudios mostrados en el trabajo experimental vinculado a esta memoria han representado el primer paso para un número ciertamente amplio de estudios que no han venido sino a acentuar la relevancia de la señalización mediada por LPA y que, a día de hoy, han permitido el desarrollo de modelos experimentales así como, dada su implicación en diferentes patologías de índole neurológico y neuropsiquiátrico (Tabla 1), desarrollar fármacos reguladores y estudios terapéuticos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como hemos mencionado, el ácido lisofosfatídico (LPA) ha demostrado ser una molécula reguladora que interviene, por medio de receptores específicos (LPA₁₋₆), en procesos esenciales como la proliferación, diferenciación, y supervivencia celular. Los estudios realizados hasta la fecha en que se inició este trabajo habían puesto de manifiesto numerosas funciones para el LPA en el sistema nervioso central (SNC) y, a nivel cerebral, en neuroblastos corticales, oligodendrocitos, astrocitos, explantes de corteza cerebral, o cultivos de fibras nerviosas, entre otros y, si bien eran capaces de inferir alguna de las funciones citadas, no podían discriminar específicamente el receptor que intervenía en cada una de ellas. Ante la ausencia de agonistas y antagonistas específicos, la aparición en el paisaje experimental de animales con delección específica del receptor LPA₁ abría una vía de estudio novedosa y que guardaba la ventaja de poder estudiar específicamente la función del receptor. Sin embargo, los defectos perinatales que mostraba dicha cepa de ratón le conferían poca utilidad, además de que ésta no mostraba defectos claros, como se presumía, en el SNC. La expansión de la colonia del ratón nulo receptor LPA₁ en las instalaciones de que disponíamos, tras un período de cruzamiento y cría amplio, terminó aportando una variedad de dicha cepa que, conservando la delección del receptor mostraba tasas de supervivencia altas y se reproducía adecuadamente por lo que, por tanto, permitía estudiarlo en detalle.

Dadas las funciones atribuidas a la señalización por LPA y la expresión específica, y tan destacada, del receptor LPA₁ en la zona ventricular durante el desarrollo cortical, propusimos que, en consecuencia, este animal nulo para el receptor era un modelo de ratón en el que deberían estar afectados todos aquellos procesos de señalización por LPA sugeridos y mediados por el receptor LPA₁ y, por ello, de una manera u otra, los presentes en la zona ventricular, es decir, los procesos de proliferación y diferenciación que tienen lugar en la zona ventricular durante la neurogénesis.

Por todo ello, propusimos los siguientes objetivos:

1) Analizar el efecto que la delección del receptor LPA₁ de ácido lisofosfatídico genera en la neurogénesis cortical que tiene lugar durante el desarrollo en la zona ventricular del ratón nulo para LPA₁ de la variedad Málaga.

2) Determinar los efectos que dicha delección en la variedad Málaga del ratón nulo para LPA₁ produce en la diferenciación y migración de las neuronas durante la corticogénesis.

3) Determinar los efectos corticales que en el ratón adulto de la variedad Málaga nulo para LPA₁ puedan ser consecuencia de una neurogénesis alterada en el desarrollo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Para la realización de este estudio se utilizaron ratones de la cepa maLPA₁, de genotipo normal o silvestre [maLpar1^(+/+)], referidos en el texto como normales], y de genotipo heterocigoto [maLpar1^(+/-)] u homocigoto [maLpar1^(-/-)], denominados genéricamente maLPA₁-nulos o nulos para *Lpar1*, que portan la delección de la región que codifica los dominios funcionales del receptor (Contos et ál., 2000), bien de manera parcial (heterocigotos) o completa (homocigotos) y carecen en la misma proporción, del receptor LPA₁. Se han usado embriones (diferentes estadios), e individuos en edad perinatal (día del parto, referido como P0), jóvenes (7 días postnatal, referido como P7) y adultos, machos, de 12 semanas de edad, de cada genotipo. El ratón nulo fue obtenido por nuestro grupo de investigación (Estivill-Torrús et ál., 2008) y la colonia correspondiente, mantenida en las instalaciones de la plataforma central (ECAI) Centro de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) ubicadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

Todos los procedimientos experimentales contaron con la autorización de cada centro y se realizaron de acuerdo a las leyes europeas sobre experimentación animal (European Communities Council Directives 2010/63/UE, 90/219/CEE, Regulation (EC) No 1946/2003) y a la normativa nacional vigente para animales de experimentación y transgénicos Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (B.O.E. de 8 de febrero de 2013), Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (B.O.E. de 8 Noviembre de 2007), Ley 9/2003, de 25 de abril (B.O.E. de 26 de abril de 2003), Real Decreto 178/2004, de 30 de enero (B.O.E. de 31 de enero de 2004), Decreto 320/2010) (B.O.J.A. de 16 de julio de 2010) en relación al uso de organismos modificados genéticamente

Los primeros ratones LPA₁-nulos fueron generados sobre un fondo genético mixto (129X1/SvJ x C57BL/6J). El gen *Lpar1* del ratón contiene, al menos, cinco exones, conteniendo el exón 3 el 68 % de la región codificante, que incluye los dominios transmembrana I-VI del receptor, incluyendo la región de unión al ligando (Contos et ál., 1998). El gen *Lpar1* se eliminó sobre las células troncales embrionarias de la cepa 129X1/SvJ por delección del exón 3. Los ratones quimera resultantes se cruzaron con la cepa C57BL/6J hasta dar lugar a ratones

homocigotos para la mutación. Brevemente, tras clonación y propagación del fragmento que porta el exón 3 del receptor de ácido lisofosfatídico LPA₁ de la cepa 129X1/SvJ, se realizó la construcción génica, que incorporó el gen de resistencia a neomicina y el gen de la timidina kinasa del virus herpes, flanqueados, junto al exón 3, por secuencias LoxP. Tras incorporarlo a células troncales embrionarias R1 la delección fue efectiva por recombinación homóloga y mediada por una Cre recombinasa (sistema Cre/LoxP). Los fragmentos con el reemplazo del gen deseado, se clonaron e inyectaron en blastocistos que produjeron ratones quiméricos retrocruzados con ratones C57BL/6J (Contos et ál., 2000; Figura 18).

Estos ratones LPA₁-nulos originales fueron cedidos a nuestro equipo, a inicios de la anterior década, por el Dr. Jerold Chun del Departamento de Neurociencia Celular y Molecular en el Centro Dorris de Neurociencia, en el Instituto de Investigación Scripps (La Jolla, Estados Unidos).

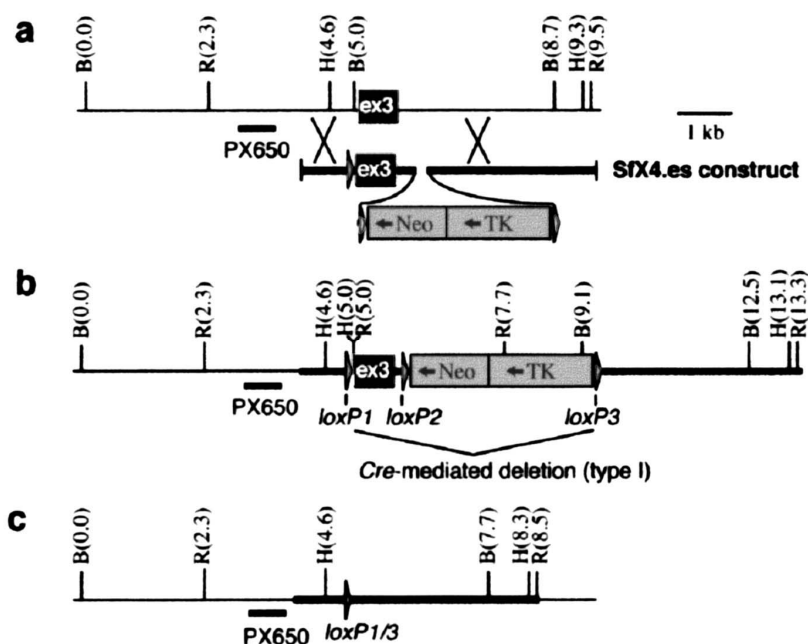


Figura 18. Esquema de la delección del gen *Lpar1* en la cepa original de ratones nulos para LPA₁ (Contos et ál. (2000). Se muestra la supresión del exón 3 en la secuencia codificante del gen *Lpar1* mediante recombinación homóloga. Se representan el gen en su estado salvaje (a), con la construcción genómica incorporada preparado para sufrir la supresión (b), y el producto resultante con la estructura genómica de los animales nulos para LPA₁ (c) (tomado de Contos et ál., 2000).

Tras cruzar los padres fundadores heterocigotos, se expandieron las siguientes generaciones, formando la colonia mediante retrocruzamiento. El ratón LPA₁-nulo variedad Málaga (maLPA₁-nulo) fue obtenido de manera espontánea, en el año 2002, durante el

proceso de expansión de la colonia, sobre el mismo fondo mixto. Actualmente, la variedad *Málaga*, una vez estable, ha sido expandida durante 25 generaciones, en los más de 13 años desde que llegara al Centro de Experimentación Animal en la Universidad de Málaga. Los ratones maLPA₁-nulos portan la misma delección del exón 3, son perfectamente viables y presentan las alteraciones morfológicas de sus predecesores (Estivill-Torrús et ál., 2008). La ausencia del receptor LPA₁ se ha confirmado repetidamente por genotipación e inmunohistoquímica.

Para la obtención de embriones, se introdujeron dos hembras por cada macho, en jaulas individuales. A las 12 horas el macho era retirado. Tras comprobar el estado de gestación mediante tapón vaginal, se consideró este día, respecto al embrión, como correspondiente al día embrionario 0.5 (*postcoitum*), denominado como E0.5 (y así sucesivamente el resto, precedidos de "E"), siendo sacrificadas las hembras en gestación mediante dislocación cervical los días correspondientes a los estadios E11.5, E14.5, E15.5, y E18.5.

De manera inmediata se procedió a la extracción quirúrgica de los embriones (Fig. 19). Tras verificar que el estadio del desarrollo de los embriones correspondía al esperado, se extrajo el cerebro para sumergirlo en solución fijadora para su procesamiento histológico. Dependiendo de la técnica elegida se utilizaron diferentes soluciones fijadoras. Al mismo tiempo, se obtuvo un pequeño trozo de la cola del embrión con el objetivo de efectuar el genotipo del embrión.

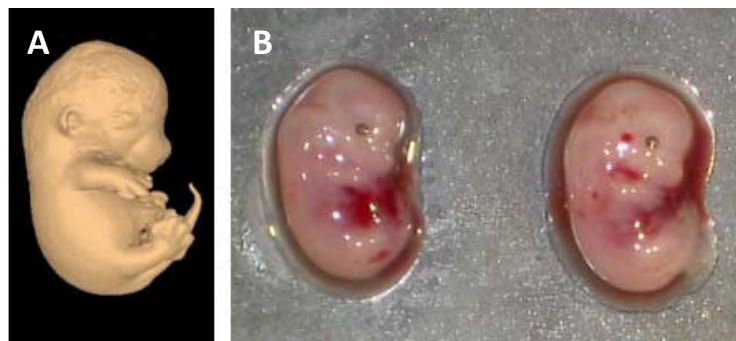


Figura 19. Vista de embriones de ratón tras su extracción. (A) Esquema tridimensional de un embrión de ratón correspondiente al estadio E14.5, en vista lateral. Se aprecian los dedos individuales pero no están completamente separados aún. No presenta aún folículos capilares en la región cefálica (imagentomada de <http://www.emouseatlas.org/emap/ema/home.php>). **(B)** Fotografía de embriones de ratón de estadio E14.5 pocos instantes después de ser extraídos.

3.2. Genotipado

La detección del exón 3 del gen *Lpar1*, así como del fragmento menor correspondiente a la delección del gen, se realizó tras amplificación mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) (Contos et ál., 2000) y se realizó para el seguimiento de la colonia y para el genotipado de cada uno de los animales utilizados. Para la extracción de ADN se seccionó una pequeña porción de la cola del ratón (4-5 mm) que digirió enzimáticamente con proteinasa K (Roche Diagnostics, S.L. Life Science, Barcelona; en adelante, Roche) a una concentración de 20 mg/ml y diluida en tampón STES [Tampón STE comercial (Sigma-Aldrich Química S.A.; Madrid; en adelante, Sigma-Aldrich), constituido por NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, al que se añadió SDS (Sigma-Aldrich) al 0,1 %]. La digestión tuvo lugar durante 12 h a 45 °C y en agitación. A continuación se añadieron 200 µl de una solución de acetato amónico 7,5 M (Sigma-Aldrich) a los tubos que contenían la muestras, y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C. Para precipitar el ADN se añadió el sobrenadante obtenido sobre 900 µl de etanol absoluto frío. Tras agitación suave, se centrifugó cada tubo a 14000 rpm, 10 min a 4 °C y, finalmente, tras lavar con etanol al 70 % (v/v) y centrifugar a 14000 rpm, 5 min a 4 °C, se dejó secar el precipitado invirtiendo el tubo abierto. Pasada 1 h, se rehidrató la muestra de ADN en agua estéril, donde permanecería durante 24 horas a 4 °C. La cuantificación del ADN y la presencia de proteínas en las muestras se realizó por medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y a 280 nm (A_{280}), respectivamente, y mediante el cálculo de la proporción A_{260}/A_{280} , entendiéndose de calidad la preparación de la muestra cuando dicho ratio tuviera valores próximos a 1,8 (Sambrook y Russell, 2001).

Para la amplificación se utilizó una cantidad de 100-200 ng (1 µl) de ADN a la que se añadió una mezcla comercial de ADN polimerasa, BioThermMix™ (Genecraft GMBH, Lüdinghausen, Alemania), conteniendo BioTherm™ ADN polimerasa (0,06 u/µl), tampón de PCR 2,5x con MgCl₂ 3,75 mM, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP, siendo dATP, dTTP, dGTP y dCTP) a 500 µM cada uno, y estabilizadores. La reacción se llevo a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 2400; PerkinElmer España S.L., Madrid) usando los cebadores (Proligo; Sigma-Aldrich) que se detallan:

vzg.il1	5'-GGTATTCTTAATTCTAGAGGATCAGC-3'
vzg.is2	5'-TATAGGAGTCTTGTTGCCTGTCC-3'
513QL	5'-GCCAATCCAGCGAAGAAGTC-3'

La mezcla de PCR, con un volumen final de 25 µl por tubo, estaba constituida, para cada muestra según se expresa:

REACTIVOS PARA CADA MUESTRA	VOLUMEN
H ₂ O estéril	11 µl
BioThermMix tm	10 µl
Cebador 1 vzg.il1	1 µl
Cebador 2 vzg.is2	1 µl
Cebador 3 513QL	1 µl
Muestra de ADN	1 µl

La reacción se llevó a cabo con 35 ciclos formados, cada uno, por una secuencia de 95°C durante 30 s, 56°C durante 30 s, y 72°C durante 2 min, con una incubación final a 72°C durante 5 min, y dejando enfriar, finalmente, a 4°C.

Tras la reacción, las bandas resultantes de la amplificación, correspondientes a los fragmentos específicos de ADN, se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (agarosa D1, baja EEO; Pronadisa; Laboratorios Conda; Madrid). La agarosa se disolvió en tampón de electroforesis TBE 1x pH 8,3 (Tampón Tris/borato/EDTA; Sigma-Aldrich) al que se añadió, posteriormente bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,5 µg/ml. La separación de las muestras se efectuó a un voltaje de 70 v, usando como tampón de carga azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0,25 % diluido en sacarosa (Sigma-Aldrich) al 40 %, e incorporando, junto a las muestras, un patrón de pesos moleculares adecuado al tamaño de las bandas (Roche; producto referido como *DNA molecular weight markers V, 8-587 b*).

La amplificación del ADN resultante de la combinación de los cebadores 2 y 3 da como resultado fragmentos con un tamaño de 348 pares de bases. Este fragmento se corresponde con la situación normal con el gen *Lpar1* intacto, representando la porción correspondiente a la región que lleva el exón 3 en el genotipo normal o silvestre. En la mutación por supresión se elimina el exón 3 del gen y la amplificación resultante es una banda de 227 pares de bases, producto de la combinación de los cebadores 1 y 2. Por otra parte y, por definición, en los individuos heterocigotos, se obtendrán ambas bandas (Contos et ál., 2000) (Fig. 20).

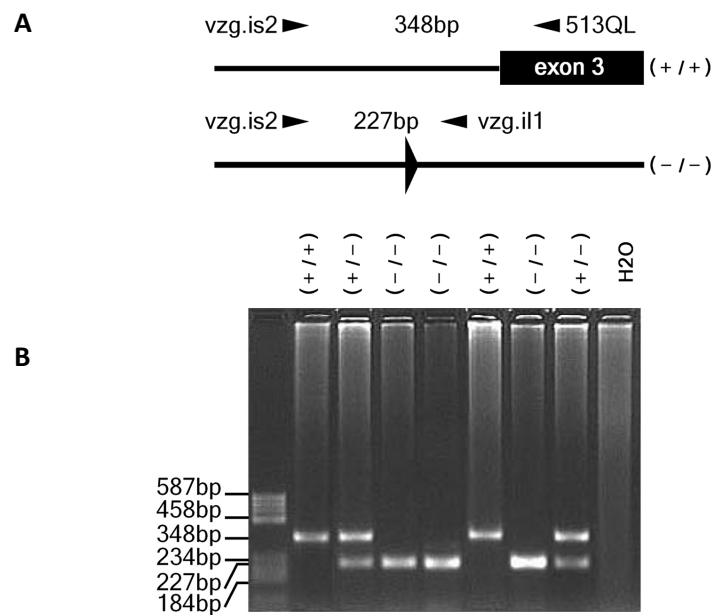


Figura 20. Esquema del ensayo de detección de la delección de *Lpar1* en los animales de experimentación. (A). Esquema de detección mediante PCR para la amplificación de los fragmentos correspondientes a la región que lleva el exón 3 en el genotipo normal (+/+) y a la que presenta la delección (-/-). **(B).** Imagen de las bandas resultantes de la electroforesis en gel de agarosa de ambos fragmentos y en el que observamos las bandas correspondientes al genotipo normal (+/+) y al genotipo heterocigoto (+/-) y homocigoto (-/-) mutante para el receptor.

3.3. Fijación y procesamiento del material para microscopía óptica

3.3.1. Fijación del tejido y procesamiento en parafina para microtomo convencional

El procesamiento en parafina se realizó para todos los estudios histológicos generales e inmunohistoquímicos en muestras de embriones y de ratones de estadio perinatal.

Para estos estudios se realizó fijación por inmersión. Se sacrificaron los animales por decapitación y, una vez extraído el cerebro en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 a 4°C (Anexo I), se fijó por inmersión en mezcla fijadora de Bouin [(Chamberlain 1932; Baker 1946); ácido acético al 5 %, formaldehído al 9 % y ácido pícrico al 0,9 %; Sigma-Aldrich; ver Anexo I] durante 48h a temperatura ambiente. Posteriormente, y tras lavado, se incluyeron en parafina mediante el uso de un procesador automático de tejidos en carrusel (modelo 120P; MYR S.L.;

Tarragona) cuyo protocolo de inclusión contemplaba pasos sucesivos de alcoholes, de gradación creciente [70 % (v/v), 2 x 1 h; 80 % (v/v), 1 h, 96 % (v/v), 2 x 1 h; 100 % (v/v), 2 x 1 h], xileno (2 x 1,5 h), y parafina (2 x 1,5 h). La obtención del bloque previo al tallado se realizó en un centro de inclusión de tejidos (modelo EG1150H; Leica Microsystems; Leica Microsistemas SA; Barcelona). Los bloques de parafina se dejaron enfriar en placa fría y, tras su solidificación, se cortaron con un microtomo Leica RM2255 (Leica Microsistemas SA; Barcelona) a 10 µm de grosor según el plano deseado. Los cortes se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) (ver Anexo I).

3.3.2. Fijación del tejido y procesamiento para microtomo de congelación

Este proceso se empleó para la inmunodetección del receptor LPA₁ en el tejido embrionario. En este caso, tras decapitación y extracción del cerebro, se realizó fijación por inmersión (24 h) en una mezcla fijadora de paraformaldehído-peryodato-lisina (PLP) descrita por McLean y Nakane (1974), consistente en paraformaldehído (Merck Millipore Corporation, Madrid; en adelante Merck) al 4 %, lisina (Panreac Química S.A.U; Barcelona; en adelante, Panreac) 0,075 M, peryodato sódico (Panreac) 0,01 M, en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (ver Anexo I).

Igualmente, se empleó para los estudios de estereología en animales adultos de 12 semanas de edad. En este caso los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con una solución de clorhidrato de ketamina (Imalgene®1000; Merial Laboratorios S.A., Barcelona) al 20 % e hidrocloreuro de xilacina (Rompún®; Bayer S.A., Sant Joan Despí, Barcelona) al 10%, en de suero fisiológico. La anestesia se realiza de acuerdo a su peso, y correspondería a 80mg/Kg peso del animal, de ketamina y 12 mg/Kg de peso del animal, de xilacina. Tras comprobar que los animales estaban totalmente anestesiados (ausencia de respuesta a estimulación dolorosa) se perfundieron transcárdicamente primero, con una solución de lavado, tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (Anexo 1), durante 15 minutos y, después, con paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (Anexo I) con la ayuda de una bomba de perfusión (Masterflex® L/S® Digital economic drive, Cole-Parmer, Chicago, Estados Unidos). Una vez perfundidos y tras decapitación, se extrajo el cerebro. Los cerebros se sometieron a 24 h de fijación en paraformaldehído al 4 % con agitación.

En ambos casos y, previo a su corte, se realizó una criopreservación del tejido en sacarosa (Panreac) al 30 % para evitar que éste se dañara con las bajas temperaturas. La encastración se realizó colocando el cerebro sobre la placa de corte del microtomo y cubriéndolo poco a poco

con sacarosa al 30 %. Posteriormente se realizaron criosecciones de 60 μm (para la detección del receptor LPA₁) o de 30 μm (para la cuantificación estereológica) con un microtomo de congelación Modelo Microm HM450, Microm Laborgerate S.L., Barcelona; parte de Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Las secciones se recogieron de manera seriada en pocillos de placas multipocillo con tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I), para su procesamiento posterior en flotación.

3.3.3. Fijación del tejido y procesamiento de secciones para criostato

Este procedimiento se utilizó para el análisis de la apoptosis en embriones y ratones jóvenes (P7). Tanto en el caso de los embriones, como los ratones jóvenes, se sacrificaron los animales por decapitación y, una vez extraído el cerebro, se fijó por inmersión durante 24 h en una solución de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (Anexo I).

Para evitar que el tejido se dañase con las bajas temperaturas, se llevó a cabo una criopreservación previa del tejido, en este caso con O.C.T. (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek Japan Co., Japón). La inclusión se realizó colocando la pieza de tejido sobre la placa de corte y cubriéndola poco a poco con O.C.T. Se realizaron cortes de 30 μm de grosor, mediante el uso de un equipo Microm HM550P (Microm Laborgerate S.L., Barcelona; parte de Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), que se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) (Anexo I) y guardaron a -80°C hasta su uso.

3.3.4. Fijación del tejido y procesamiento de secciones para vibratomo

Este procedimiento se utilizó para el estudio de hibridación in situ en embriones. Para ello se sacrificaron los animales por decapitación y, una vez extraído el cerebro, se fijó por inmersión durante 24 h en una solución de paraformaldehído (Merck) al 4 % en tampón fosfato salino 0,1 M a pH 7,4 (Anexo I) a 4°C y se guardaron deshidratados a dicha temperatura, para su uso posterior, en una solución de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 % y metanol al 25 %. Se realizaron pasos graduales, con lavados de 10 min en el mismo tampón con metanol al 50 %, y al 75 %, hasta deshidratar y guardar en metanol 100 %.

Para la obtención de la secciones, tras la rehidratación (lavados en el mismo tampón, con concentraciones decrecientes de metanol, al 75 %, 50 %, 25 %, y sin metanol) se encastraron en bloques con una solución de albúmina y gelatina y se obtuvieron secciones de 200 μm de

grosor con el uso de un vibratomo (modelo MA752, Campden Instruments, Loughborough, Reino Unido). Las secciones se deshidrataron, como anteriormente, mediante pasos de 5-10 minutos por soluciones crecientes de metanol en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 % y se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.4. Histoquímica e inmunohistoquímica

3.4.1. Tinción de hematoxilina- eosina

Al menos 8 muestras fueron analizadas por cada genotipo para animales en estadio E18.5 y P0. Para la observación general de los tejidos se realizó tinción de hematoxilina - eosina siguiendo el siguiente protocolo:

- Hidratación de las secciones procedentes de inclusión en parafina mediante pasos de incubación en xileno (Panreac) (2 x 15 min), seguidos de alcoholes en porcentaje decreciente [100 % (v/v), 2 x 15 min; 96 % (v/v), 2 x 15 min; 70 % (v/v), 10 min] y lavado final en agua destilada.

- Tinción con incubación por inmersión de las secciones en solución de Hematoxilina de Harris (Panreac Química S.A.U; Barcelona; en adelante, Panreac) durante 1 min, seguido de incubación en una solución de alcohol 96 % (v/v) + ácido acético (Panreac) 0,1 % (v/v) 5 min, lavado en agua corriente durante 5 min, e inmersión en solución de eosina hidroalcohólica (Panreac) 10 s.

- Deshidratación en pasos sucesivos de alcoholes, de gradación creciente [70 % (v/v), 5 min; 96 % (v/v), 2 x 5 min; 100 % (v/v), 2 x 10 min] y xileno (2 x 10 min).

- Montaje con Eukitt® (Panreac).

Para el contrastado de secciones se omitió el paso por eosina hidroalcohólica.

3.4.2. Inmunohistoquímica

3.4.2.1. Antígenos analizados y anticuerpos usados para su detección

Para analizar el desarrollo de la región proliferativa de la zona ventricular, se estudiaron los siguientes antígenos como marcadores de proliferación celular, ciclo celular, o maduración:

- **PCNA.** Es el antígeno nuclear de células proliferantes (del inglés, *proliferating cell nuclear antigen*), una subunidad de la ADN polimerasa (delta), de 36 kD de peso molecular, esencial para la replicación en la fase S del ciclo celular. La proteína está presente en el nucleoplasma de células que se encuentran activamente en división. Durante la fase G1 comienza a acumularse, y es en la fase S donde es más abundante, disminuyendo su cantidad en las fases G2 y M, y con un patrón diferenciado de distribución de la proteína intranuclear (la que se une al ADN) según la fase del ciclo (Bravo y MacDonald-Bravo, 1987). La proteína PCNA tiene una secuencia conservada, con muchas homologías entre diferentes mamíferos. En este estudio se usó para identificar células en fase S, es decir, como un marcador de células en proliferación, por tratarse de uno de los marcadores más comunes a la hora de identificar células en división y que se expresa en precursores neurales (Ino y Chiba, 2000) y, de manera clara, en la zona ventricular, donde su análisis permitió, hace ya bastante tiempo, estudios de duración de ciclo celular en los precursores neuronales (Takahashi y Caviness, 1993). Para su detección se empleó un anticuerpo monoclonal, obtenido en conejo, con referencia P8825, Clon PC 10 (Sigma-Aldrich) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora de Bouin y en secciones en parafina.

- **Histona H3 fosforilada.** Esta proteína de 17 kD participa en el empaquetamiento del ADN durante la división celular (Hendzel et ál., 1997), siendo usada como marcador de células que se encuentran en mitosis. El ADN se asocia con las histonas y otras proteínas para quedar empaquetado y formar los cromosomas. Los cambios en la cromatina todavía difusa se inician en la fase G2 del ciclo celular, siendo las histonas H1 y H3 las principales responsables del plegamiento y empaquetamiento de las fibras de la cromatina. En contraste con la hiperfosforilación de la Histona H1, la fosforilación específica del residuo 10 de serina en la histona H3 ocurre exclusivamente durante la mitosis, quedando, tras esta, desfosforilada rápidamente, permaneciendo así durante toda la interfase (Wolffe, 1992). Para su detección se empleó un anticuerpo policlonal, obtenido en conejo, con referencia 06-570 (Upstate Inc., Lake Placid, New York) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora de Bouin y en secciones en parafina..

- **β -III tubulina.** La tubulina es el componente principal de los microtúbulos. La tubulina de clase III (β -III tubulina) es una proteína sintetizada exclusivamente por neuronas en vertebrados superiores. Su expresión en las áreas proliferativas asociadas a la neurogénesis, en ratón, tiene lugar en E13-E14, tan pronto como aparece la placa cortical y, desde ese momento, se comienza a expresar en la interfase entre la zona proliferativa y la de diferenciación neuronal, diferenciando poblaciones neuronales postmitóticas, tanto las que

permanecerán indefinidamente en la zona proliferativa, como las que migran para constituir las capas corticales (Menezes y Luskin, 1994). Se usó en este trabajo como marcador de neuronas que ya entran en un proceso de maduración y migración. La detección se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal obtenido en ratón con referencia T8660, Clon SDL.3D10 (Sigma-Aldrich) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora de Bouin y en secciones en parafina.

- **Tbr2.** Como se ha mencionado anteriormente, la expresión del factor de transcripción Tbr2 caracteriza los progenitores intermedios basales y su inicio de expresión a la transición de génesis desde glia radial a progenitores intermedios, estando su expresión en equilibrio de secuencia temporal y correspondencia inversa con la del factor de transcripción Pax6 (Sansom y Livesey, 2009). Para su detección se usó un anticuerpo policlonal, de referencia ab23345, obtenido en conejo (Abcam plc., Cambridge, Reino Unido) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora de Bouin y en secciones en parafina.

- **GAP-43.** La proteína GAP-43 (del inglés, *growth-associated protein-43*) es una fosfoproteína que se encuentra exclusivamente en el sistema nervioso, central y periférico (Skene, JH. 1989) Es una de las principales proteínas de los conos de crecimiento axónico (Meiri et ál., 1986), no estando presente en las regiones de crecimiento de dendritas. GAP-43 se expresa durante el desarrollo, en neuronas postmitóticas y en subpoblaciones mitóticas con plano horizontal de división (Stricker et ál., 1993), y está implicada en el trazado y guía axonal, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Jacobson et ál., 1986). En este estudio se utilizó a objeto de inferir defectos de guía axonal y de tipo neurofuncional derivados de la alteración de la división de los precursores neurales. Para su detección se usó un anticuerpo monoclonal, de referencia G 9264, Clon GAP-7B10, obtenido en ratón (Sigma-Aldrich) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora de Bouin y en secciones en parafina.

- **Parvalbúmina:** proteína ligadora de calcio que marca subpoblaciones de interneuronas gabaérgicas. En la corteza cerebral las neuronas inhibitorias GABAérgicas positivas para la parvalbúmina (que constituyen alrededor del 40%) proceden, en su mayoría, de precursores basales situados en la eminencia ganglionar media y que, por migración tangencial terminan por alcanzar su localización en las capas corticales (Xu et ál., 2004, 2010). La detección se realizó con un anticuerpo policlonal, obtenido en conejo, de referencia PV28 (Swant® Swiss Antibodies; Bellinzona, Suiza) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora de Bouin y en secciones en parafina.

- **5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)** es un análogo sintético del nucleótido timidina. Tras su administración por vía intraperitoneal se incorpora (aproximadamente a lo largo de las 2 h siguientes a su administración), en el ADN nuclear de las células que se encuentran en proliferación, concretamente en la fase S, permaneciendo en su material genético y permitiendo así su seguimiento y destino, detectándose igualmente en las células hijas (Taupin, 2007). El anticuerpo utilizado para detectar este antígeno fue el anticuerpo monoclonal obtenido en ratón referido como G3G4 (Ref.:G3G4 (Anti-BrdU; Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB, University of Iowa; Iowa, Estados Unidos), con procesamiento inmunohistoquímico sobre material fijado con paraformaldehído al 4 % en secciones de parafina.

- **Receptor LPA₁**: La detección se realizó con un anticuerpo policlonal, obtenido en conejo, de referencia PA1-1041 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e inmunohistoquímica sobre material fijado con mezcla fijadora PLP (paraformaldehído-lisina-peryodato) y en criosecciones de microtomo de congelación.

- **Proteína nuclear específica neuronal (NeuN)**: es una proteína neuronal nuclear que se expresa en la mayoría de las células neuronales del sistema nervioso incluidas las constitutivas del cerebelo, corteza cerebral, tálamo e hipocampo (Mullen et ál., 1992) y usada comúnmente como marcador de neuronas maduras. Junto a su expresión nuclear, ampliamente descrita, se ha identificado una isoforma, responsable de reactividad citoplasmática, reguladora de Fox-3 (Kim et ál., 2009). Para detectar este antígeno se ha usado el anticuerpo monoclonal anti-NeuN MAB377 (Ref.: MAB377; Merck Millipore Corporation, Madrid) sobre material fijado con paraformaldehído al 4 % en secciones de microtomo de congelación.

3.4.2.2. Tinción inmunohistoquímica

Para el procedimiento, se partió, bien de secciones de tejido cerebral procedentes de inclusión en parafina (detección de PCNA, histona H3 fosforilada, β -III tubulina, GAP-43, parvalbúmina), o bien de criosecciones en flotación (LPA₁, NeuN). Las secciones de parafina se procesaron en portaobjetos y las criosecciones en pocillos (placas de 24 pocillos), en flotación. Se siguió el siguiente protocolo que, salvo indicación, siempre tuvo lugar a temperatura ambiente y en agitación:

- Hidratación de las secciones (cuando procedieran de inclusión en parafina) mediante pasos de incubación en xileno (Panreac) (2 x 15min), seguidos de alcoholes en

porcentaje decreciente [100 % (v/v), 2 x 15 min; 96 % (v/v), 2 x 15 min; 70 % (v/v), 10 min] y lavado final en agua destilada. Este paso se omitió para secciones en flotación.

- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I) en tres pasos de 10 min.
- Inactivación de la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno (Merck) al 3 % y metanol (Merck) al 10 % (v/v) en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 durante 30 min en oscuridad.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en tres pasos de 10 min.
- Bloqueo de la biotina endógena con solución comercial (Zymed® Laboratories Inc.; California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en tres pasos de 10 min.
- Incubación durante 12-18 h en cámara húmeda con el anticuerpo primario correspondiente, diluido a 1: 1000 en una solución compuesta de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, suero animal al 2,5 % (según corresponda; Biolink2000 S.L., Barcelona), Triton X100 (Panreac) al 0,5 %, y azida sódica (Sigma-Aldrich) al 0,01 % (p/v), como preservante. El suero animal fué obtenido en conejo, cuando el anticuerpo primario era de origen murino, y obtenido en cerdo, cuando se trataba de un policlonal obtenido en conejo.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en tres pasos de 10 min.
- Incubación durante 2,5 h, en cámara húmeda en la solución del anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (anti IgG de ratón, obtenido en conejo, o anti IgG de conejo, obtenido en cerdo, ambos policlonales, biotinilados, con referencias E0464 y E0353, respectivamente; Dako Diagnósticos, S.L.U., Barcelona), diluido a 1: 800 en una solución de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con suero de cabra al 2,5 % (Biolink2000 S.L., Barcelona), Triton X100 (Panreac) al 0,5 %, y azida sódica (Sigma-Aldrich) al 0,01 % (p/v), como preservante.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en tres pasos de 10 min.
- Incubación durante 1 h, en oscuridad, en solución de *Extravidin*® (avidina conjugada a peroxidasa, Sigma-Aldrich) diluida 1: 1000 en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en tres pasos de 10 min.
- Revelado de la actividad peroxidasa durante 15-25 min y en oscuridad con una solución, preparada en el momento, de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina

(DAB, Sigma-Aldrich) al 0,05 %, en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 y perhidrol (Merck) al 0,03 %.

- Lavado exhaustivo en agua destilada.
- Deshidratación de los cortes y aclarado por inmersión en pasos sucesivos de alcoholes, de gradación creciente [70 % (v/v), 5 min; 96 % (v/v), 2 x 5 min; 100 % (v/v), 2 x 10 min] y xileno (2 x 10 min). Montaje con *Eukitt*[®] (Panreac) o DPX (Sigma-Aldrich).
-

La observación se realizó en un microscopio Olympus BX51 equipado con objetivos UPLSAPO 4x, 10x, 20x, 40x, 100x de 0,16, 0,4, 0,75, 0,90, y 1,40 de apertura numérica, respectivamente, y cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A.; Barcelona). Cuando fue preciso, el número de células se estimó con el programa Image J versión 1.37v (Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos; disponible en <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

La detección por inmunohistoquímica se llevó a cabo en 12 animales de cada genotipo y edad. Para la cuantificación de células positivas para la histona H3 fosforilada se analizaron, al menos, 200 células por sección en un área de 150 μm x 150 μm en la zona ventricular y subventricular y en un total de 4 secciones por embrión y 8 embriones por genotipo. Se expresaron los porcentajes respecto al total de células, contrastadas con hematoxilina.

La cuantificación de células positivas para bromodesoxiuridina y para NeuN, se detallan en cada sección correspondiente.

3.4.2.3. Inmunodetección y cuantificación de la bromodesoxiuridina

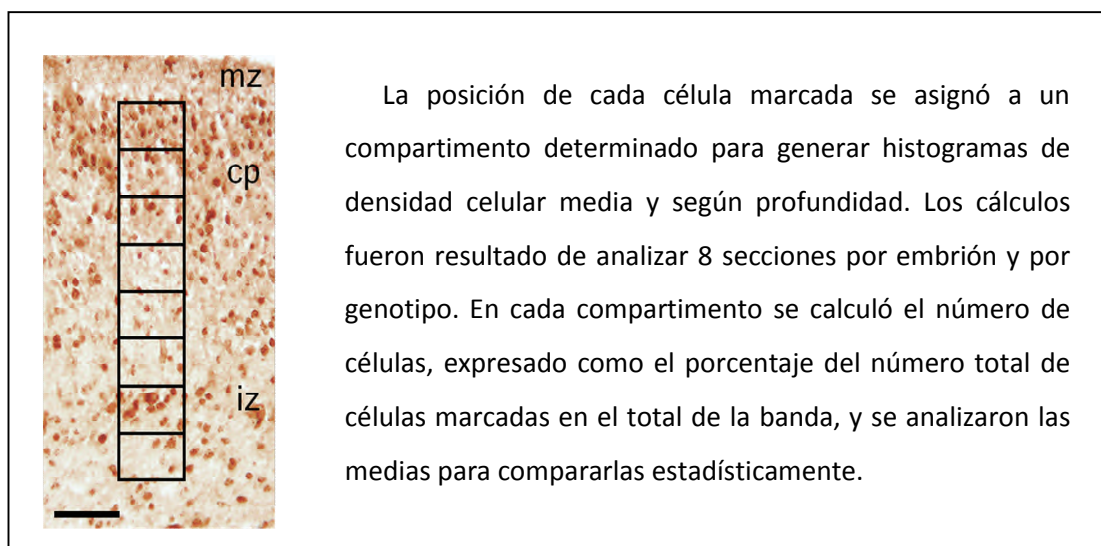
Se administró intraperitonealmente bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich) a ratones hembra, preñadas, con el objetivo de observar la incorporación de BrdU en el cerebro de los embriones y realizar el seguimiento de las poblaciones celulares. La BrdU, como se citó, es un análogo del nucleótido timidina que, al incorporarse en el ADN nuclear durante la fase S del ciclo celular permite el seguimiento de los procesos de división celular, ampliamente usada en los estudios de neurogénesis (Taupin, 2007).

Se prepararon alícuotas de BrdU a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada y que, una vez diluidas 1:2 en suero salino fisiológico estéril se usaron para realizar una única inyección intraperitoneal (en una proporción de 70 μg BrdU/gr de peso del animal) a hembras preñadas con embriones correspondientes a un estadio E14.5. Las hembras inyectadas se

sacrificaron, para obtener los embriones, transcurridos 45 minutos, a las 12 horas, y en el estadio E18.5, tras la inyección. Los embriones se extrajeron quirúrgicamente, se extrajo el cerebro en cada uno de ellos y, tras fijación en paraformaldehído a 4 %, se procesó para la obtención de secciones en parafina (ver apartado anterior).

La incorporación de la bromodesoxiuridina al ADN obliga, para su detección, a un procedimiento para la apertura y el acceso a la hebra de ADN. Para ello se sometieron las secciones a una digestión del tejido en una solución de proteinasa K (Sigma-Aldrich) a concentración de 5 µg/ml, durante 30 min a 37°C. Tras ello, se realizaron tres lavados de 10 min con tampón Tris-fosfato salino 0,01 M, pH 7,8 (ver en Anexo I) y se desnaturalizó el ADN por incubación en una solución 2N de ácido clorhídrico (Panreac) durante 30 min, a 37°C. Tras neutralizar el ácido mediante dos lavados de 10 min en tampón borato 0,1 M, pH 8,5 (ver Anexo I), se realizó lavado con tampón Tris-fosfato salino 0,01 M, pH 7,8 y se siguió con el protocolo convencional de inmunohistoquímica, si bien, tanto los anticuerpos primario y secundario, como los pasos de lavado, se realizaron usando, como base, tampón Tris-fosfato salino 0,01 M, pH 7,8.

Para la cuantificación de las células positivas a BrdU se clasificaron éstas en células con marca densa, es decir, aquellas donde se marca más de la mitad del núcleo, y células con marca ligera, con menor marca en el núcleo, indicativa de que han sufrido más de un ciclo de división tras el marcaje (Gillies y Price, 1993; Taupin, 2007). La pared cortical del telencéfalo se analizó en profundidad, por capas corticales, en secciones coronales no adyacentes tomadas en la porción media cortical. En cada sección se analizaron bandas radiales de 100 µm de ancho, divididas en diferentes compartimentos correspondientes a las distintas capas corticales de acuerdo al siguiente esquema:



3.4.2.4. Inmunodetección y cuantificación neuronal. Estereología.

Para estimar el número de neuronas en una determinada área cerebral se recurrió a la estereología, definida como conjunto de métodos útiles para obtener información cuantitativa de carácter geométrico-estadístico de un objeto de interés, a partir de secciones del objeto (Cruz-Orive, 1987).

Para el estudio presente se recurrió a cuantificar las neuronas positivas a NeuN detectadas por el procedimiento convencional mencionado con anterioridad sobre criosecciones en flotación. La cuantificación se realizó en corteza motora y somatosensorial sobre secciones de microtomo de congelación de cerebros procedentes de ratones de 12 semanas de edad fijados con paraformaldehído al 4 % mediante perfusión vascular. Se cuantificó un total de 6 animales por cada genotipo. Se usaron 7 secciones de 30 μm de grosor, espaciadas de manera similar, y procedentes de series paralelas tras cortar cada corteza coronalmente en sentido rostrocaudal. Cada capa cortical se delimitó de acuerdo a los criterios de Paxinos y Franklin (2001).

El método empleado fue el método del *disector óptico*, una modificación del disector físico (Sterio, 1984) y estima el número de células contenidas en un volumen de referencia. El método para calcular el volumen de la región de interés se basa en el principio de Cavalieri (Sterio, 1984; Gundersen, 1986; Uylings et al., 1986) y consiste en la colocación sobre nuestra región de interés de una plantilla, formada por una serie de puntos, con un área asociada. Esta plantilla se colocará aleatoriamente sobre las secciones y se contará el número de intersecciones que caigan dentro del perfil de la estructura.

Para llevar a cabo el conteo estereológico se usó un microscopio BX51 (Olympus España S.A.; Barcelona) conectado con un ordenador y una video cámara en color (CCD-iris, Sony España, Barcelona). El programa C.A.S.T.-Grid versión 3.1 (Olympus) genera un muestreo de campos de un área conocida mediante el control de motorización en eje (X/Y) y el uso de un microcator MT12 (sensor electrónico de posición en Z de alta sensibilidad y precisión para sistema CAST), que dirige los movimientos en el eje Z con una resolución de 0,5 μm . Los objetivos del microscopio fueron UPLSAPO 4x, 10x, 20x, 40x, 100x de 0,16, 0,4, 0,75, 0,90, y 1,40 de apertura numérica, respectivamente.

En el procedimiento habitual se delineó la región a cuantificar con el objetivo de 10x y, usando el objetivo de inmersión de 100x, el programa informático creó de forma aleatoria una 25 - 70 disectores ópticos de muestreo para cada capa, donde se encontrarían las células

marcadas. Cada disector constaba de un marco de muestra de 43,4 μm x 43,4 μm , con líneas de exclusión. El conteo se realizaba desde una profundidad de 5 μm bajo la superficie del tejido y cuantificando las neuronas que se enfocaran a través de una profundidad de 15 μm del plano óptico de sección. Para cada animal se calculó el número de células por unidad de volumen (N_v), entendido como el número de disectores empleados multiplicado por V_{dis} ; donde $V_{\text{dis}} = S_d \times H_d$, siendo S_d = área de la plantilla del disector (marco de muestra) and H_d = profundidad del disector. Los datos se analizaron estadísticamente.

3.5. Análisis de la muerte celular por apoptosis durante el desarrollo

El análisis de los niveles de muerte celular por apoptosis en la corteza cerebral se realizó en embriones y en ejemplares postnatales. Los estadios elegidos para el experimento fueron dos representativos que permitieran observar tanto defectos tempranos tras las primeras fases de neurogénesis, como a largo plazo, en período postnatal, siendo por tanto E15.5 y P7. Se analizaron 8 ejemplares por edad y genotipo.

Tanto en el caso de los embriones, como los ratones jóvenes, se sacrificaron los animales por decapitación y, una vez extraído el cerebro, se fijó por inmersión durante 24 h en una solución de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (Anexo I). Tras criopreservar el tejido, se congeló y procesó para criostato (ver apartados anteriores) para la obtención de criosecciones de 30 μm de grosor que se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) y guardaron a -80°C hasta su uso.

El análisis de la muerte celular se realizó utilizando un kit comercial de detección de apoptosis (Promega G3250, *DeadEndtm fluorometric TUNEL System*).

Los cambios morfológicos que se observan en el núcleo de células en proceso de apoptosis se deben, generalmente, a la generación de fragmentos sueltos de ADN resultado de la acción de varias endonucleasas (Schwartzman and Cidlowski, 1993). El ADN internucleosomal de células en apoptosis se suele romper en fragmentos de 180-200 pares de bases. El kit se basa en el marcaje in situ del ADN fragmentado usando una modificación del ensayo conocido como TUNEL (por sus siglas del inglés, *TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling*) y en el que se ponen de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación del ADN, incorporando nucleótidos marcados (dUTP, desoxiuridina trifosfato) a dicho extremo mediante la acción de una transferasa de desoxinucleótidos terminales (TdT). Este ADN marcado puede

ser visualizado directamente en un microscopio con fluorescencia o incluso medido por citometría de flujo.

Las muestras se sometieron al siguiente proceso (realizado a temperatura ambiente salvo indicación contraria):

- Lavado en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I) durante 5 min, seguido de fijación de las secciones por inmersión de los portaobjetos en una solución de paraformaldehído (Merck) al 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 15 min.
- Lavado de cuatro pasos de 5 min en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I).
- Incubación en gota y durante 8-10 min, con una solución de proteinasa K (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 µg/ml y diluida en una solución de Tris -HCl 100 mM, pH 8,0 con EDTA 50 mM (ambos reactivos, Sigma-Aldrich).
- Lavado de 5 min en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 y fijación de las secciones por inmersión de los portaobjetos en una solución de paraformaldehído (Merck) al 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 5 min. Seguido de lavado de cuatro pasos de 5 min en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4.
- Eliminación del exceso de tampón e incubación en gota con tampón de equilibrado (cacodilato de potasio 200 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 6,6, con ditiotreitol 0,2 mM, albúmina de suero bovino a 0,25 mg/ml, y cloruro de cobalto 2,5 mM; según descripción comercial) 5-10 min.
- Eliminación del exceso de líquido e incubación, en gota, a 37 °C, 1 h, en cámara húmeda, en el tampón que contenía la enzima recombinante TdT o rTdT (tampón de equilibrado con 12-dUTP marcado con fluoresceína 5 µM, dATP 10 µM, Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM, y EDTA 0,1 mM, y enzima rTdT; según descripción comercial).
- Incubación en tampón SSC de parada de reacción (NaCl 0,3 M y citrato sódico 0,03 M, pH 7,2.; según descripción comercial) durante 15 min.
- Lavado de cuatro pasos de 5 min en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4. Seguido de lavado en agua destilada y montaje en medio para fluorescencia (Sigma-Aldrich).
- Alternativamente se realizó tinción de núcleos con una solución de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) a 1 µg/ml en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, durante 15 min y en oscuridad. Transcurrida la incubación, se lavaron las secciones y se montaron en medio de montaje para fluorescencia (Sigma-Aldrich).

El cálculo del número de células se realizó en secciones coronales no adyacentes, de la región media cortical y de acuerdo al esquema de compartimentos empleado para el análisis de la bromodesoxiuridina. Los datos se sometieron a valoración estadística.

3.6. Hibridación *in situ*

3.6.1. Marcaje de sondas

La técnica de hibridación *in situ* (HIS) se utilizó para identificar y determinar la localización de secuencias de ARN mensajero de los genes *Lpar1*, *Pax6*, *Tis21*, *Ngn1*, *Ngn2* y *TAG-1*. Se utilizaron sondas de ARN marcadas con digoxigenina (sonda no radiactiva) específicas para la secuencia de nuestros genes de interés. La digoxigenina permite revelar la señal de hibridación en el tejido.

Se han utilizado:

- Ribosonda del exón 3 del gen ***Lpar1*** marcada con digoxigenina (Contos et ál., 1998, 2000). Los plásmidos conteniendo la secuencia de ADN complementario (ADNc) del exón 3 del gen *Lpar1* (Contos et al., 1998, 2000) fueron aportados por el Dr. Jerold Chun del Centro Dorris de Neurociencia, en el Instituto de Investigación Scripps en La Jolla, Estados Unidos. Los plásmidos estaban incorporados a un vector de clonación de tipo *pBluescript*. Se linearizaron con el uso de la enzima de restricción BglIII para generar la sonda antisentido y de la enzima XhoI para la sonda sentido. La transcripción precisó del uso de una ARN polimerasa T7 para la sonda antisentido, y de una ARN polimerasa T3 para la sonda sentido.

- Ribosonda del gen ***Pax6*** marcada con digoxigenina. La sonda de ADNc de *Pax6* fue cedida por el Dr. David Price del Centro de Fisiología Integral de la Universidad de Edimburgo, en Reino Unido. Los plásmidos estaban incorporados a un vector de clonación de tipo *pCR®-Blunt II- TOPO*. Se linearizaron con el uso de la enzima de restricción BamHI. La transcripción precisó del uso de una ARN polimerasa T7 para la sonda antisentido, y de una ARN polimerasa SP6 para la sonda sentido.

- Ribosonda del gen ***TAG-1*** marcada con digoxigenina. La sonda de ADNc correspondiente (Denaxa et ál., 2001) fue cedida por la Dra. Marion Wassef, de la Escuela Normal Superior de Paris, en Francia y por el Dr. Domna Karageos del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología en la Universidad de Creta, en Chipre. Los plásmidos estaban incorporados a un

vector de clonación de tipo *pBS*. Se linearizaron con el uso de la enzima de restricción HindIII para generar la sonda antisentido y de la enzima XhoI para la sonda sentido. La transcripción precisó del uso de una ARN polimerasa T3 para la sonda antisentido, y de una ARN polimerasa T7 para la sonda sentido.

- Ribosonda del gen ***Ngn1*** y ***Ngn2*** marcada con digoxigenina. Cedida por los Dres. Isabel de Diego y Anibal Smith-Fernández de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga. Los plásmidos estaban incorporados a un vector de clonación de tipo *pGEM[®]-3Zf(+)*. Se linearizaron con el uso de la enzima de restricción Nhe1 (en el caso de *Ngn1*) y BamH1 (*Ngn2*) para generar la sonda antisentido y de la enzima SphI (*Ngn1*) y EcoRI (*Ngn2*) para la sonda sentido. La transcripción precisó del uso de una ARN polimerasa T7 para la sonda antisentido, y de una ARN polimerasa SP6 para la sonda sentido.

Todo el protocolo se realizó en las mayores condiciones de esterilidad posibles. La síntesis y marcaje de las sondas de ARN (ribosondas) con digoxigenina se realizaron a partir de ADN ya linearizado, cedido por la Dra. Isabel de Diego (Facultad de Medicina, UMA), mediante una reacción de transcripción in vitro usando un kit de marcaje de sondas frías Riboprobe[®] Systems (Promega Biotech Ibérica, S.L.; Madrid; en adelante, Promega), que contenía un medio rico en sustratos de ARN conteniendo los ribonucleótidos de guanina, adenosina, citosina y uracilo (GTP, ATP, CTP y UTP, respectivamente) y constituido por: 4 µl de tampón de transcripción 5X; 2 µl de MDTT a 0,1 M; 1 µl de rGTP a 10 mM; 1 µl de rATP a 10 mM; 1 µl de rCTP a 10 mM; 0,65 µl de rUTP a 10 mM; 0,35 µl de digUTP a 10 mM; 1 µl de inhibidor de ARNasa; 1 µl de ARN polimerasa; 1 µl de solución ADN linearizado a 1 µg/µl; completando hasta 20 µl con 7 µl de agua destilada.

Mediante dicha reacción de marcaje un 35% de los ribonucleótidos de uracilo estaba marcado con digoxigenina para capacitar revelar la señal en el tejido. La mezcla de reacción contenía un inhibidor de la ARNasa para evitar la degradación de las cadenas de ARN resultantes. Para la reacción se usó la polimerasa de ARN correspondiente para cada sonda, dejándola actuar durante 2 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se añadió ADNasa I (2 µl ADNasa I, 37°C, 15 min) para eliminar el ADN lineal sobrante de la mezcla.

Las ribosondas se purificaron precipitándolas, siguiendo las instrucciones del kit, durante 30 min, a una temperatura de -20°C con sales de cloruro de litio y etanol al 100 % (la mezcla para cada caso fué de 100 µl de tampón TE pH 7.5; 10 µl de CLi a 4M; 300 µl de etanol al 100 %; de acuerdo al fabricante). Seguidamente se rotó la solución a mano, dejándola a -20°C ó a -70°C,

durante 30 min. Tras centrifugar para eliminar el sobrenadante, se lavó el precipitado en etanol al 70 % y, a continuación, y tras desecar, se volvió a disolver en 100 µl de tampón TE. Esta solución de la sonda marcada con digoxigenina, con una concentración aproximada de sonda de 0.1 µg/µl, se conservó a -20°C

Para comprobar que las sondas producidas habían incorporado los nucleótidos con digoxigenina y que estaban correctamente marcadas, se realizó transferencia en gota y tinción de detección (*Dot- Blot*) para sondas con digoxigenina. Al no tener una solución de ARN patrón marcado no se pudo cuantificar, pero sirvió para verificar que las sondas estaban marcadas

3.6.2. Procesamiento e hibridación

Como se ha citado en la sección anterior (3.3.4), los cerebros destinados a su estudio por HIS se procesaron para la obtención de secciones con vibratomo. Los cerebros se sometieron inicialmente a fijación en solución tamponada de paraformaldehído al 4 %, seguido de un proceso de deshidratación y almacenamiento a baja temperatura en metanol. Para la obtención de las secciones, se rehidrataron en solución tamponada y, tras incluir cada pieza en una mezcla de albúmina y gelatina, se obtuvieron secciones de 200 µm de grosor con el uso de un vibratomo. Las secciones se deshidrataron, mediante pasos por soluciones crecientes de metanol en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 %, denominado en forma abreviada FST, y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Los cortes se rehidrataron y, tras lavado en tampón FST (2 pasos de 5 min) se sometieron a un tratamiento durante 15 min con proteinasa K (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 µg/ml en tampón FST, para facilitar la penetración de la sonda, seguido de incubación en una solución de glicina (Sigma-Aldrich) a 2 mg/ml en tampón FST 15 min, y lavados posteriores (2 pasos de 5 min) en tampón FST. A objeto de evitar dañar la fragilidad de los cortes tras este tratamiento, se sometieron a postfijación con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 0,2 % (Sigma-Aldrich) en tampón FST durante 20 min, seguido de lavado en tampón FST. Digestión, fijación y lavados se realizaron a temperatura ambiente.

Se realizó una prehibridación de 1h a 70°C. Seguidamente, y a razón de 15 µl de sonda por cada 2000 µl de tampón de hibridación (Anexo I), se sometieron las secciones a la hibridación con la sonda de ARN por incubación durante 18h, a 70°C, temperatura óptima de unión de la sonda a su secuencia diana específica. La presencia de formamida en el tampón de hibridación (ver Anexo I) y la alta temperatura favorecía que las uniones formadas fueran altamente específicas, asegurándonos que la sonda no se uniera a ninguna otra secuencia.

Tras la hibridación propiamente dicha se realizaron, en la denominada posthibridación, varios lavados de las muestras con el fin de eliminar los híbridos no específicos que se hayan podido formar: dos lavados de 30min a 70°C en Solución I (Anexo I), seguido de un lavado de 10min a 70°C en una mezcla a partes iguales de soluciones I y II (Anexo I), y tres de 5 min en solución II (Anexo I). A continuación se destruyeron los fragmentos de ARN libres por incubación de 30 min a 37°C en solución de ARNs a 100 µg/ml en solución II, seguida de tres lavados, un primer lavado en solución II 5 min a temperatura ambiente, y dos de 30 min a 65°C en solución III (Anexo I).

3.6.3. Detección de la sonda

Para la detección de la sonda se utilizó un anticuerpo primario anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Roche). Previo a la detección los cortes fueron preincubados en una solución de levamisol para inactivar la fosfatasa alcalina endógena (Tampón Tris salino con Tween® 20 1X - levamisol, Anexo I; 3 pasos de 5 min a temperatura ambiente), seguido de una incubación en una solución de albúmina sérica bovina al 3 % en Tampón Tris salino con Tween® 20 1X - levamisol (Anexo I), durante 90 min, a temperatura ambiente, para eliminar fondo. La Incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina se realizó durante al menos 18 h, a 4°C y en agitación, con el anticuerpo diluido 1:2000 en la solución de albúmina sérica bovina al 3 % en Tampón Tris salino con Tween® 20 1X - levamisol. Tras la incubación se lavó varias veces a temperatura ambiente con Tampón Tris salino con Tween® 20 1X - levamisol (3 x 5 min + 5 x 30 min y agitación) y NTMT-levamisol (Anexo I) (3 x 10 min, con agitación) para eliminar el exceso de anticuerpo.

Para el revelado de la actividad de la fosfatasa alcalina se empleó el sistema NBT/BCIP (Roche) que usa nitroazul de tetrazolio (NBT, del inglés, *Nitro blue tetrazolium*) y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, del inglés, *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) como sustratos de la enzima, diluidos en el tampón NTMT-levamisol (Anexo I). Para 10 ml de NTMT se añadió 45 µl de solución de NBT a 75 mg/ml y 35 µl de solución de BCIP a 50 mg/ml. La reacción de estos sustratos mediada por la fosfatasa alcalina produce un precipitado de color azul-púrpura fácilmente identificable en las preparaciones. La reacción se realizó en oscuridad, prolongándose durante 4 horas.

Una vez terminada la técnica, los cortes se lavaron en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1 %, y se deshidrataron en concentraciones crecientes de glicerol (glicerol al 50 % y al 80 % en dicho tampón). Quedaron almacenados en Glicerol al 80%

en oscuridad y a una temperatura de 4°C. Los cortes se montaron en portaobjetos, con un medio de glicerina-gelatina (Anexo I) y se almacenaron en oscuridad y a 4°C.

Las muestras fueron analizadas utilizando una cámara digital Canon Powershot (Leica Microsystems; Leica Microsistemas SA; Barcelona) acoplada a un microscopio invertido Leica DM IL (Leica Microsystems; Leica Microsistemas SA; Barcelona) equipado con objetivos 10x y x40, con apertura numérica 0,20 y 0,50, respectivamente.

3.7. Análisis in vitro: Cultivos celulares e inmunocitoquímica.

A objeto de analizar la dinámica proliferativa se realizaron cultivos de neuroblastos corticales procedentes de embriones de estadio E14.5. Para ello, se aisló quirúrgicamente la zona cortical de la parte medial del telencéfalo del embrión (Fig. 21) y, a continuación, se disoció el tejido mediante incubación en papaína con un kit comercial y siguiendo las instrucciones del procedor (*Papain Dissociation System*, Worthington Biochemical Corp., Lakewood, New Jersey).

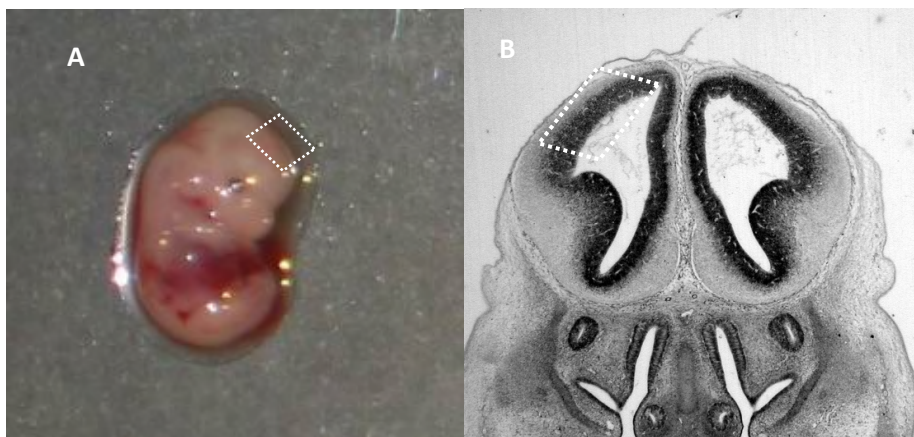


Figura 21. Región utilizada para el aislamiento de neuroblastos corticales en embrión de ratón de estadio E14.5. Se indica la zona (línea de puntos) en el embrión entero (A) y en corte coronal del mismo estadio (B).

De acuerdo a las instrucciones del preparado comercial (<http://www.worthington-biochem.com/PDS/default.html>), tras triturar suavemente el tejido mediante pipeteo (aspiración/expulsión) se sometió al tejido a una incubación a 37°C durante media hora con agitación, en una solución de papaína a una concentración de 20 unidades/ml en medio salino

tamponado de Earle (EBSS, del inglés, *Earle's balance salt solution*) con L-cisteína a 1 mM, EDTA a 0,5 mM, y 0,005% de ADNasa.

Transcurrida la digestión, se disgregó suavemente la solución tisular mediante pipeteo y se centrifugó (5 min, 300 xg) para obtener un precipitado celular con el que se realizó una suspensión con albúmina e inhibidor de ovomucoide ambos a 10 mg/ml, y 0,005% de ADNasa, en medio EBSS. La suspensión celular se depositó sobre la superficie de una capa de medio con inhibidor ovomucoide para efectuar una centrifugación en gradiente (6 min, 70 xg) que permitió separar las células viables de restos de membrana. El precipitado se resuspendió en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, del inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma-Aldrich, D0547) libre de suero y las células en suspensión se dispusieron, en dicho medio y a una densidad celular aproximada de $1,5 \times 10^5$ células/cm² en sistemas multicámaras de cultivo sobre portaobjetos (*Nunc*® *Lab-Tek*® *II Chamber Slides*™, Thermo Fisher Scientific Corp.; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos; en adelante, Thermo Fisher) tratados con poly-L-Lisina (Sigma-Aldrich, P8920). Las condiciones del cultivo fueron 37°C y un 5 % de CO₂.

La viabilidad del cultivo se comprobó por el método de exclusión de azul de tripano con el uso de una solución de azul de tripano al 0,4 % (Sigma-Aldrich). Tras mezclar 100 µl de solución de azul tripano, 200 µl de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, y 100 µl de la suspensión celular (lo que supone una dilución celular 1:4), se esperó 3 -5 min y se realizó recuento celular empleando un hematocitómetro o cámara de Neubauer para calcular el porcentaje de células viables (aquellas que excluyeron el colorante) de acuerdo a las siguientes indicaciones:

- Conteo del número de células por cuadrado (4 cuadrados) y cálculo de la media de los cuadrados. Dado que un cuadrado tiene un área de 1 mm² y 0,1mm de alto, su volumen es 0,1 mm³, es decir, 10⁻⁴ cm³. Siendo 1cm³ equivalente a 1ml, 1 cuadrado tendrá un volumen de 10⁻⁴ ml. Por tanto, para obtener el nº de células/ml basta multiplicar x 10⁴ el nº de células/cuadrado. Habrá que considerar el factor de dilución (1:4) y multiplicar x4 para obtener el nº de células/ml definitivo. El mismo procedimiento, pero con las equivalencias correspondientes, se puede usar con la sección cuadrada central de la retícula (señalada en el círculo), considerando que el menor de los cuadrados tiene un volumen de 1 nl.

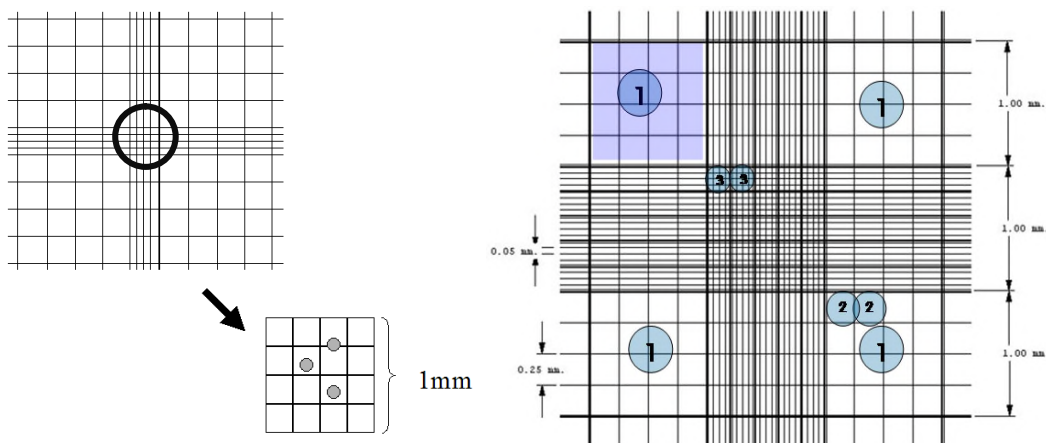


Figura 22. Esquema de áreas de recuento celular en hemocitómetro. Un detalle de las explicaciones se puede obtener en las direcciones:

<http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion.php>

<http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

3.7.1. Variables analizadas. Morfología celular

Como se ha citado en la introducción, la esfericidad celular y compactación son respuestas celulares al LPA cuando éste es añadido de manera exógena. Para corroborar la funcionalidad de la señalización del receptor LPA₁ en los cultivos celulares de neuroblastos procedentes de ratones normales, frente a los carentes del receptor LPA₁, se trataron ambos con una solución de oleil LPA ó 1-oleil-2-hidroxi-sn-glicerol-3-fosfato (en forma de sal sódica) (Avanti® Polar Lipids Inc.; Alabaster, Alabama; Estados Unidos) a 100 nM, diez veces superior a la concentración de eficacia media (CE₅₀) del oleil-LPA para el receptor LPA1 (CE₅₀ = 11,7 nM, Heise et ál., 2001; Choi et ál., 2010) y demostrada eficaz para generar una respuesta de compactación celular en neuroblastos corticales (Fukushima et ál., 2000). El LPA fue disuelto en una solución de albúmina bovina sérica libre de ácidos (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 3 % en suero fisiológico. El grupo control, en ambos genotipos, se trató únicamente con dicho vehículo.

Se realizó observación a microscopio invertido de la dinámica celular a tiempo cero, antes de añadir el fármaco, y 15 min después, usando una cámara digital Canon Powershot acoplada a un microscopio invertido Leica DM IL (Leica Microsystems) equipado con objetivos 10x y x40, con apertura numérica 0,20 y 0,50, respectivamente.

Los cultivos se analizaron a diferentes tiempos (12-24 h) tras inicio del mismo, cada uno de ellos repetido 4 veces en experimentos separados y en cultivos procedentes de 8 embriones por genotipo. Para el análisis se cuantificaron, en 6 campos del microscopio elegidos al azar, 800 - 1500 células viables por cultivo.

3.7.2. Variables analizadas. Marcaje con bromodesoxiuridina y cinética celular

Para analizar el patrón de proliferación y de ciclo celular en condiciones normales y en ausencia del receptor LPA₁, se recurrió al estudio de marcadores inmunocitoquímicos y al marcaje y seguimiento con bromodesoxiuridina (BrdU) según protocolos descritos por Estivill-Torrús et ál. (2002).

Para el cálculo del índice de marcaje, o porcentaje de células marcadas con BrdU, a las 12 h de establecer el cultivo de neuroblastos corticales ($t = 12$ h) se añadió BrdU al medio de cultivo a una concentración final de 10 μ M. Para ello, se prepararon alicuotas de BrdU (Sigma-Aldrich) disueltas en solución salina estéril a una concentración de 10 mg/ml. A partir de éstas, se diluían 1:3000 en medio de cultivo (DMEM) para obtener una concentración final de BrdU de 10 μ M. Este medio, una vez filtrado (0,2 μ M) se usaba para reemplazar al presente en cada cámara de cultivo (multicámaras de cultivo sobre portaobjetos). A los 45 minutos (pulso de BrdU) el medio de cultivo con BrdU fue retirado y sustituido por medio fresco. Las células se fijaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído (Panreac) al 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. La fijación tuvo lugar inmediatamente después de este pulso de BrdU ($t = 12, 75$ h tras cultivo) y a las 18 h, 24 h, y 36 h. Transcurrida la fijación de 30 min a cada tiempo se retiró el fijador y se lavó en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 varias veces, almacenando en dicho tampón y a 4°C hasta su uso.

Para estudiar la cinética celular se recurrió al método de marcaje acumulativo con BrdU (Nowakowski et ál., 1989; Estivill-Torrús et ál., 2002) mediante el cual se somete a un cultivo a pulsos de BrdU a diferentes tiempos, gradualmente en aumento, a objeto de detectar la incorporación acumulada en una población celular. Una vez establecida la proporción de células marcadas respecto a la longitud del pulso de BrdU y, de acuerdo a Nowakowski et ál. (1989) es posible calcular la fracción de crecimiento (FC; células marcadas), el tiempo de la fase de síntesis del ciclo celular (T_s), y el tiempo o longitud del ciclo celular (T_c) tal como se indica en la Figura 23.

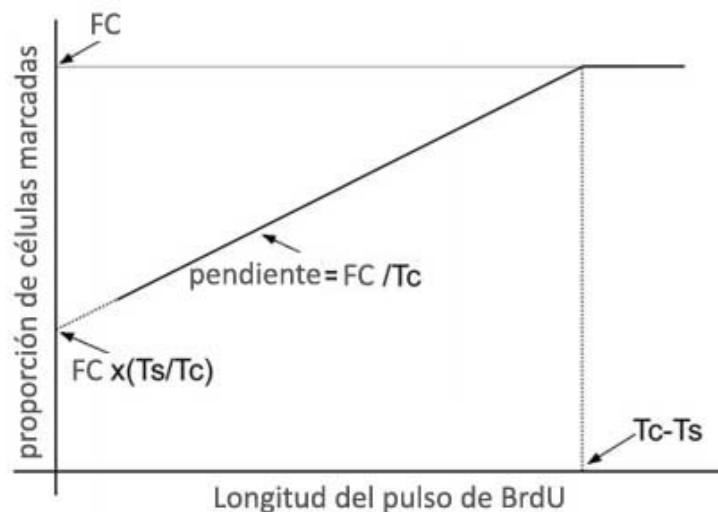


Figura 23. Representación usada para el cálculo de parámetros de cinética celular. La intersección del eje y representa $FC \times (Ts/Tc)$; el tiempo en el que se alcanza la mayor FC (T_m) = $Tc - Ts$; la tasa de aumento de la proporción de células marcadas viene representada por la pendiente de la recta, siendo igual a FC/Tc (Nowakowski et ál., 1989; gráfico modificado de Estivill-Torrús et ál., 2002)

3.7.3. Variables analizadas. Detección de bromodesoxiuridina y marcadores de diferenciación.

Los estudios anteriormente citados requirieron, como en la histoquímica, de la inmunocitoquímica para la detección de la BrdU añadida a los cultivos. Para ello se utilizó el mismo anticuerpo monoclonal que se usó en inmunohistoquímica (Ref.:G3G4; DSHB), detallado en la sección 3.4.2.1. Además, se utilizó inmunocitoquímica para la detección de otros dos marcadores celulares, expresados a continuación, que permitieron caracterizar los procesos de proliferación y diferenciación:

- **Ciclina A.** La regulación de la progresión del ciclo celular en eucariotas depende de la expresión de ciclinas. Complejos de ciclinas y ciclinas dependiente de quinasas ejercen un control sobre el ciclo celular (Pines y Hunter, 1991). La ciclina A es una proteína nuclear que se expresa durante la fase S del ciclo celular. Antes de la metafase desaparece su expresión. Se une formando complejos activos con cdk2, para intervenir, principalmente, en la transición de las fases G1/S (Woo y Poom, 2003; Kaldis y Aleem, 2005). Su detección permitió determinar la proporción de neuroblastos mayoritariamente en fase S y se realizó con un anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, de referencia C 4710, clon CY-A1 (Sigma-Aldrich).

- **p27^{kip1}** (también llamada **p27**). El potencial neurogénico de los precursores apicales viene medido por la proporción de células que salen del ciclo celular frente a las que permanecen proliferando, reentrando en ciclo. Durante la corticogénesis la proporción de células en salida de ciclo y diferenciación aumenta respecto a la proporción que permanece en proliferación, en un control orquestado por diferentes factores, entre ellos p27^{kip1}, una proteína inhibidora de complejos ciclina-quinasa dependientes de ciclina. La expresión de p27^{kip1} induce un incremento en la proporción de células de la ZV que salen del ciclo celular y migran a las capas superficiales (Tarui et ál., 2005) promoviendo, además, la migración y la morfología de las neuronas postmitóticas a través de la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la formación de complejos e interacciones con Cdk5 y conexina 43 (Kawauchi et ál., 2013). Su detección se realizó usando un anticuerpo monoclonal producido en ratón, de referencia 610241, clon 57 (BD Transduction Laboratories™; BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company©; Franklin Lakes, New Jersey, .Estados Unidos; BD Biosciences Europe; San Agustín de Guadalix, Madrid).

Además, de manera rutinaria, se realizó tinción de contraste para la caracterización del cultivo neural con anticuerpos dirigidos a antígenos de linaje neuronal como la **β-III tubulina** (mencionada en el apartado 3.4.2.1; anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, con referencia T8660, clon SDL.3D10; Sigma-Aldrich) o la proteína asociada a microtúbulos **MAP2** (anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, con referencia M 4403, clon HM-2; Sigma-Aldrich); de linaje astrocitario, en este caso a la proteína ácida fibrilar glial **GFAP** (del inglés *glial fibrillary acidic protein*; anticuerpo policlonal obtenido en conejo, con referencia G 9269; Sigma-Aldrich); y de linaje oligodendrocitario, siendo el antígeno la proteína La 2' 3'-nucléotido cíclico 3'-fosfodiesterasa o **CNPasa** (del inglés *2', 3' -cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*; anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, con referencia C 5922, clon 11-5B; Sigma-Aldrich).

3.7.4. Tinción inmunocitoquímica.

Las células se fijaron, en las multicámaras de cultivo sobre portaobjetos, durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído (Panreac) al 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. La fijación tuvo lugar inmediatamente después del mencionado pulso de BrdU (t = 12, 75 h tras cultivo) y a las 18 h, 24 h, y 36 h. Transcurrida la fijación de 30 min a cada tiempo se retiró el fijador y se lavó en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 varias veces, almacenando en dicho tampón y a 4°C hasta su uso.

De manera general, el protocolo de detección sobre las multicámaras contempló los siguientes pasos, todos ellos con agitación suave y a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario:

- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I) en dos pasos de 10 min, seguido de lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Triton X100 (Panreac) al 0,5 %, en dos pasos de 10 min.
- Inactivación de la peroxidasa endógena con solución de metanol (Merck) al 90 % (v/v) en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 durante 10 min, seguido de lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en dos pasos de 10 min.
- Incubación en una solución 2N de ácido clorhídrico (Panreac) durante 30 min, a 37°C. (Sólo en el caso de detección de BrdU).
- Lavado en tampón borato 0,1 M, pH 8,5 (ver Anexo I), durante 10 min, seguido de lavados en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en dos pasos de 10 min, y lavados en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Triton X100 al 0,5 %, en otros dos pasos de 10 min. (Sólo en el caso de detección de BrdU).
- Incubación durante 1 h en una solución compuesta de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, suero animal al 2,5 % (según corresponda; Biolink2000 S.L., Barcelona), Triton X100 (Panreac) al 0,5 %, y azida sódica (Sigma-Aldrich) al 0,01 % (p/v), como preservante. El suero animal fué obtenido en conejo, cuando el anticuerpo primario era de origen murino, y obtenido en cerdo, cuando se trataba de un policlonal obtenido en conejo.
- Incubación durante 12-18 h en cámara húmeda con el anticuerpo primario correspondiente, diluido a 1: 1000 en la citada solución compuesta de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, suero animal (según correspondiera) al 2,5 %, Triton X100 al 0,5 %, y azida sódica.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en dos pasos de 10 min, seguido de una nueva incubación durante 1 h en solución de tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, suero animal al 2,5 %, Triton X100 al 0,5 %, y azida sódica.
- Incubación durante 2,5 h, en la solución del anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (anti IgG de ratón, obtenido en conejo, o anti IgG de conejo, obtenido en cerdo, ambos policlonales, biotinilados, con referencias E0464 y E0353, respectivamente; Dako Diagnósticos, S.L.U., Barcelona), diluido a 1: 800 en solución de

tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con suero de cabra al 2,5 % (Biolink2000 S.L., Barcelona), Triton X100 al 0,5 %, y azida sódica al 0,01 % (p/v).

- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Triton X100 (Panreac) al 0,5 %, en dos pasos de 10 min, seguido de un lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, y de incubación 20 min, en oscuridad, en solución de *Extravidin*[®] (avidina conjugada a peroxidasa, Sigma-Aldrich) diluida 1: 1000 en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4.
- Lavado en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 en tres pasos de 10 min.
- Revelado de la actividad peroxidasa durante 15-25 min y en oscuridad con una solución, preparada en el momento, de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) al 0,05 %, en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 y perhidrol (Merck) al 0,03 %.
- Lavado exhaustivo en agua destilada. Desmontado de la cámara sobre portaobjetos hidratación y aclarado por inmersión en pasos sucesivos de alcoholes, de gradación creciente [70 % (v/v), 5 min; 96 % (v/v), 2 x 5 min; 100 % (v/v), 2 x 10 min] y xileno (2 x 10 min). Montaje con *Eukitt*[®] (Panreac) o DPX (Sigma-Aldrich).

Para los experimentos con contraste o doble marcaje, tras el revelado del primer anticuerpo primario con DAB, según lo expuesto, los cultivos se lavaron y se les añadió metanol al 90% (v/v) para inhibir la actividad peroxidasa del primer marcaje. El segundo marcaje fue realizado usando anticuerpos primarios de manera convencional, como la citada, sustituyendo los anticuerpos secundarios biotinalados por conjugados a fosfatasa alcalina, revelando esta actividad enzimática con el sistema NBT/BCIP (Roche; ref. 1 681 451). De manera similar a lo mencionado en la sección 3.6.3. Este sistema usa nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) como sustratos de la enzima.

Para ello, una vez incubado el anticuerpo primario de contraste (12-18 h en cámara húmeda, anticuerpo diluido a 1: 1000 en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, suero animal correspondiente al 2,5 %, Triton X100 al 0,5 %, y azida sódica) y, efectuados los lavados correspondientes, se realizaron los siguientes pasos a temperatura ambiente:

- Lavado en tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5 (Anexo I), 10 min.
- Inactivación de fosfatasa alcalina endógena mediante incubación en tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, con levamisol (Sigma-Aldrich) a 2 mM, 30 min, seguido de lavado en tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, tres pasos de 10 min.

- Incubación durante 10 min, en la solución del anticuerpo secundario correspondiente conjugado a fosfatasa alcalina (anti IgG de ratón, obtenido en conejo, o anti IgG de conejo, obtenido en cabra, ambos policlonales, con referencias A1902 y A8025, respectivamente), diluido a 1: 200 en tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5.
- Lavado en tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, dos pasos de 10 min, seguido de incubación durante 1 h, en oscuridad, en solución de preparado comercial (Roche) de 18,75 mg/ml NBT y 9,4 mg/ml BCIP, diluida (200 µl) en 10 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M, pH 9,5.
- Lavado en agua destilada y diferenciación de intensidad de color en etanol al 70° y 96°.
- Desmontado de la cámara sobre portaobjetos hidratación y aclarado por inmersión en pasos sucesivos de alcoholes, de gradación creciente [70 % (v/v), 5 min; 96 % (v/v), 2 x 5 min; 100 % (v/v), 2 x 10 min] y xileno (2 x 10 min). Montaje con Eukitt® (Panreac) o DPX (Sigma-Aldrich).

Como se ha mencionado, los cultivos se analizaron a diferentes tiempos (12-24 h) tras inicio del mismo, cada uno de ellos repetido 4 veces en experimentos separados y en cultivos procedentes de 8 embriones por genotipo. Para el análisis se cuantificaron, en 6 campos del microscopio elegidos al azar, 800 - 1500 células viables por cultivo.

3.8. Electroforesis, transferencia e inmunotinción de proteínas

Desde que la técnica de electrotransferencia e inmunotinción o *Western Blot* fuese introducida en 1979 (Towbin et ál., 1979), se ha convertido en rutinaria en los laboratorios para detectar cantidades baja de proteínas específicas de una muestra determinada. En esta técnica las proteínas son electrotransferidas desde un gel de poliacrilamida a una membrana específica para detectar a través de inmunotinción con anticuerpos la proteína de interés. En este trabajo, esta técnica fue desarrollada para cuantificar la expresión de la proteína GAP-43.

Como hemos mencionado, la proteína GAP-43 se encuentra en el sistema nervioso, central y está implicada en el trazado y guía axonal, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Jacobson et ál., 1986). En este estudio se utilizó en inmunohistoquímica para determinar defectos de guía axonal y de tipo neurofuncional derivados de la alteración de la

división de los precursores neurales. Por los resultados obtenidos se decidió cuantificarla mediante electrotransferencia e inmunotinción, dada la relevancia de las observaciones. Para su detección se usó el citado anticuerpo monoclonal, de referencia G 9264, Clon GAP-7B10, obtenido en ratón (Sigma-Aldrich).

3.8.1 Extracción de proteínas

El análisis se realizó sobre ocho animales de cada genotipo, en experimentos separados, y a P0, edad a la cual ya han alcanzado las capas superiores las últimas neuronas generadas y es detectable cualquier anomalía destacable a nivel de la totalidad de la corteza.

Se sacrificaron los animales por decapitación. Todo el proceso de extracción de proteínas se realizó en frío (4° C). Para el estudio, tras obtener los hemisferios cerebrales, y una vez desechada la zona correspondiente a la capa I de la corteza cerebral, se separaron las regiones dorsales superior y media comprendiendo las capas corticales II/ III. El tejido se introdujo en tampón de lisis y extracción [tampón Tris-HCl 10 mM, a pH 7,4, conteniendo, sacarosa 250 mM, y ácido etilendiaminetetracético (EDTA, del inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1 mM, leupeptina, a 1 µg/ml, aprotinina, a 1 µg/ml, y pepstatina, a 1 µg/ml como inhibidores de proteasas (todos los reactivos obtenidos de Sigma-Aldrich)]. Las muestras de tejido fueron trituradas en el tampón de extracción utilizando un homogeneizador con vástagos de pequeño tamaño para tubos de 1,5 ml (referencia Z359971; Sigma-Aldrich). Tras la homogeneización, las muestras sufrieron una breve pulso (3 s), en frío, de ultrasonidos mediante el uso de un sonicador (*Vibra-Cell*TM; Sonics & Materials Inc.; Newton, Connecticut, Estados Unidos) para romper las membranas celulares. El homogeneizado se sometió a una primera centrifugación (10 min, 900 xg) para separar los restos del tejido no homogeneizado que precipitarían. El sobrenadante fué ultracentrifugado (*Beckman optima XL-100K*; Beckman Coulter; Brea, California, Estados Unidos; Hospitalet de Llobregat, Barcelona) durante 20 min a 75 000 xg a 4°C. El precipitado resultante, conteniendo las proteínas de interés, se resuspendió en el tampón de lisis citado, al que se añadió TritónTM X-100 (Sigma-Aldrich) al 1%. Se realizó una centrifugación final durante 10 min, a 14 000 xg para eliminar el material insoluble.

Para cuantificar la cantidad de proteína extraída se utilizó el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), basado en el cambio de color del colorante Azul Brillante de CoomassieTM G-250, tras interactuar con los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, provocándole un

2.8. 3. Electroforesis de proteínas.

La flexibilidad y resolución que ofrece la utilización de electroforesis en geles de acrilamida ha convertido esta técnica en la principal herramienta para conseguir la separación de proteínas. Parámetros tales como la porosidad del gel o el tampón utilizado pueden regular la separación de proteínas en base a su carga, tamaño o una combinación de ambas. En nuestro caso, realizamos una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970). Las proteínas sembradas se desnaturalizan por calor y el SDS se une a las proteínas proporcionándoles carga negativa. Los geles de acrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida, la cual se inicia con la adición de persulfato amónico y es catalizada con la adición de tetrametiletilendiamina (TEMED, del inglés, *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*). Para el análisis de GAP-43, una proteína de 43 Kda, utilizamos un gel discontinuo de acrilamida al 10 %, que presenta a una porosidad adecuada para un rango de proteínas que se encuentren entre los 25 a 200 KDa. Se usó un sistema discontinuo, con un gel concentrador en el que las muestras se acumulan al comienzo de la electroforesis dando como resultado un frente más uniforme, y un gel separador o de resolución en el que las muestras se separan en sus componentes en función de su tamaño.

Para la preparación de los geles y la realización de la electroforesis se usó el sistema de cámaras de preparación y cubetas de electroforesis *Mini-PROTEAN® 3 Cell* y la fuente de alimentación *PowerPac™ Basic Power Supply* (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona; en adelante, Bio-Rad). Los geles concentrador y separador se prepararon siguiendo las instrucciones de los reactivos del mismo proveedor. Así, para la preparación de 25 ml de gel concentrador (4 % de acrilamida/ bis acrilamida; proporción 37,5:1) se mezclaron: 2,5 ml de solución de acrilamida/bis acrilamida, 6,3 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 250 µl de solución de SDS al 10 % y 15,9 ml de agua destilada, añadiendo, para finalizar, 25 µl de TEMED y 125 µl de solución de persulfato de amonio al 10 %. Para la preparación de 100 ml de gel separador, o de resolución, (10 % de acrilamida/ bis acrilamida; proporción 37,5:1) se mezclaron: 25 ml de solución de acrilamida/bis acrilamida, 25 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8, 1 ml de solución de SDS al 10 % y 48,5 ml de agua destilada, añadiendo, para finalizar, 50 µl de TEMED y 500 µl de solución de persulfato amónico al 10 %. Tras la polimerización del gel separador, se vertió sobre su superficie el gel concentrador y se colocó un peine plástico que permitió la formación de los pocillos y la definición de las calles para la siembra de las muestras.

Una vez polimerizado, se sembraron 25 µg de proteína de cada muestra, previamente diluida 1:2 con tampón de carga [3,55 ml de agua bidestilada, 1,25 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 2,5 ml de glicerol (Sigma-Aldrich), 2 ml de solución de SDS (Sigma-Aldrich) al 10%, 0,2 ml de solución de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0,5 %; para preparar 9,5 ml de tampón; en el momento de su uso, se añadieron, como agente reductor, 50 µl de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) por cada 950 µl de tampón] y desnaturalizada 5 min a 95°C.

Además de las muestras de proteínas, se cargaron dos tipos de marcadores de peso molecular adecuados al rango de la proteína. De una parte, un marcador compuesto por una mezcla de moléculas biotiniladas con rango amplio de peso molecular desde 6,5 kDa a 200 kDa (161-0319; Bio-Rad) y que, para su uso, se diluyó, previo a su carga, 1:20 con el citado tampón de carga, precisando, igualmente, de la incubación a 95°C. De otra, un marcador compuesto por una mezcla de moléculas coloreadas de 29 kDa a 205 kDa (C-3312; Sigma-Aldrich) que no necesitó calentamiento, siendo observable a simple vista en el gel sin necesidad de tinción.

Tras dejar enfriar, se cargaron las muestras y, tras cubrir todo el sistema y los pocillos con tampón de electroforesis [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1 %, pH 8,3; preparado a partir de solución comercial 10X, ref. 161-0772 (Bio-Rad)] se aplicó un voltaje inicial de 55 V para facilitar la penetración uniforme en el gel concentrador, y de 100 V para la resolución en el gel separador. La eficiencia de la electroforesis se comprobó en algunos geles mediante tinción con Azul de Coomassie™ incubando el gel a temperatura ambiente y secuencialmente, 1 h en solución fijadora [isopropanol (Sigma-Aldrich) al 25 % (v/v), ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) al 10 % (v/v), en agua destilada], 1 h en solución de tinción [Azul Brillante R de Coomassie™ (Sigma-Aldrich) al 0,1 % (p/v), metanol (Panreac) al 50 % (v/v), ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) al 10 % (v/v), en agua destilada], y, para la visualización de las bandas de proteína teñidas, una incubación durante 18 h, con agitación, en solución de desteñido [metanol (Panreac) al 10 % (v/v), ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) al 10 % (v/v), en agua destilada].

3.8 3. Transferencia e inmunodetección

Después de la electroforesis, se realizó la electrotransferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, del inglés, *polyvinylidene difluoride*; Bio-Rad). Para ello se usó el sistema de cámara de transferencia *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* con fuente de alimentación *PowerPac™ Basic Power Supply* (Bio-Rad). La

membrana de PVDF se activó previamente a su uso mediante inmersión en metanol (Panreac) al 100%. A continuación, se equilibró en tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, añadiendo metanol a concentración final de 20 %; preparado a partir de solución comercial 10X, ref. 161-0771 (Bio-Rad)] y se preparó, siguiendo las instrucciones del fabricante, un sándwich con papel de filtro y almohadillas de esponja humedecidas en el tampón, envolviendo la membrana y el gel, uno junto a otro, tal como se indica más abajo y evitando la presencia de burbujas de aire entre ambos (Fig. 25). Todo ello se colocó en la cubeta de transferencia con la membrana orientada más próxima al electrodo positivo (ánodo). La electrotransferencia se realizó a 100 V, 350 mA durante 20 min, a 4°C, confirmándose ésta por tinción posterior del gel de poliacrilamida en azul de Coomassie®, como se ha descrito anteriormente.

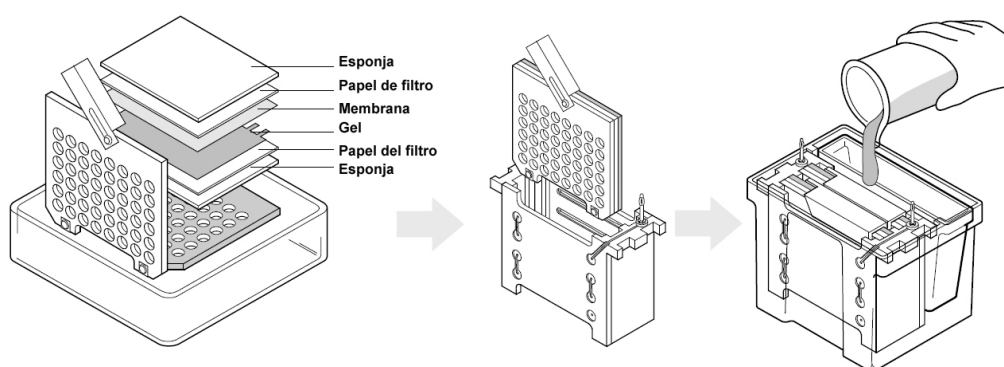


Figura 25. Esquema de la colocación del gel y la membrana para la electrotransferencia. Se disponen el gel y la membrana totalmente pegados uno a otro y rodeados de papel de filtro y dos esponjas de fibra humedecidos. (Modificado del manual de instrucciones del proveedor).

Todo el proceso de inmunodetección, a excepción de la incubación del anticuerpo primario, se realizó a temperatura ambiente y con agitación suave. En primer lugar, una vez terminada la transferencia se desmontó el sándwich y, procurando que no se secase, se depositó la membrana de PVDF durante 1h, en solución de bloqueo [Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) al 1 % y Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,2 %, en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I)] a objeto de evitar las uniones no específicas de los anticuerpos a utilizar a posteriori. El protocolo seguido es muy similar a la inmunohistoquímica convencional.

Tras el bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante 18 h a 4°C. Para la detección de Gap-43 se usó el mismo anticuerpo que en inmunohistoquímica, monoclonal, de referencia G 9264, Clon GAP-7B10, obtenido en ratón (Sigma-Aldrich) a una dilución de 1: 5000 en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Tween® 20 al 0,2 %.

Terminada la incubación del anticuerpo primario se lavó varias veces la membrana con solución de bloqueo y, seguidamente, se incubó durante 1,5 h en anticuerpo secundario, anti IgG de ratón, obtenido en conejo, policlonal, biotilado, con referencia E0354 (Dako Diagnósticos, S.L.U., Barcelona), diluido 1:2000 en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 con Tween® 20 al 0,2 %. Al terminar esta incubación, la membrana se lavó varias veces en el mismo tampón de dilución para eliminar el exceso de anticuerpo y, una vez más, en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 para, seguidamente, incubarla durante 1 h, en oscuridad, en solución de *Extravidin*® (avidina conjugada a peroxidasa, Sigma-Aldrich) diluida 1: 2000 en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4.

Para revelar la actividad peroxidasa, se utilizó un kit de revelado con 4-cloro-1 naftol (4CN) como sustrato de la reacción (*Opti-4CN™ Substrate Kit*, ref. 170-8235, Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del proveedor. Preparada la solución de revelado se incubó la membrana durante, al menos, 10 min y se detuvo la reacción con agua destilada cuando se visualizaron las bandas correspondientes a la proteína. Tras varios lavados la membrana se secó al aire y la expresión de cada proteína se cuantificó por densitometría con el programa informático *OptiQuant* v.4.00 (Packard Instruments-Co., Illinois, Estados Unidos).

3.9. Análisis estadístico de los datos y edición de imágenes

El análisis estadístico se realizó con el programa informático *SigmaStat*® versión 3.0 y *Sigma Plot*® 8.0 (Systat Software, Inc., San Jose, California, Estados Unidos). Los datos resultantes de los análisis por inmunocitoquímica e inmunodetección tras transferencia, fueron comprobados con el test de la t de Student, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

Los experimentos in vitro fueron comparados mediante análisis de varianza (ANOVA, del inglés, *Analysis of variance*), considerando una $p < 0,05$ como estadísticamente significativa. Para los estudios de estereología se recurrió a análisis de varianza de Kruskal-Wallis de una sola vía y se compararon por pruebas de contraste a posteriori (*post hoc*).

En cada caso correspondiente el error estándar de la media de cada grupo se calculó dividiendo la desviación típica entre la raíz cuadrada del número de sujetos.

Todas las imágenes se han editado con el programa informático Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, California, Estados Unidos) sin modificar el contenido de la fotografía.

3.9. Anexo I

A1. Generalidades

- Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Merck)	6,90 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Merck)	26,70 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
Ajustar el pH a 7,4 y almacenar a 4 °C.	

- Tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Merck)	1,90 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,43 g
NaCl (Panreac)	7,22 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
Ajustar el pH a 7,4 y almacenar a 4 °C.	

- Tampón Tris-fosfato salino 0,01 M, pH 7,8

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Merck)	1,48 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,48 g
NaCl (Panreac)	7 g
Tris (Hidroximetil) Aminometano (Merck)	5 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
Ajustar el pH a 7,8 y almacenar a 4 °C.	

- Tampón borato pH 8,5

Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (Merck)	50 ml
Solución de HCl (Merck) 0,1 M	15,20 ml
Agua destilada	hasta 1000 ml
Ajustar el pH a 8,5 y almacenar a 4 °C.	

- Tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5.

NaCl (Panreac)	8,76 g
Tris (Hidroximetil) Aminometano (Merck)	6,05 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
Ajustar el pH a 7,5 con HCl 1 M y almacenar a 4 °C.	

- Tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, con levamisol a 2mM

- Tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5.	25 ml
- Solución de levamisol 500mM (*)	100 µl

Ajustar el pH a 7,5 con HCl 1 M y almacenar a 4 °C.

(*) Solución de levamisol 500mM : diluir 1,20g hidrocloreuro de levamisol (Sigma-Aldrich) en 5ml agua destilada.

- Tampón Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M pH 9,5.

NaCl (Panreac)	5,84 g
MgCl ₂ (Panreac)	4,76 g
Tris (Hidroximetil) Aminometano (Merck)	12,10 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
Ajustar el pH a 9,5 con HCl 10 M y almacenar a 4 °C.	

- Preparación de portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina

Se colocaron los portaobjetos limpios y desengrasados en cestillas de plástico y se sumergieron en una solución de Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) al 10 % (v/v) en agua destilada durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se dejaron secar durante 1 h a 60 °C, o bien, durante 24 h a temperatura ambiente.

- Solución de inactivación de la peroxidasa endógena

Para la inactivación de la peroxidasa endógena, los cortes se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno (Merck) al 3 % y metanol (Merck) al 10 % (v/v) en tampón fosfato salino (PBS), durante 15-25 min.

A2. Fijadores

- Mezcla fijadora de Bouin (Chamberlain 1932; Baker 1946)

Para 1000ml: añadir 750 ml de solución saturada de ácido pícrico (Panreac), 250 ml de solución de formaldehído al 35 % (Panreac), y 50 ml de ácido acético (Merck). Filtrar y guardar. La saturación del ácido pícrico es aproximadamente de 13g/L a 20 °C. Se dispone igualmente de preparados comerciales de mezcla fijadora de Bouin (Sigma-Aldrich) compuesto de ácido acético al 5 %, formaldehído al 9 % y ácido pícrico al 0,9 %.

- Paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PAF)

Para 200 ml: disolver 8 g de paraformaldehído (Merck) en 50 ml de agua destilada calentada previamente a 60°C, con agitación. Puede ser necesario añadir 1-2 gotas de NaOH (Panreac) al 2,5% para que se disuelva completamente. Acabado este paso, se filtra y se completa hasta 100 ml con agua destilada, dejando enfriar. Finalmente, se añaden 100 ml de tampón fosfato salino 0,2 M, pH 7,4.

- Paraformaldehído 4%, lisina 0,075 M, Peryodato sódico 0,01 M, pH 7,4 (PLP) (McLean y Nakane, 1974)

Para 200 ml: disolver 8 g de paraformaldehído (Merck) en 50 ml de agua destilada a 60°C, con agitación. Puede ser necesario añadir 1-2 gotas de NaOH (Panreac) al 2,5% para que se disuelva completamente. Filtrar y completar hasta 100 ml con agua destilada, dejando enfriar. Finalmente, se añaden 100 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 en los que se han disuelto previamente 2,74 g de lisina (L-lisina monoclóhidrato, Merck) y 0,428 g de meta-peryodato sódico (NaIO₄; Panreac).

A3. Preparaciones para la hibridación in situ.

- Tampón de hibridación.

Formamida 100% desionizada (Sigma-Aldrich)	5 ml
SSC 20X	2,5 ml
ARN de levadura (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich)	50 µl
Solución de SDS al 20%	500 µl
Heparina (Sigma) (5000 U/ml = 156,25mg/ml)	3,2 µl
Agua destilada estéril	2 ml

- SSC 20X

NaCl (Sigma-Aldrich)	175,3 g
Citrato sódico (Sigma-Aldrich)	88.2 g
Agua destilada	800 ml
Ajustar pH hasta 7.5 con HCl 1N o NaOH 10N, según el caso. Esterilizar en autoclave.	

- ARN de levadura 10 mg/ml

Disolver ARN de levadura (Sigma-Aldrich) a concentración de 10 mg/ml en agua destilada estéril. Alicuotar y guardar a -20°C.

- **SDS 20%**. Añadir 20 g de SDS (Sigma-Aldrich, grado electroforesis) completando con agua destilada hasta 100 ml. Calentar a 68°C para diluir. No ajustar pH. No autoclavar.

- Solución I

Formamida 100% desionizada (Sigma-Aldrich)	50 ml
SSC 20X	25 ml
SDS 20 %	5 ml
agua destilada	20 ml

- Solución II

NaCl 5M	10 ml
Tris-HCl 1 M pH7,5	1ml
Tween® 20 (Sigma-Aldrich)	100 ml
agua destilada	88,9 ml

- Solución III

Formamida 100% desionizada (Sigma-Aldrich)	50 ml
SSC 20X pH 7,5	10 ml
agua destilada	40 ml

- Tampón Tris salino con Tween® 20 20X

NaCl	80 g
ClK	2 g
Tris-HCl 1M pH7,5	250 ml
Tween® 20 (Sigma-Aldrich)	10 ml
Agua destilada	500 ml

- Tampón Tris salino con Tween® 20 1X - levamisol

Tampón Tris salino con Tween® 20 20X	5 ml (1X).
Levamisol	0,050g (2mM).
Agua destilada	hasta 100ml.

- NTMT-levamisol

NaCl 5 M	2 ml (100 mM)
Tris-HCl 1 M	10 ml (100 mM)
Cl ₂ Mg	5 ml (50 mM)
Tween® 20 (Sigma-Aldrich)	100 µl (0.1%)
Levamisol	0,050 g (2mM)
Agua destilada	hasta 100 ml

- **Stock de 50 mg/ml BCIP**: añadir 0,050 g de BCIP (Roche) en 1 ml de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) al 100%. Almacenar a 4°C.

- **Stock de 75 mg/ml NBT**: añadir 0,075 g de NBT (Roche) en 1 ml de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) al 70%. Almacenar a 4°C.

- **Stock ARNsA a 50mg/ml**: disolver 100 mg de ARNsA en 2 ml de agua y añadir 20 µl Tris HCl (10 mM) y 6µl NaCl 5M (15mM).

- Medio de montaje glicerina-gelatina

Disolver 7 g de gelatina en hojas (Sigma-Aldrich) en 42 ml de agua destilada caliente durante 2 h. Después añadir 50 g de glicerina (Sigma-Aldrich) y 0.5 ml de fenol (Sigma-Aldrich). Se calienta la mezcla hasta disolución al baño María. Guardar a 4°C. Para montar cortes meter la solución al baño a 65°C unos minutos antes y a continuación montar.

4. RESULTADOS

4.1. Fenotipo de los ratones *Málaga* nulos para LPA₁

Como previamente hemos detallado, la variedad *Málaga* de ratones nulos para el receptor LPA₁ se obtuvo de manera espontánea, a partir de la expansión natural y por retrocruzamiento de la colonia original descrita por Contos et ál. (2000). Expandidos durante numerosas generaciones, son estables, viables, y portan la misma delección del exón 3 del receptor que sus predecesores (Estivill-Torrús et ál., 2008). El análisis de segregación de la delección del gen en la progenie de una misma camada, medido en diferentes camadas y mediante genotipado basado en la reacción en cadena de la polimerasa, demostró que la variedad *Málaga* nula para LPA₁ guardaba los principios mendelianos de proporción de individuos homocigotos de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)], heterocigoto [*maLpar1*^(+/-)] y de homocigoto *maLPA*₁-nulos o nulos para *Lpar1* [*maLpar1*^(-/-)] (Tabla 2).

	Progenie resultante			
	Observado en etapa embrionaria (E14.5 – E18.5)			esperado
Parental	(+ / +)	(+ / -)	(- / -)	(- / -)
+ / + × + / -	35 (49 %)	37 (51 %)	0 (0 %)	0
+ / - × + / -	21 (26 %)	41 (51 %)	19 (23 %)	21
+ / - × - / -	0 (0 %)	36 (52 %)	33 (48 %)	36
	Observado tras destete (P21)			esperado
Parental	(+ / +)	(+ / -)	(- / -)	(- / -)
+ / + × + / -	191 (49 %)	198 (51 %)	0 (0 %)	0
+ / - × + / -	80 (28 %)	141 (50 %)	61 (22 %)	70
+ / - × - / -	0 (0 %)	193 (55 %)	159 (45 %)	193
Proporción de sexo (hembra:macho)	131:140	254:278	99:121	

Tabla 2. Análisis del genotipado de la camada de ratones *maLPA*₁-nulos según el genotipo específico parental. Se expresa el número de individuos totales, todos ellos obtenidos cada vez de una misma camada y el porcentaje correspondiente. Los resultados son representativos de diferentes camadas analizadas, todas con similar tendencia, mostrando únicamente una ligera pérdida de animales nulos tras nacimiento.

Como ha sido mencionado, entre los rasgos más llamativos de la cepa original nula para el receptor LPA₁ descrita por Contos et ál. (2000) destacan la marcada mortalidad en los neonatos, aproximadamente del 50 %, y su incapacidad para amamantar correctamente. Una de las primeras características destacadas observadas en la variedad *Málaga*, a diferencia de la cepa original, fue la ausencia de defectos en el amamantamiento y el aumento de la tasa de supervivencia, cercana al 95 %, que les permite alcanzar la edad adulta, siendo fértiles y con capacidad de reproducirse.

De acuerdo a lo que también se observaba en la cepa original, los ratones nulos para el receptor LPA₁, tanto machos como hembras, presentaron un menor peso, tanto en la edad adulta como en estadios embrionarios (Fig. 26), siendo el peso de los ejemplares *maLPA₁*-nulos significativamente menor que el observado en los genotipos salvaje y heterocigoto. Los animales nulos también mostraron un menor tamaño, detectable desde estadios embrionarios, y marcadamente diferente en adultos (Fig. 27). No se observaron diferencias significativas entre los pesos de los individuos salvajes y de los heterocigotos.

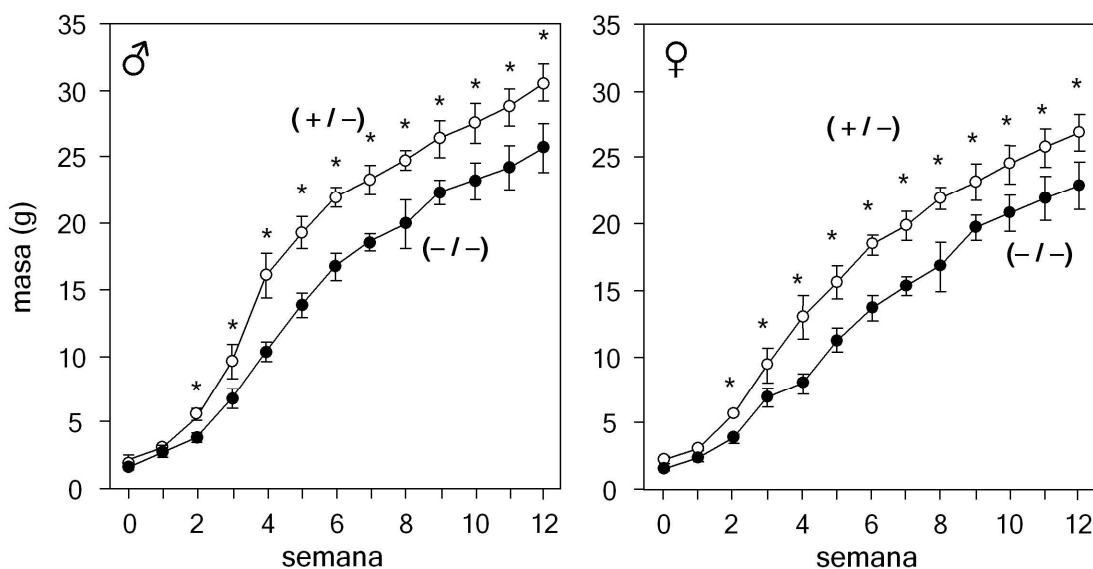


Figura 26. Reducción de masa corporal en ausencia del receptor LPA₁ en los ratones *maLPA₁*-nulos. Masa corporal, desde su nacimiento hasta edad adulta, a 12 semanas de edad, en ratones macho (izquierda) y hembra (derecha) normales [*maLpar1*^(+/+)], heterocigotos [*maLpar1*^(+/-)] (círculo vacío, o) y nulos homocigotos [*maLpar1*^(-/-)] (círculo relleno, ●). Datos comparados de individuos de una misma camada provenientes de cruces de padres heterocigotos [*maLpar1*^(+/-) × *maLpar1*^(+/-)]. Los datos de los ejemplares normales y los heterocigotos se solaparon por lo que no son mostrados para una mayor claridad. (*) p=0,05, (n=14).

Además del menor peso y tamaño, todos los ejemplares nulos de la variedad *Málaga*, como en la cepa original (Contos et ál., 2000) presentaron un dimorfismo craneal característico, consistente en la presencia de un hocico reducido y una mayor distancia entre los ojos (Fig. 27). Este fenotipo fue, y es, reproducible en la totalidad de ejemplares nulos homocigotos de nuestra colonia. No se observaron otras alteraciones destacables en la anatomía externa de los animales o en su comportamiento general (alimentación, vigilia-sueño). A pesar de que el reconocimiento fenotípico de los ejemplares nulos era sencillo, cada ejemplar del estudio fue genotipado de igual manera para confirmar su genotipo.

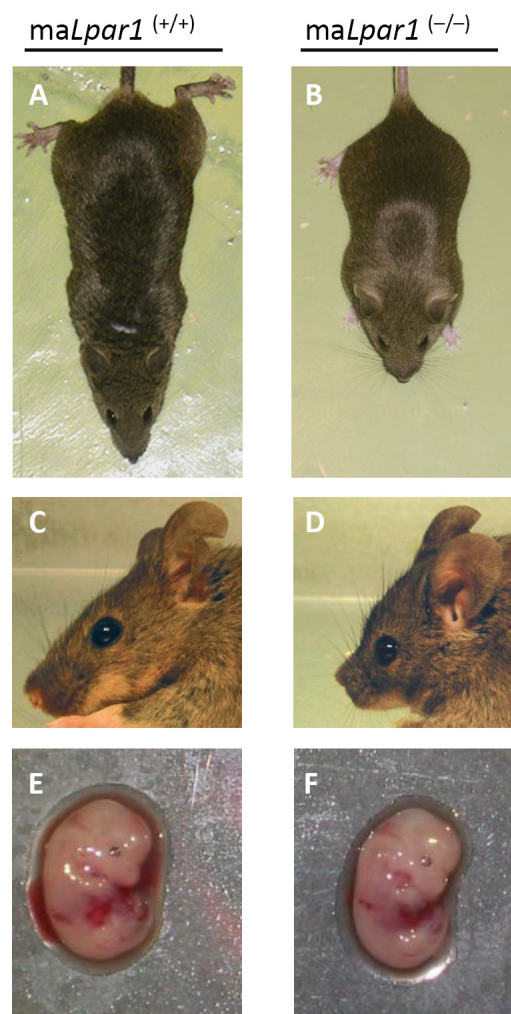


Figura 27. Reducción de tamaño corporal en los ratones *maLPA₁*-nulos. Fotografías de ejemplares de ratones adultos, machos, de 12 semanas de edad (A - D) y embriones en estadio E14.5 (E, F), de genotipos normal [*maLpar1*^(+/+)] (A, C, E) y nulo homocigotos [*maLpar1*^(-/-)] (B, D, F). Obsérvese el dimorfismo craneal característico en los individuos nulos, presentando un hocico más corto y unos ojos más espaciados entre sí. El menor tamaño y peso corporal de los animales carentes del receptor funcional frente a los de genotipo salvaje es patente. Datos comparados de individuos de una misma camada provenientes de cruces de padres heterocigotos [*maLpar1*^(+/-) × *maLpar1*^(+/-)].

Los ratones de la cepa original descrita por Contos et ál. (2000) mostraban una acusada letalidad perinatal, con una supervivencia postnatal de tan sólo un 50%. Según estos autores, la alta mortalidad podría ser consecuencia de una atrofia en el desarrollo de las capacidades olfatorias lo que impediría un correcto amamantamiento de las crías que, de hecho, era claramente observable en sus ejemplares. En el caso de la variedad Málaga los animales no mostraron la misma mortalidad perinatal.

La observación directa de la camada por parte de diferentes observadores mostró siempre que, aparentemente, no había dificultad alguna apreciable a la hora del amamantamiento (Fig. 28 A). Para comprobar si efectivamente era así, que no existían problemas durante la lactancia, o bien si un posible defecto de la toma de leche podría ser parte de la razón de un desarrollo deficiente y de las diferencias de tamaño y peso observadas posteriormente, se realizó un análisis de la cantidad de leche ingerida en ratones de tres días de edad (P3) de acuerdo a Contos et ál. (2000), clasificando las crías según la cantidad de leche observada en el estómago de los lactantes, (-) en caso de ausencia de leche, (+) con medio estómago lleno, (++) en caso de estómago lleno (Fig. 28 B, C). Los resultados mostraron que el genotipo no era determinante, es decir, no existían diferencias significativas entre individuos de los diferentes genotipos (Fig. 28 C, D) y, de manera predominante, las crías mostraban el estómago con el mayor contenido de leche, demostrando una lactancia normal y, de manera notable, una diferencia sustancial en la variedad *Málaga* respecto a los déficits descritos en la cepa original.

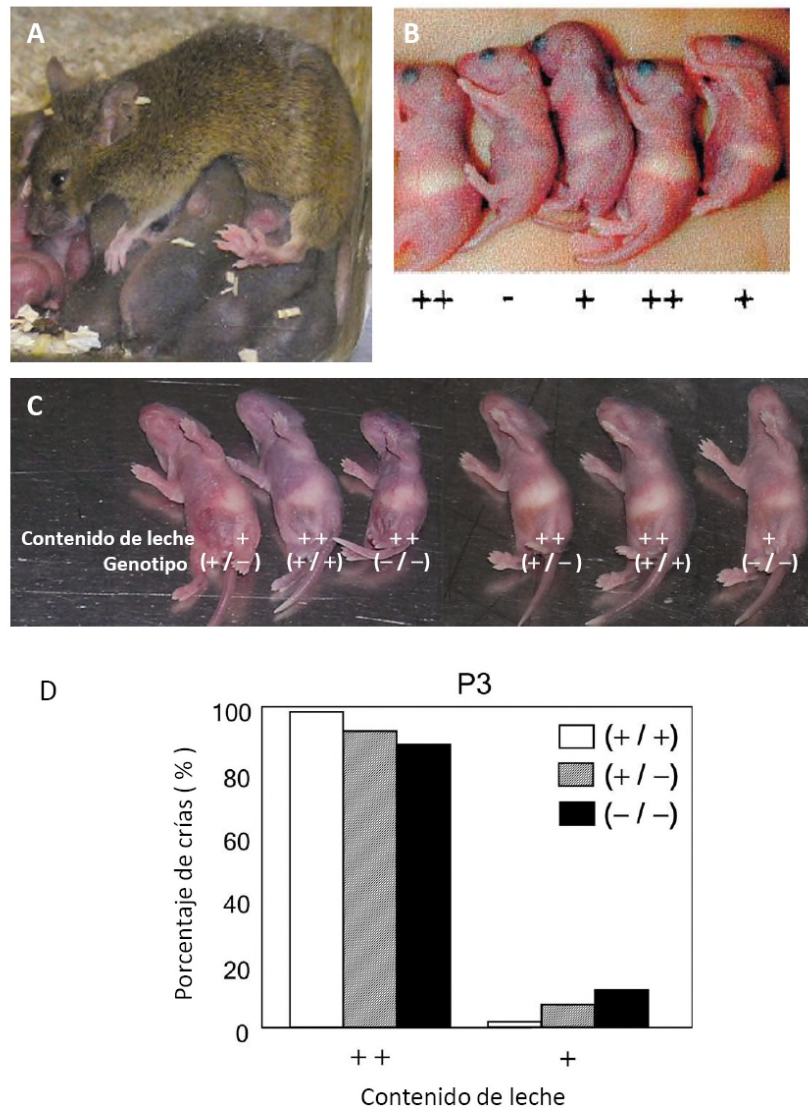


Figura 28. Ausencia de defectos de amamantamiento en los ratones *malLPA₁*-nulos. (A) Camada de ratones procedentes de cruces de padres heterocigotos [*malLpar1*^(+/-) × *malLpar1*^(+/-)] mostrando un comportamiento lactante normal. (B) Imagen tomada de Contos et ál. (2000) mostrando los tipos representativos de comportamiento de lactancia según el contenido de leche en estómago. (C) Fotografías de ejemplares de crías de ratones de la variedad *Málaga*, a edad postnatal P3, clasificados de manera similar y genotipo correspondiente. (D) Porcentaje de individuos a P3 para cada genotipo de la variedad *Málaga*, que muestran cantidad máxima (++) y media (+) de leche ingerida. No se observó ninguna cría sin presencia de leche en el estómago. Los datos mostraron que no había diferencias entre los diferentes genotipos, mostrando los ratones normales (+ / +), heterocigotos (+ / -), y homocigotos (- / -), un comportamiento similar, sin defectos de lactancia atribuibles a la ausencia del receptor. (n=26).

4.2. Características generales del cerebro de los ratones *Málaga* nulos para LPA₁

4.2.1. Anatomía del encéfalo en ausencia del receptor LPA₁

Tras la observación del fenotipo externo, se estudiaron las características anatómicas del encéfalo de los animales nulos en comparación con los individuos salvajes. La disección del cerebro de ratones adultos de doce semanas de edad permitió observar que el encéfalo de los animales *maLPA₁*-nulos era de menor tamaño y presentaba, al igual que la cepa original (Contos et ál., 2000) una evidente reducción del tamaño del bulbo olfatorio (Fig. 29 A, B) en comparación con los ejemplares salvajes. El cerebro de los ratones *Málaga* nulos para LPA₁ mostró un peso menor que los individuos heterocigotos y los normales y también fue ligeramente menor el peso del cerebro de los ratones heterocigotos respecto a los normales (Fig. 29 C). En los ratones nulos se pudo apreciar, al mismo tiempo, un redondeamiento y disminución del tamaño de las vesículas telencefálicas, que aparentaban ser más globosas y compactas, y alguna diferencia en otras regiones, como el cerebelo, que presentaba también un tamaño reducido respecto al del ratón normal (Fig. 29 A, B), si bien, otras estructuras subcorticales como el tronco cerebral parecían no estar afectadas.

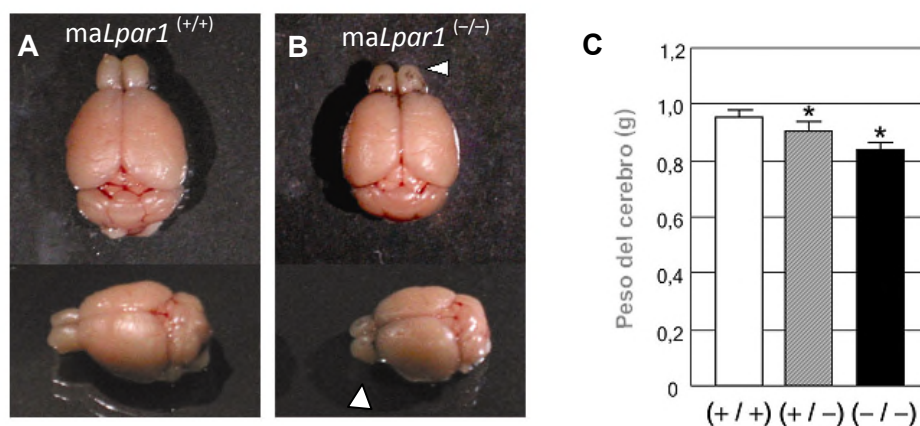


Figura 29. Anatomía y peso del cerebro en la variedad *Málaga* nula para LPA₁. (A, B) Anatomía de los encéfalos de ratones adultos de genotipo salvaje y nulo para LPA₁. Imágenes representativas dorsal y lateral de los cerebros de ratones *maLpar1*^(+/+) (A) y *maLpar1*^(-/-) (B). Nótese la disminución del tamaño global y en particular del bulbo olfatorio en los ejemplares mutantes (punta de flecha). C, Estudio comparativo del peso del cerebro en ratones adultos normales (+/+), heterocigotos (+/-), y homocigotos (-/-). La ausencia del receptor se asoció a un menor peso del encéfalo (*) p = 0,05, (n=14).

A nivel histológico, y a diferencia de la cepa original, los ratones *maLPA₁*-nulos mostraban alteraciones no descritas hasta entonces en un animal carente del receptor LPA₁. De igual manera a lo observado en adultos, a pocos días antes de nacer, en estadio de E18.5, eran fácilmente distinguibles los ratones normales de los nulos para el receptor por el aspecto general del cerebro y del hocico (Fig. 30 A, B). A esa edad ya se podía detectar una ligera reducción del tamaño del cerebro y del grosor de la pared cortical (Fig. 30 C, D).

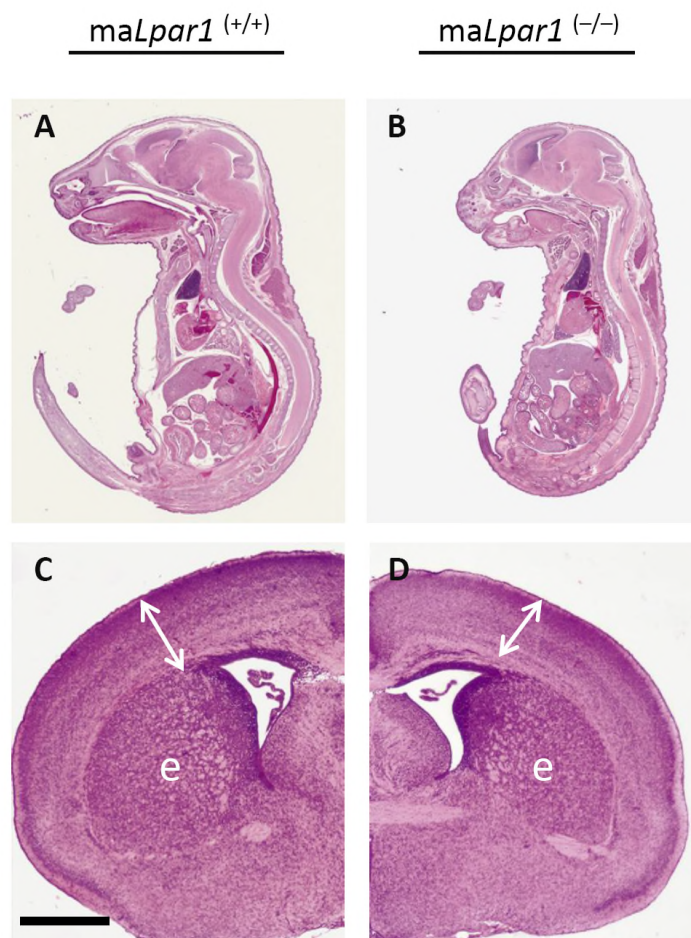


Figura 30. Histología general y de la corteza cerebral de los ratones Málaga nulos para LPA₁. (A, B) Cortes sagitales de embriones completos en E18.5 de ratones normales (A) y *maLPA₁*-nulos (B), teñidos con hematoxilina-eosina en los que se puede apreciar el menor tamaño del embrión, así como del telencéfalo y todas las estructuras más rostrales. No se apreciaron anomalías significativas en órganos internos. (C, D) Tinción de hematoxilina-eosina en cortes coronales, a nivel medio del telencéfalo, en embriones de la misma edad. Además de mostrar un menor grosor de la corteza cerebral, los ratones *maLPA₁*-nulos también presentaban el estriado (e) algo más reducido de tamaño. Escala en (C, D), 600 μ m.

Dos días más tarde, tras nacimiento, a P0, cuando la formación de las seis capas corticales permite ya su distinción, la ausencia del receptor LPA₁ en la variedad nula Málaga se podía

observar asociada a la presencia de una corteza cerebral de aspecto más condensado, con una mayor desorganización en la citoarquitectura de las capas corticales, siendo más difícil discernir un límite claro entre ellas, al igual que observamos en estadios previos (no mostrado). Las capas corticales de los animales nulos, además, estaban más reducidas de grosor y con, aparentemente, alteraciones de densidad celular, especialmente en las más profundas (Fig. 31). En algunos casos se pudieron observar alteraciones de la superficie cortical (flecha en Figura 31).

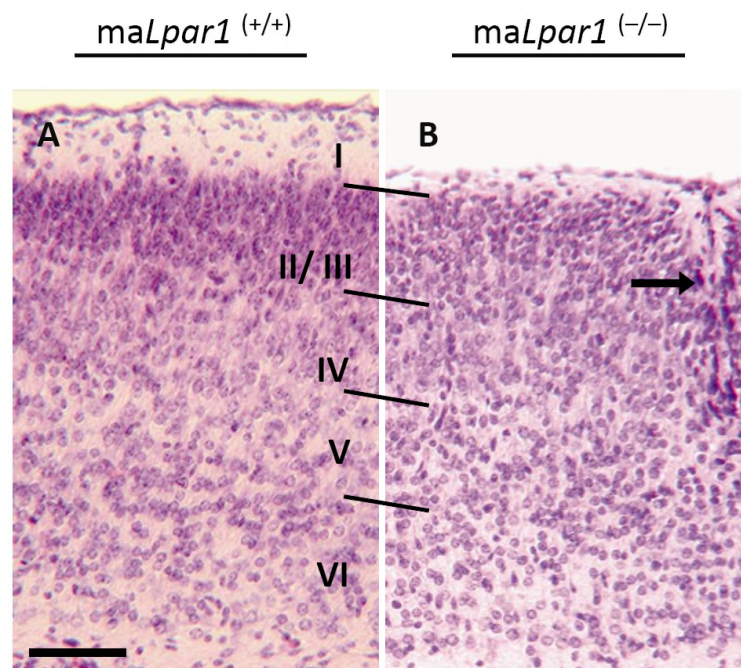


Figura 31. Corteza cerebral de ratones Málaga nulos para LPA₁ en edad P0. Secciones coronales de del telencéfalo de ratones normales (A) y malLPA₁-nulos (B) a edad P0, teñidos con hematoxilina-eosina. Se indican, en números romanos, las seis capas corticales de la corteza para ambos genotipos, deducidas de acuerdo a tamaño celular y densidad. En el caso de los animales nulos para LPA₁ hay una reducción considerable de la capa I y no se definen de manera clara los límites de las capas más profundas. La flecha, en (B), muestra una alteración cortical. Barra de escala (A, B), 100 μ m.

4.2.2. Expresión del receptor LPA₁ en el encéfalo de los ratones malLPA₁-nulos

Hasta la fecha de la obtención de la variedad Málaga la única caracterización realizada a nivel de sistema nervioso en un modelo animal de ausencia del receptor LPA₁ fue la descrita en el trabajo de Contos et ál. (2000). Buena parte de los defectos observados fueron atribuidos por estos autores a las alteraciones del sistema olfatorio, habida cuenta de que la expresión del receptor LPA₁ se había identificado previamente y, de manera destacada, en el desarrollo,

en la zona ventricular de la corteza cerebral y en el bulbo olfatorio (Hecht et ál., 1996; Weiner et ál., 1998). Previo a la caracterización de los procesos relacionados con la neurogénesis se analizó la expresión del receptor por hibridación in situ y, como forma de control, mediante inmunohistoquímica, en ambos genotipos, normal, y nulo, de la variedad *Málaga*, a estadios embrionarios correspondientes a los inicios de la neurogénesis. La hibridación in situ corroboró los estudios previos, mostrando que, durante el desarrollo cerebral, la expresión de *Lpar1* está claramente localizada en la zona ventricular (Fig. 32 A, D). Por otra parte, el estudio mediante inmunohistoquímica, permitió, de una parte, confirmar la presencia del receptor en la misma región y, a su vez, demostrar, confirmando los resultados del genotipado (ver sección 3.2.), la ausencia del mismo en los ratones *malPA₁*-nulos (Fig. 32 C, F).

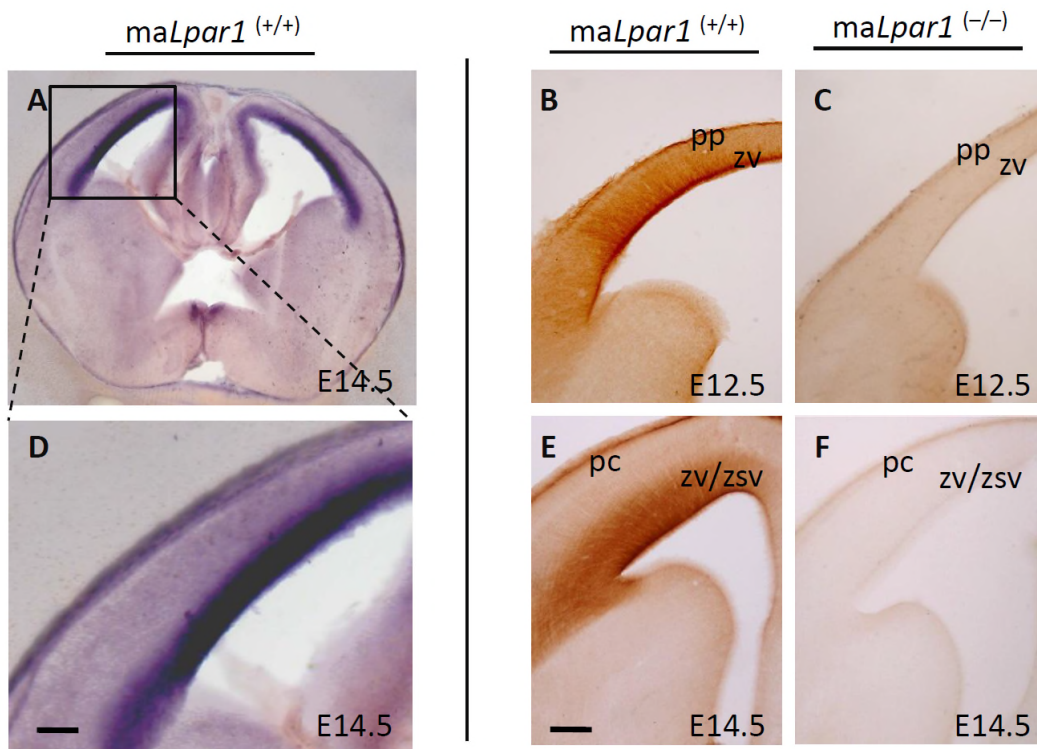


Figura 32. Detección del receptor LPA₁ en la zona ventricular durante el desarrollo. (A, D) Hibridación in situ para el gen *Lpar1* en criosecciones coronales de embriones de ratones normales *malLpar1*^(+/+) a estadio E14.5 mostrando la localización de su expresión en la región de la zona ventricular. (B, C, E, F) Inmunodetección del receptor LPA₁ en secciones de parafina de embriones normales *malLpar1*^(+/+) (B, E) y nulos *malLpar1*^(-/-) (C, F) a estadios E12.5 y E14.5. La expresión del receptor parece confinada a zonas proliferativas neurogénicas (ZV / ZSV). En los animales nulos para el receptor no se detectó nivel alguno del mismo. pc, placa cortical; pp, preplaca; zv, zona ventricular; zv/zsv, ventricular/ zona subventricular. Barra de escala en (A), 700 μ m; (B, C), 450 μ m; (D-F) E14.5), 150 μ m

4.3. Análisis de la zona proliferativa cortical en los ratones *Málaga* nulos para LPA₁

4.3.1. Alteración del patrón de proliferación y diferenciación cortical en ausencia del receptor LPA₁.

Durante el desarrollo cerebral la expresión del receptor LPA₁ está enriquecida en la zona ventricular (VZ), de manera sincronizada con el período neurogénico (Hecht et ál., 1996; y presentes observaciones). Además, son numerosos los estudios que han mostrado respuesta a la señalización mediada por LPA por parte de los precursores corticales (Hecht et ál., 1996; Fukushima et ál., 2000; Kingsbury et ál., 2003; Fukushima et ál., 2004; Dubin et ál., 2010; Herr et ál., 2011; Yung et ál., 2011). Para determinar si los defectos citados anteriormente implicaban deficiencias en el patrón normal de proliferación por parte de los progenitores neurales de la zona ventricular (ZV) y subventricular (ZSV) se analizaron parámetros específicos que permitieron valorar la neurogénesis cortical en diferentes estadios embrionarios. Dado que, en ratones, los procesos asociados a la producción de las neuronas de la corteza cerebral ocurren entre los días E11.5 y E17.5 del desarrollo (Angevine y Sidman, 1961; Gillies y Price, 1993; Caviness et ál., 1995; Takahashi et al. 1995; Miyama et ál., 1997; Price et ál., 1997) se eligieron los estadios E11.5, E14.5, E16.5 para su estudio.

Para el estudio de la proliferación cortical se recurrió al análisis de la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) uno de los marcadores más comunes a la hora de identificar células en división y que se expresa en las células progenitoras neurales que se encuentran dividiéndose continuamente en la zona ventricular (Ino y Chiba, 2000), así como al de la expresión de la tubulina de clase III (β -III tubulina), específica de neuronas y que diferencia poblaciones neuronales postmitóticas (Menezes y Luskin, 1994).

Durante la neurogénesis cortical temprana, en estadio E11.5, la pared ventricular está compuesta casi exclusivamente de células progenitoras neurales que expresan, son positivas para, PCNA y que constituyen la ZV, germinativa (Fig. 33 A, G). Las neuronas, conforme maduran tras su salida de ciclo, alcanzan el nivel más superior, para formar la preplaca inicial, una delgada capa formada por células y fibras orientadas tangencialmente (Fig. 33 B, J). En este estadio, los embriones de genotipo nulo *maLpar1*^(-/-) mostraron una ligera reducción de expresión de PCNA (Fig. 33 E, I), mostrando una región proliferante ligeramente reducida respecto a los normales (Fig. 33 A, G). De manera llamativa, los animales nulos presentaron

una expresión ectópica y prematura de β -III tubulina en la ZV incluso en células localizadas en la superficie más próxima al ventrículo (Fig. 33 F, L; flechas), indicativos de una maduración neuronal temprana antes de haber alcanzado su emplazamiento definitivo. Los individuos heterocigotos presentaron también dichas alteraciones aunque en menor grado (Fig. 33 C, D, H, K)

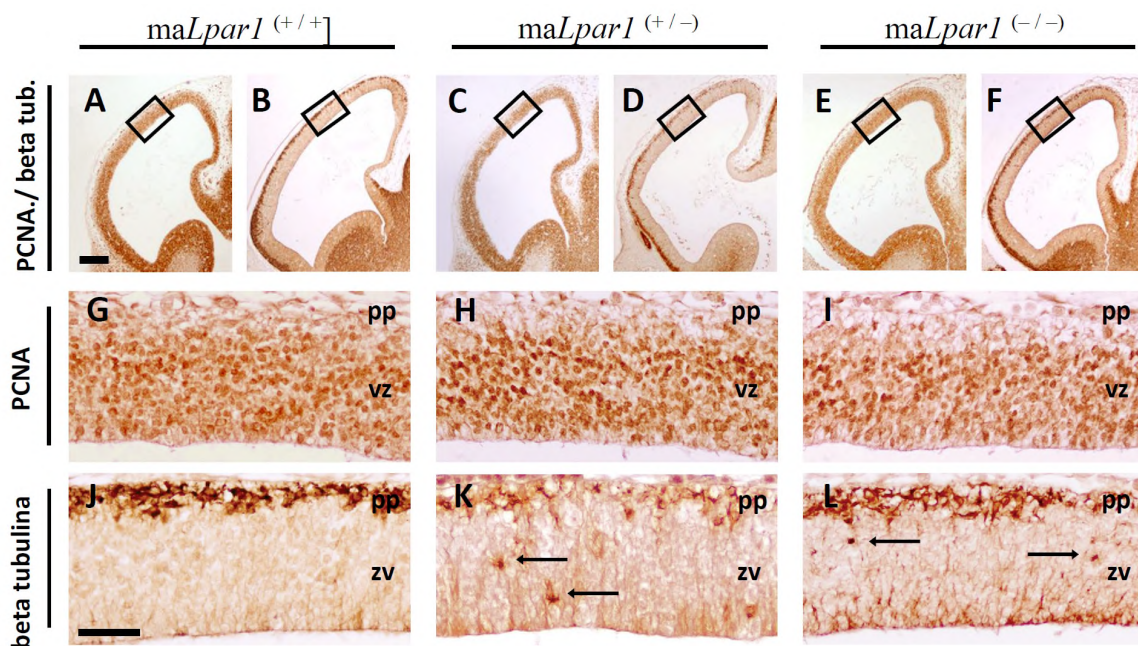


Figura 33. Patrón proliferativo y postmitótico cortical en estadio E11.5 para ratones Málaga normales, heterocigotos y nulos para LPA₁. Expresión de PCNA (A, C, E, G-I) y β -III tubulina (B, D, F, J-L) en secciones coronales (A-F; ampliados x10 los recuadros en G-L) del telencéfalo de embriones en el estadio E11.5 de animales de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A, B, G, J), y de genotipo heterocigoto [*maLpar1*^(+/-)] (C, D, H, K) u homocigoto [*maLpar1*^(-/-)] (E, F, J, L). pp, preplaca; zv, zona ventricular. Barra de escala en (A-F), 250 μ m; (G-L), 55 μ m.

En el estadio E14.5 la corteza embrionaria en desarrollo ya posee una arquitectura cortical que comprende dos capas proliferativas: la zona ventricular (ZV) y la zona subventricular (ZSV), una primitiva zona intermedia (ZI) con migración radial de neuronas y una placa cortical (PC) con neuronas en diferenciación y conexiones tanto aferentes como eferentes de la corteza embrionaria. De manera similar a lo observado en E11.5, la corteza del ratón de genotipo normal mostró una pared cortical claramente diferenciada en una capa germinativa (ZV/ZSV) de progenitores neurales con expresión de PCNA (Fig. 34 A, G) y una segunda capa (ZI/ PC), por encima de esta, constituida por células postmitóticas inmunorreactivas a β -III tubulina (Fig. 34 B, J). En el animal nulo para LPA₁ se observó una clara reducción de la zona proliferativa

inmunorreactiva a PCNA que llega a presentar casi la mitad de su grosor normal (Fig. 34 E, I) correlacionada con un aumento muy significativo y proporcional de la capa de células con expresión prematura de β -III tubulina así como del número de células con expresión de dicho marcador neuronal (flecha en Figura L) en la presunta área germinativa (ZV/ZSV)(Fig. 34 F, L). Además, se pudo observar numerosas fibras de células con expresión de β -III tubulina con orientación ordenada y paralela a la superficie ventricular (punta de flecha en Figura L). Los ratones de genotipo heterocigoto mostraron un patrón proliferativo gradual e intermedio entre lo observado en ratones normales y nulos (Fig. 34 C, H), igualmente correlacionado con la expresión de β -III tubulina (Fig. D, K). También el animal heterocigoto mostró células postmitóticas con fibras ordenadas y paralelas a la superficie ventricular (punta de flecha en Figura 34 K) y expresión ectópica de β -III tubulina en la zona germinativa (flecha en Figura 34 K).

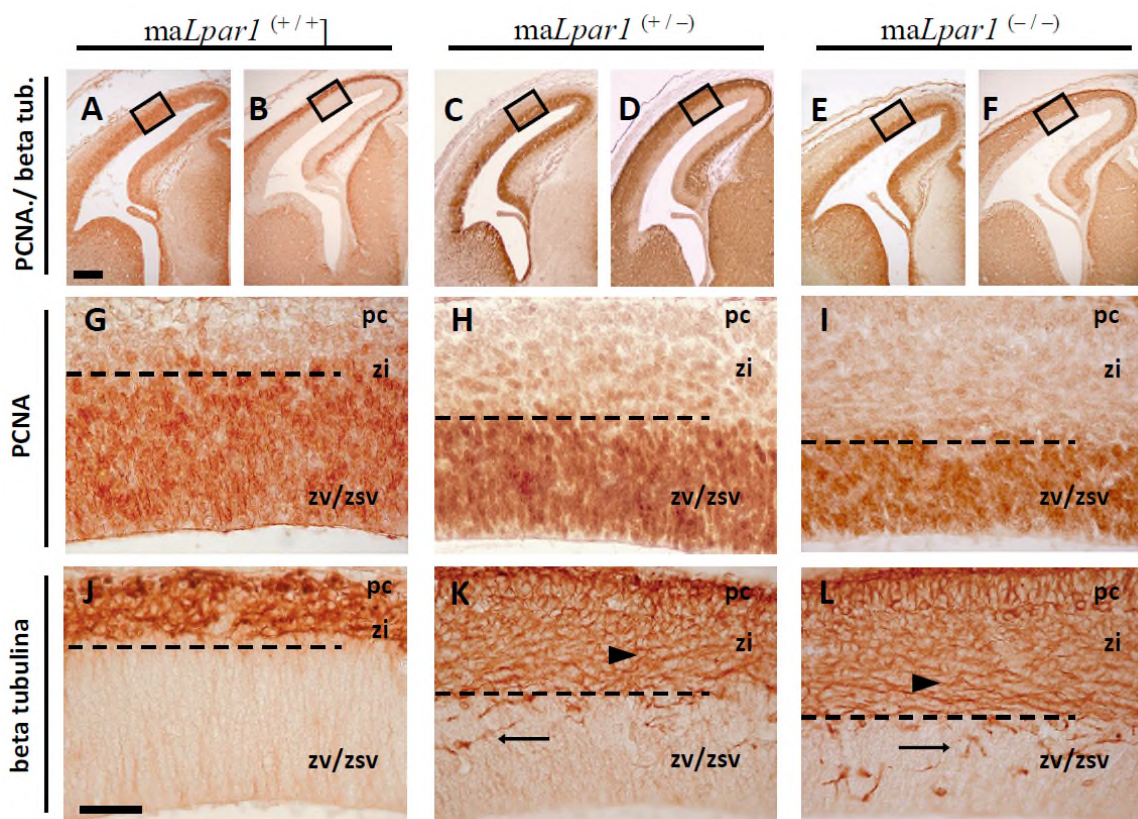


Figura 34. Patrón proliferativo y postmitótico cortical en estadio E14.5 para ratones Málaga normales, heterocigotos y nulos para LPA_1 . Expresión de PCNA (A, C, E, G-I) y β -III tubulina (B, D, F, J-L) en secciones coronales (A-F; ampliados x10 los recuadros en G-L) del telencéfalo de embriones en el estadio E14.5 de animales de genotipo normal [$maLpar1^{+/+}$] (A, B, G, J), y de genotipo heterocigoto [$maLpar1^{+/-}$] (C, D, H, K) u homocigoto [$maLpar1^{-/-}$] (E, F, J, L). pc, placa cortical; zi, zona intermedia; zv/zsv, ventricular/ zona subventricular. Barra de escala en (A-F), 300 μ m; (G-L), 65 μ m.

El estadio E16.5 del ratón representa ya una fase muy avanzada de neurogénesis cortical en el ratón (Takahashi et ál., 1995; Miyama et ál., 1997). Al observar, de manera similar, el marcaje para los antígenos citados, no se encontraron diferencias tan evidentes como en los estadios anteriores, siendo, las variaciones en el patrón de expresión de PCNA y β -III tubulina entre los diferentes genotipos muy sutiles, apenas identificables en el caso de los individuos heterocigotos (Fig. 35).

El anticuerpo contra PCNA mostró un grosor de ZV / ZSV similar para los genotipos estudiados (Fig. 35 A, C, E, G). Sin embargo, sí que se observaron diferencias en un área que presenta una actividad neurogénica activa en este período, el bulbo olfatorio, con una reducción en el grosor de la capa proliferativa ventricular ZV de los ratones nulos para LPA₁ respecto a los normales (Fig. 35 I-L). Esta variación en el bulbo olfatorio es realmente interesante. A pesar de ello, nuestro estudio se ha centrado en la neurogénesis cortical, no en el bulbo olfatorio. El hecho de que existieran mayores diferencias en estadios E11.5 y E14.5 respecto a E16.5 sugiere alteraciones específicas en los períodos en los que la neurogénesis es muy activa.

De manera análoga, el marcaje con β -III tubulina mostró menos diferencias en este estadio (Fig. 35 B, D, F, H). Aun así, en los embriones nulos continuó observándose un mayor número de células con expresión de β -III tubulina próximas a la luz del ventrículo en comparación con los embriones normales (flecha en Figura 35 H). También se observa una mayor laxitud en la capa neuronal más externa y, en la zona intermedia, las fibras positivas paralelas al ventrículo se encuentran más desorganizadas que respecto a las del ratón normal (punta de flecha en Figura 35 F, H). En estadios posteriores a E16.5, tales como E18.5 ó P0, la mayor parte de la neurogénesis se ha completado y el análisis de las capas proliferativas y de la distribución de las neuronas, no aportó nuevos datos discutibles en nuestro estudio (no mostrado).

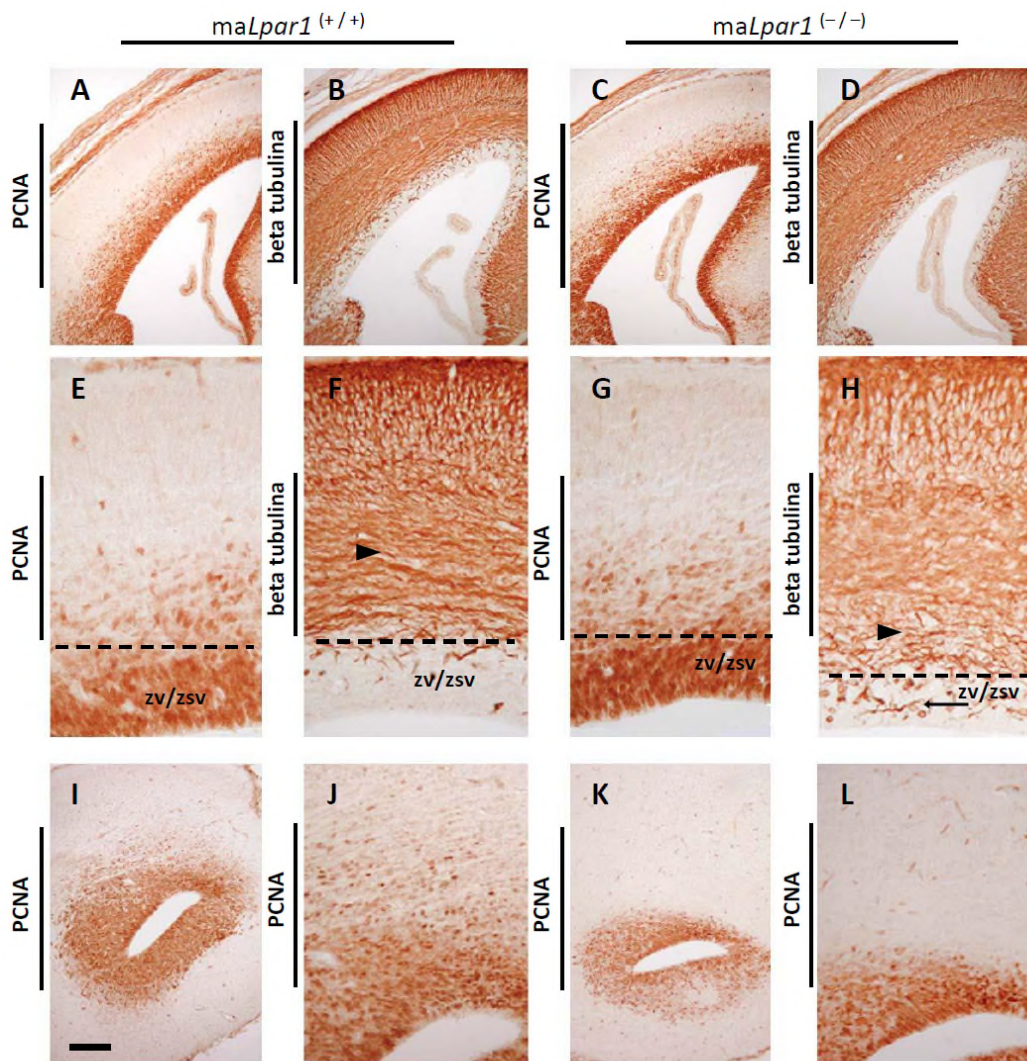


Figura 35. Patrón proliferativo y postmitótico cortical en estadio E16.5 para ratones Málaga normales y nulos para LPA₁. Expresión de PCNA (A, C, E, G, I-L) y β -III tubulina (B, D, F, H) en secciones coronales del telencéfalo a nivel medio (A-D; ampliados x2 en E-H) y del bulbo olfatorio (I, K, ampliados x2 en J, L) de embriones en el estadio E16.5 de animales de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A, B, E, F, I, J), y de genotipo nulo homocigoto [*maLpar1*^(-/-)] (C, D, G, H, K, L). zv/zsv, ventricular/ zona subventricular. Barra de escala en (A-D), 300 μ m; (E-H), 150 μ m; (I, K), 250 μ m; (J, L), 125 μ m.

Considerando las anomalías en el patrón de expresión de PCNA en ausencia del receptor LPA₁, especialmente en los estadios iniciales, que sugerían una pérdida de identidad de células precursoras en beneficio de una mayor proporción de células diferenciadas, se optó por comprobar si los procesos de división tenían lugar correctamente y si la reducción de expresión de PCNA se correlacionaba con alteraciones de mitosis. A nivel histológico y, con el objetivo de estudiar el número de células que se encuentran, en un momento dado, en mitosis en las regiones proliferantes, se recurrió al estudio de expresión de la forma fosforilada de la proteína Histona H3, que marca núcleos que se encuentran en la fase mitótica de

condensación del material genético, desde G2 hasta el momento preciso de la división mitótica, siendo su mayor expresión en metafase (Hendzel et ál., 1997). Se seleccionó el estadio E14.5 como el más representativo para estudiar el patrón de células positivas a Histona H3 fosforilada. Las imágenes demostraron, una vez más, que la ausencia del receptor LPA₁ se correlacionaba con una disminución del potencial proliferativo durante la neurogénesis, disminuyendo el número de células positivas al marcador a nivel de la superficie ventricular (Fig. 36). Es a nivel apical donde tienen lugar las mitosis en un correcto patrón de migración nuclear intercinética (Hollyday, 2001; Miyata et ál. 2004; Miyata, 2008) y así, es importante hacerlo notar, se pudo observar en ambos genotipos, no concurriendo ninguna división ectópica dentro de la ZV en ausencia del receptor LPA₁ (Fig.36 B, D, G) y limitándose el defecto al número de procesos de división en un momento dado.

La cuantificación de las células arrojó cifras con una reducción significativa de hasta un 32% del número de células en mitosis apicales en la ZV de los animales nulos para LPA₁ respecto a los normales (Fig. 36 H) y que se correlacionaban, de manera lógica, con la reducción de expresión de PCNA observada. Los individuos heterocigotos, de nuevo, mostraron un patrón intermedio, entre ambos genotipos. Además, el análisis de las mitosis localizadas en la ZSV, a nivel apoventricular, demostró, de igual manera, que dichas divisiones, aún cuando se presenten en menor medida, seguían reducidas significativamente en heterocigotos y nulos homocigotos respecto a los individuos normales (Fig. 36 H)

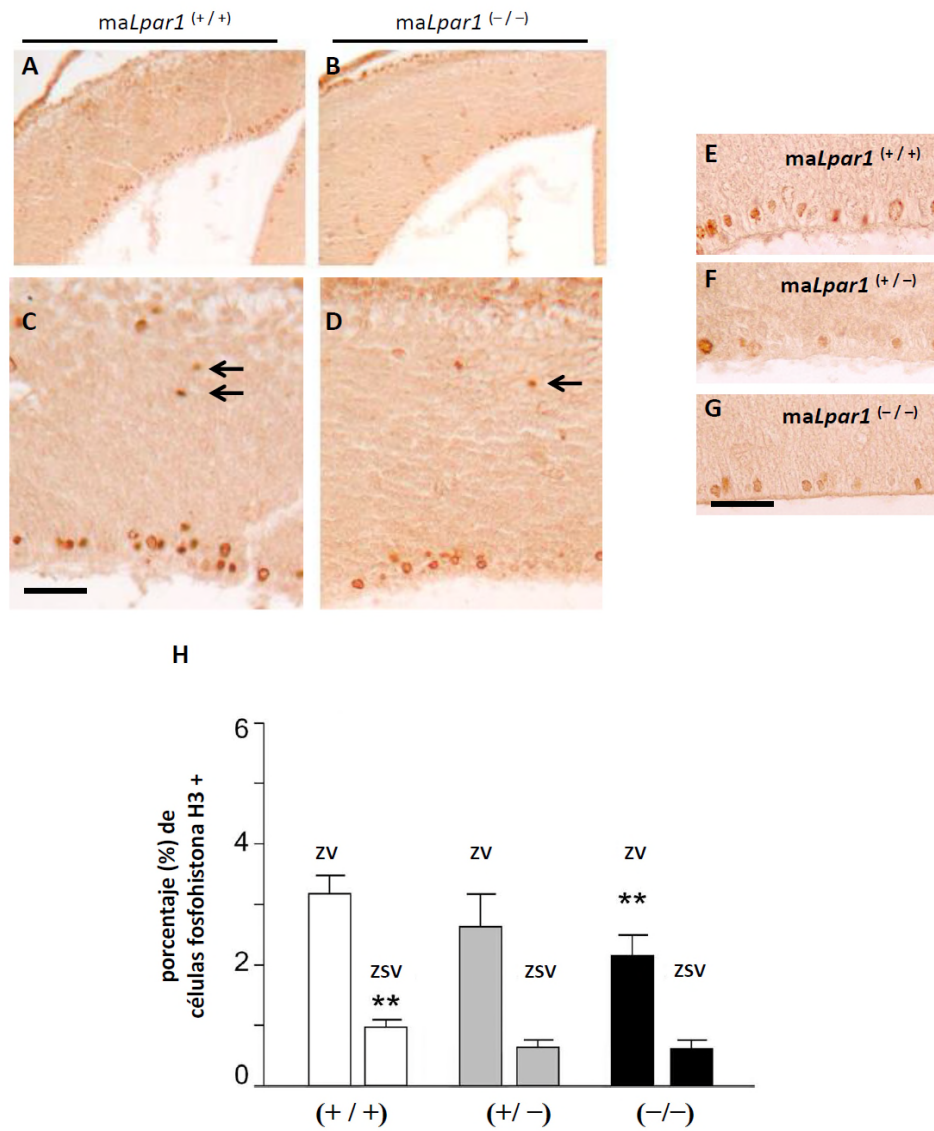


Figura 36. Reducción del número de mitosis en ausencia del receptor LPA₁. (A - G) Expresión de Histona H3 fosforilada en secciones coronales corticales de la zona proliferativa (VZ/ SVZ) en ratones de estadio E14.5 de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)], heterocigoto nulo [*maLpar1*^(+/-)], y nulo [*maLpar1*^(-/-)]; (A, B, aumentados en detalle en C, D). Se apreció una reducción del número de células histona H3-positivas en los ejemplares nulos para LPA₁, reducción que afectó no sólo a las mitosis junto a la luz del ventrículo (los tres genotipos en E-G), sino también a las células en mitosis en región apoventricular, en ZSV (flechas en C y D). Barra de escala (A, B) 300 μ m, (C, D) 100 μ m, (E,) 45 μ m. (H) La gráfica muestra el porcentaje de células en las zona ventricular (ZV) y subventricular (ZSV) que expresaban histona H3 fosforilada en cada genotipo frente al número total de células en la sección analizada. (n=8; **, p = 0,01).

4.3.2. Expresión anómala de genes reguladores de neurogénesis cortical en ausencia del receptor LPA₁.

Diferentes estudios previos han mostrado que el factor de transcripción *Pax6* está implicado en la regulación del ciclo celular durante la neurogénesis en estadios tempranos de desarrollo cerebral (Warren et ál., 1999; Estivill-Torrús et ál., 2000), período éste en el que la expresión de manera secuencial de los factores de transcripción *Pax6* y *Tbr2* termina en la diferenciación de los precursores neurales hacia progenitores intermedios de la ZSV (Englund et ál., 2005; Vasistha et ál., 2005; Quinn et ál., 2007). A fin de profundizar en la influencia de la señalización mediada por LPA₁ y determinar si las alteraciones observadas en la corteza cerebral de los ratones carentes del receptor LPA₁ se correlacionaban con alteraciones en la expresión de *Pax6* y *Tbr2* se analizaron secciones coronales corticales de cada genotipo por hibridación in situ e inmunohistoquímica a edades similares a las estudiadas.

El estudio no solo se restringió a estos dos factores sino que, por su participación en estos procesos de diferenciación, además, se analizó la expresión de *Ngn1*, factor proneural, implicado en la especificación de destino neuronal en el progenitor (Sun et ál., 2001; He et ál., 2005) y de *Tis21*, factor implicado en el control de la progresión del ciclo celular, y que se expresa en la fase de división asimétrica, marcando selectivamente los progenitores neurogénicos, no los proliferativos, así como tampoco las neuronas postmitóticas (Iacopetti et ál., 1999). Su expresión es de especial interés ya que se ha observado que las células que expresan *Tis21* no suelen generar neuronas directamente, sino que generan progenitores basales que darán lugar a neuronas (Attardo et ál., 2008, 2010). Para nuestro estudio, por tanto, usamos *Pax6* como marcador de progenitores neurales en división, apicales en su mayoría, si bien las divisiones de los intermedios, que expresan *Tbr2*, son más neurogénicas. A su vez, la mayoría de todas las células con división asimétrica que dieran lugar a progenitores basales neurogénicos quedarían señaladas por la expresión de *Tis21*.

El estudio de expresión de *Pax6* en ratones de genotipo normal permitió comprobar que, en la neurogénesis, en una fase temprana/media como E14.5, la expresión de *Pax6* se encuentra localizada en la ZV y ZSV, donde es expresado por la mayoría de los precursores neurales (Walther y Gruss, 1991), delimitando claramente la región germinativa (Fig. 37 A). Al examinar la corteza de los animales carentes del receptor LPA₁ se pudo observar una reducción muy clara de la región con expresión de *Pax6* (Fig. 37 B), de acuerdo, por otra parte, con las imágenes de expresión de PCNA anteriormente mostradas. De manera equivalente, la región que en los ratones maLPA₁-nulos presuntamente debía ser proliferativa pero que, en

dicho estadio, mostraba una expresión de β -III tubulina anómala y prematura, no presentaba niveles detectables de expresión de Pax6, de manera consistente con la pérdida de identidad de célula precursora (Fig. 37 B).

En este mismo estadio, E14.5, *Tbr2*, como hemos mencionado, se expresaba en genotipo control normal (Fig. 37 C) en las células destinadas a actuar como progenitores intermedios en la ZSV, a nivel apoventricular, basal, así como en algunas neuronas postmitóticas recién diferenciadas, delimitando la ZSV, próximo al límite de expresión de *Pax6*, más apical (Englund et ál., 2005; Vasistha et ál., 2005; Quinn et ál., 2007). De acuerdo a la disminución de expresión de PCNA y *Pax6* en la presunta ZV/ ZSV del embrión nulo para LPA₁, se esperaría una disminución en la región positiva a *Tbr2*. Sin embargo, los resultados mostraron, de manera ciertamente interesante, que, a excepción de ligeras variaciones, no había apenas diferencias entre el genotipo normal y el nulo carente del receptor (Fig. 37 C, D). Estos resultados, considerando que la identidad de los progenitores intermedios de la ZSV viene determinada, como hemos mencionado, por una regulación al alza de *Tbr2* y otra, a la baja de *Pax6* (Englund et ál., 2005), sugerían una salida de ciclo prematura por parte de los precursores neurales y la inmediata adquisición de identidad de progenitor intermedio en ZSV. Esta salida prematura quedaría confirmada además, por la alteración de la expresión de *Tis 21* y *Ngn1* y *Ngn2*. Así, frente al comportamiento normal en el que, en E14.5 hay una fracción destacada de progenitores con expresión de *Tis21*, merced a la necesidad de generar progenitores intermedios neurogénicos (Fig. 37 E), la ausencia del receptor LPA₁ se acompaña de una reducción considerable de la expresión de *Tis21* (Fig. 37 F), lo que sugiere, al no haber diferencias en la expresión de *Tbr2*, que se ha evitado u obviado este paso prematuramente de alguna manera. En el animal nulo este patrón anómalo de orquestación de expresión génica vino acompañado, además, de un desequilibrio en la expresión de los genes proneurales ya que, si bien en E14.5 tenía lugar un descenso de expresión de *Ngn1* (Fig. 37 G, H), pero no de *Ngn2* (Fig. 37 I, J), poco más tarde, a E16.5, era la expresión de *Ngn2* la que quedaba muy reducida en comparación con el embrión de genotipo normal (Fig. 37 K, L)

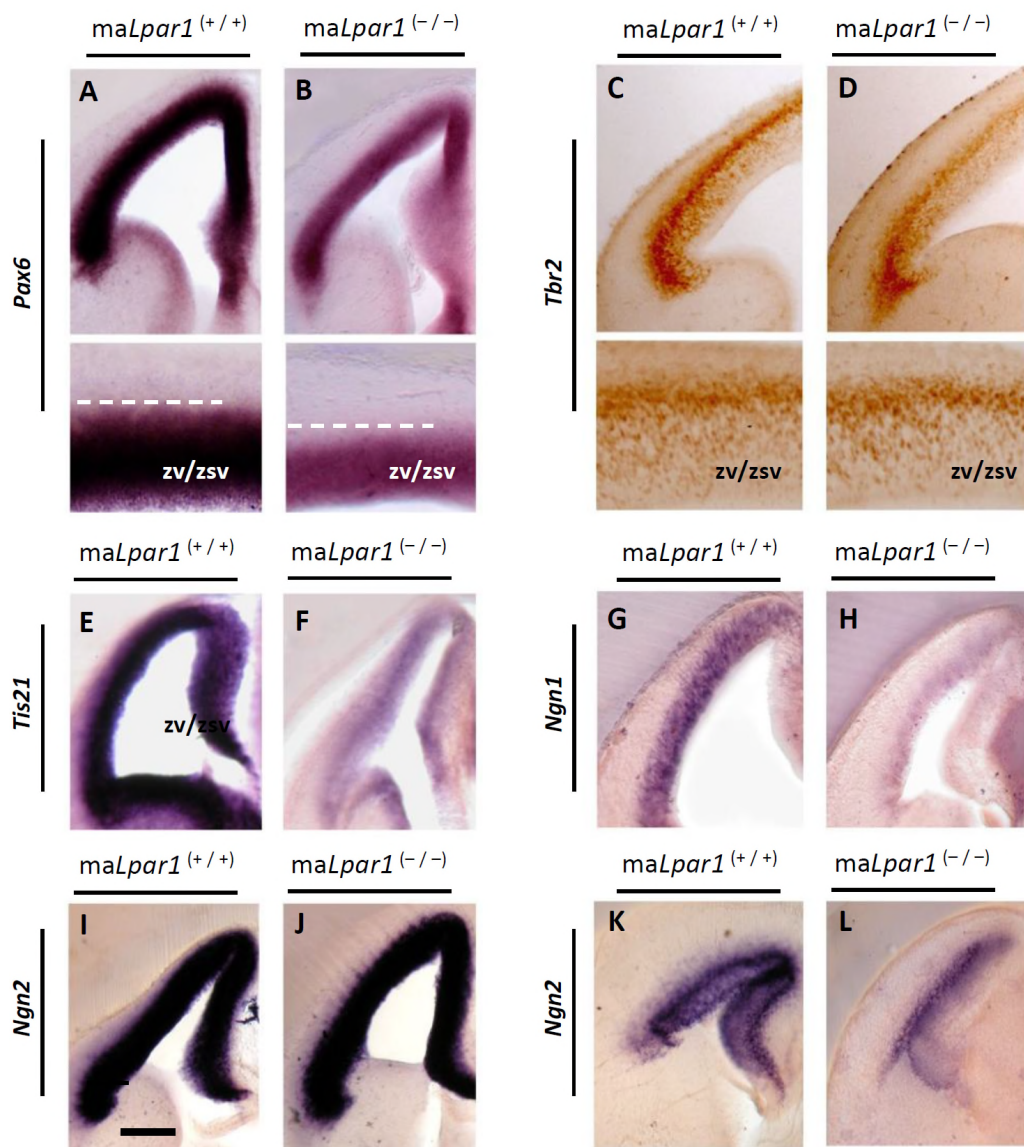


Figura 37. Patrón de expresión de Pax6, Tbr2, Tis21, Ngn1 y Ngn2 en la neurogénesis cortical temprana de ratones normales y nulos para LPA₁. Expresión de Pax6 (A, B), Tbr2 (C, D), Tis21 (E, F), Ngn1 (G, H) y Ngn2 (I-L) a estadios E14.5 (A-J) y E16.5 (K, L) en secciones coronales del telencéfalo de embriones de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A, C, E, G, I, K), y nulo [*maLpar1*^(-/-)] (B, D, F, H, J, L). En (A-D) se incluyen ampliados x2 en zona inferior. zv/zsv, ventricular/ zona subventricular. Barra de escala en (A-J), 400 μ m (a excepción de cada ampliado \times 2- en A-D); (K, L), 500 μ m.

4.3.3. Inversión de la proporción del tipo de división adoptado por los precursores corticales apicales en ausencia del receptor LPA₁.

Como mencionamos al inicio de este trabajo, el modo de división de las células progenitoras apicales en la zona proliferativa ventricular condiciona y permite la corticogénesis. Cuando la orientación del huso mitótico y, con ello, el plano de división celular, es vertical (perpendicular a la superficie ventricular), producen un modo de división simétrica,

generando dos células precursoras hijas idénticas que permanecen en la zona ventricular, mientras que, por el contrario, el plano de división aproximadamente horizontal, (paralelo o ligeramente oblicuo a la superficie ventricular), corresponde a una división asimétrica que genera dos células hijas diferentes, la más próxima al ventrículo se mantendrá como progenitora mientras que la otra migrará hacia la placa cortical para contribuir a la formación diferenciada de la corteza cerebral o bien dará lugar un progenitor intermedio (Haydar et ál. 2003). En un individuo normal las divisiones simétricas predominan en las fases tempranas del desarrollo para incrementar la población proliferativa en la VZ mientras que, conforme la neurogénesis avanza, aumenta el porcentaje de divisiones asimétricas que darán lugar a neuronas y células gliales (Chenn y McConnell, 1995; Hatten, 1999; Haydar et ál. 2003; Noctor et ál., 2004; Gotz y Huttner, 2005; Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; Paridaen y Huttner, 2014).

Si, como sugerían los resultados, la ausencia de LPA₁ podía generar una salida prematura de ciclo con expresión temprana de marcadores de diferenciación, el tipo de división de los precursores nulos para LPA₁ pudiera estar marcadamente desplazado hacia la asimetría, ya que es la, a priori, salida natural para generar progenitores intermedios y neuronas. El huso mitótico de los progenitores rota durante la metafase pero se detiene en anafase, lo que permite detectar una medida exacta del plano de división (Adams, 1996). Por ello realizamos un análisis, a diferentes estadios, mediante tinción histológica convencional con hematoxilina, para observar con detalle la presencia y el tipo de división en la ZV de ambos genotipos normal y nulo ya que con esta tinción sencilla se pueden identificar y cuantificar claramente las células en anafase y telofase, cuando los cromosomas condensados se separan. Las células se clasificaron según la orientación de su plano de división (Estivill-Torrús et ál., 2000), diferenciando plano vertical (división simétrica) y planos intermedio (oblicuo) y horizontal (división asimétrica ambos, si bien el oblicuo suele ser mayoritario en mamíferos) (Fig. 38 A), a objeto de demostrar mejor la posible alteración en el animal nulo para el receptor.

Así, de acuerdo a lo descrito en condiciones normales, el ratón normal en estadio E14.5 (neurogénesis temprana/media) prácticamente las dos terceras partes de todas las divisiones eran con orientación vertical, es decir, dirigidas a división simétrica, siendo las de tipo asimétrico mayormente con plano oblicuo o intermedio (Fig. 38 B). La proporción de divisiones simétricas se redujo ligeramente en E16.5 (Fig. 38 B). Sin embargo, al analizar el ratón malLPA₁-nulo, en ambos estadios, E14.5 y E16.5 los resultados mostraron, especialmente a E14.5, unos valores muy elevados, y significativos respecto a los individuos normales, de divisiones de tipo asimétrico, cercanos al 65 %, y mayoritariamente por orientación horizontal, (Fig. 38 B) lo que

venía a corroborar la diferenciación prematura de los precursores neurales mediante división asimétrica en ausencia del receptor LPA₁ en los estadios iniciales y medios de neurogénesis.

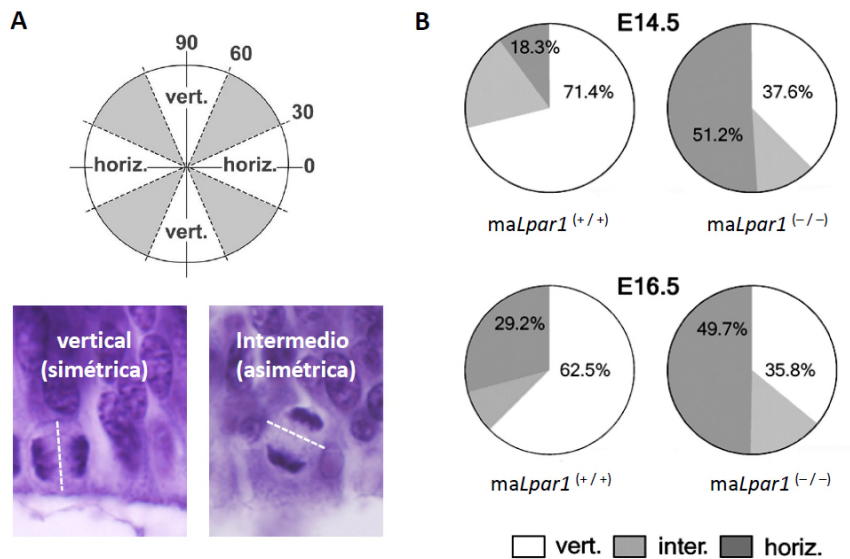


Figura 38. La ausencia del receptor LPA₁ en los precursores neurales invierte la proporción del tipo de orientación del plano de división. (A) Las células en fase de telofase y anafase tardía se clasificaron de acuerdo a su plano de división relativo a la superficie ventricular: 0° a -30° o a 30°, división horizontal; 30° a 60°, intermedia u oblicua; 60° a 120°, división vertical. Se muestra el esquema e imágenes representativas teñidas con hematoxilina. (B) Gráficos comparando el porcentaje de células en cada plano de división (identificados en secciones coronales) en embriones normales [*maLpar1*^(+/+)] y nulos [*maLpar1*^(-/-)], a estadios E14.5 y E16.5. Las proporciones de división horizontal y vertical de los animales nulos fueron, llamativamente, proporcionalmente inversas a las de los animales normales. (n = 8; p = 0,001).

4.3.4. Dinámica de proliferación y diferenciación de neuroblastos corticales en ausencia del receptor LPA₁.

A objeto de analizar el efecto de la ausencia de señalización mediada por el receptor LPA₁ en la dinámica proliferativa de los precursores de manera individualizada sin la influencia del medio y de los diferentes factores tróficos y de señalización intrínseca cortical, se estudió la misma en cultivos de neuroblastos corticales procedentes de embriones de estadio E14.5, cuando más claros son los defectos observados, analizando el patrón de proliferación y de ciclo celular en condiciones normales y en ausencia del receptor LPA₁, mediante el estudio de marcadores inmunocitoquímicos y marcaje y seguimiento con bromodesoxiuridina (BrdU).

Respuesta a LPA en neuroblastos corticales de ratones en E14.5

En primer lugar, y para corroborar la funcionalidad de la señalización del receptor LPA₁ en los cultivos celulares de neuroblastos procedentes de ratones normales, frente a los carentes del receptor LPA₁, se trataron ambos con una solución de oleil LPA ó 1-oleil-2-hidroxi-sn-glicerol-3-fosfato (en forma de sal sódica) a una concentración 100 nM, capaz de generar una respuesta de compactación celular en neuroblastos corticales (Fukushima et ál., 2000).

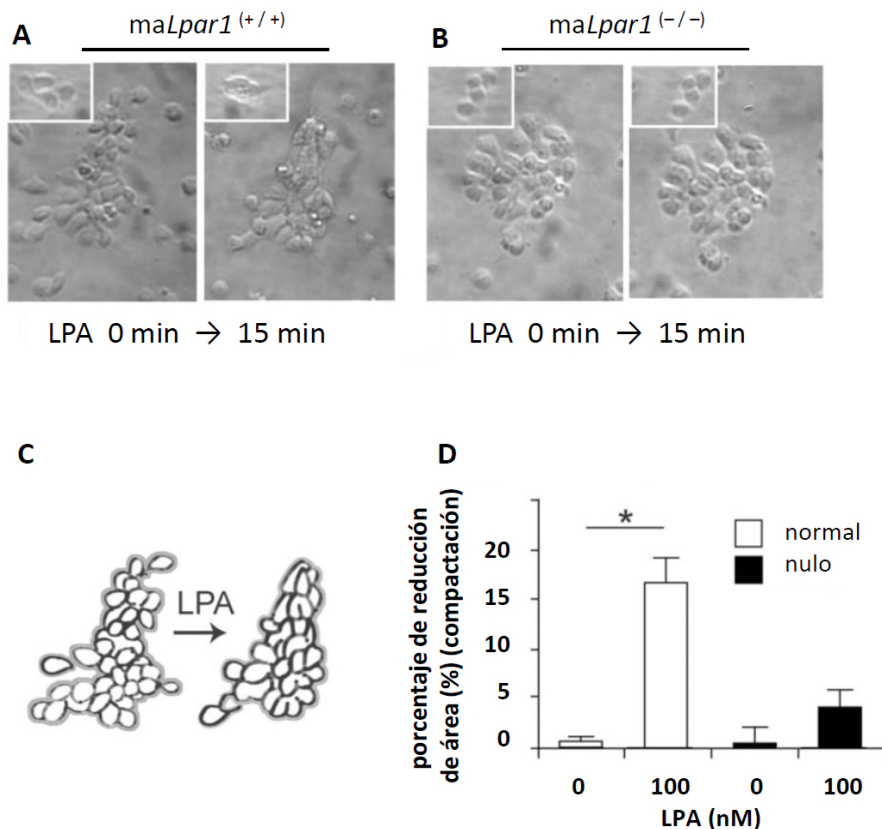


Figura 39. Efecto de la adición de LPA en cultivos celulares de neuroblastos corticales obtenidos de embriones normales y nulos para LPA₁. (A, B) Imágenes representativas de cultivos de neuroblastos corticales de ratones de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] y nulo [*maLpar1*^(-/-)], en estadio E14.5, antes (tiempo 0 min) y 15 min, después de la adición de LPA a concentración 100 nM. (C) Representación esquemática de la compactación celular tras adición de LPA en neuroblastos de genotipo normal. (D) Representación del porcentaje de reducción de área tras adición de LPA al cultivo, en ambos genotipos. El vehículo (0) no generó efecto alguno en ambos casos. (n=8; **, p = 0.01).

Como se puede observar en la Figura 39, en los cultivos celulares derivados de ejemplares normales (Fig.39 A), al cabo de 15 min de adición de LPA al medio de cultivo, los neuroblastos mostraron retracción de neuritas y, como resultado de dicha dinámica celular, tendencia a formar grupos algo más compactados. Por el contrario, los neuroblastos de genotipo nulo mantenían exactamente la misma morfología al cabo de quince minutos de observación

mostrando con ello la ausencia total de efecto de LPA (Fig. 39 B). Cuando se cuantificó el porcentaje de reducción del área sobre la que se asienta un grupo de células, como medida de compactación (Fig. 39 C), o lo que es lo mismo, como medida de la capacidad de retracción (Fukushima et ál., 2000) se observó que los neuroblastos carentes del receptor LPA₁ no respondían al LPA, mientras que los derivados de los animales normales mostraban una reducción significativa del área (Fig. 39 C, D).

Proliferación y diferenciación en neuroblastos corticales de ratones en E14.5

La bromodesoxiuridina (BrdU) es un análogo sintético de la timidina que se incorpora rápidamente en las células cuando estas requieren sintetizar material genético (a lo largo de un período de 2 h después de su administración) y es visible, de manera decreciente tras cada división, en las células hijas (Taupin, 2007). A las doce horas de establecer el cultivo de neuroblastos corticales se añadió BrdU (10 μ M) al medio de cultivo, con el objeto de marcar los precursores neurales en fase S de síntesis del ciclo celular, retirándolo a los 45 minutos. Se analizó el cultivo inmediatamente después del pulso de BrdU, (tiempo 12,75 h tras inicio de cultivo), y a las 18, 24 y 36 horas tras cultivo. Además, en cada tiempo, se analizó la expresión de la ciclina A para determinar la proporción de neuroblastos mayoritariamente en fase S (Woo y Poom, 2003; Kaldis y Aleem, 2005) y de p27^{kip1} cuya expresión induce la salida del ciclo celular y migración a las capas superficiales (Tarui et ál., 2005), por lo que es indicativa de diferenciación.

El estudio del comportamiento proliferativo y de maduración confirmó las alteraciones observadas a nivel histológico. Los resultados de marcaje con BrdU mostraron, en el tiempo, un aumento gradual de células marcadas (con independencia de su intensidad) en los tres genotipos, normal, heterocigoto y nulo para LPA₁ indicativo de un proceso continuado de división (Fig. 40 A, B). Sin embargo, la ausencia del receptor se correlacionó con una reducción del número de células marcadas desde el inicio del experimento, a tiempo cero, respecto a lo observado en el genotipo normal (Fig. 40 A, B). Esta reducción en el marcaje con BrdU se acompañó, en todos los tiempos medidos, de la presencia de una fracción menor, constante, de células con expresión nuclear de ciclina A (Fig. 40 C, D) y, de manera muy llamativa, por una fracción considerablemente mayor de células que expresaban p27^{kip1} (Fig. 40 E, F). Además de suponer una diferencia muy significativa de partida respecto al genotipo normal, el aumento de expresión de p27^{kip1} en los neuroblastos carentes del receptor de LPA₁ fue incrementándose gradualmente en el tiempo de duración del experimento (Fig. 40 E, F). Además, la tinción de

contraste con β -III tubulina demostró mayor presencia de células diferenciadas en los cultivos de genotipo nulo. Estos resultados de acuerdo con lo observado a nivel histológico, sugiriendo que, en ausencia del receptor LPA₁ el modo de división de los precursores cambia hacia divisiones de tipo asimétrico, generando una salida de ciclo con diferenciación prematura.

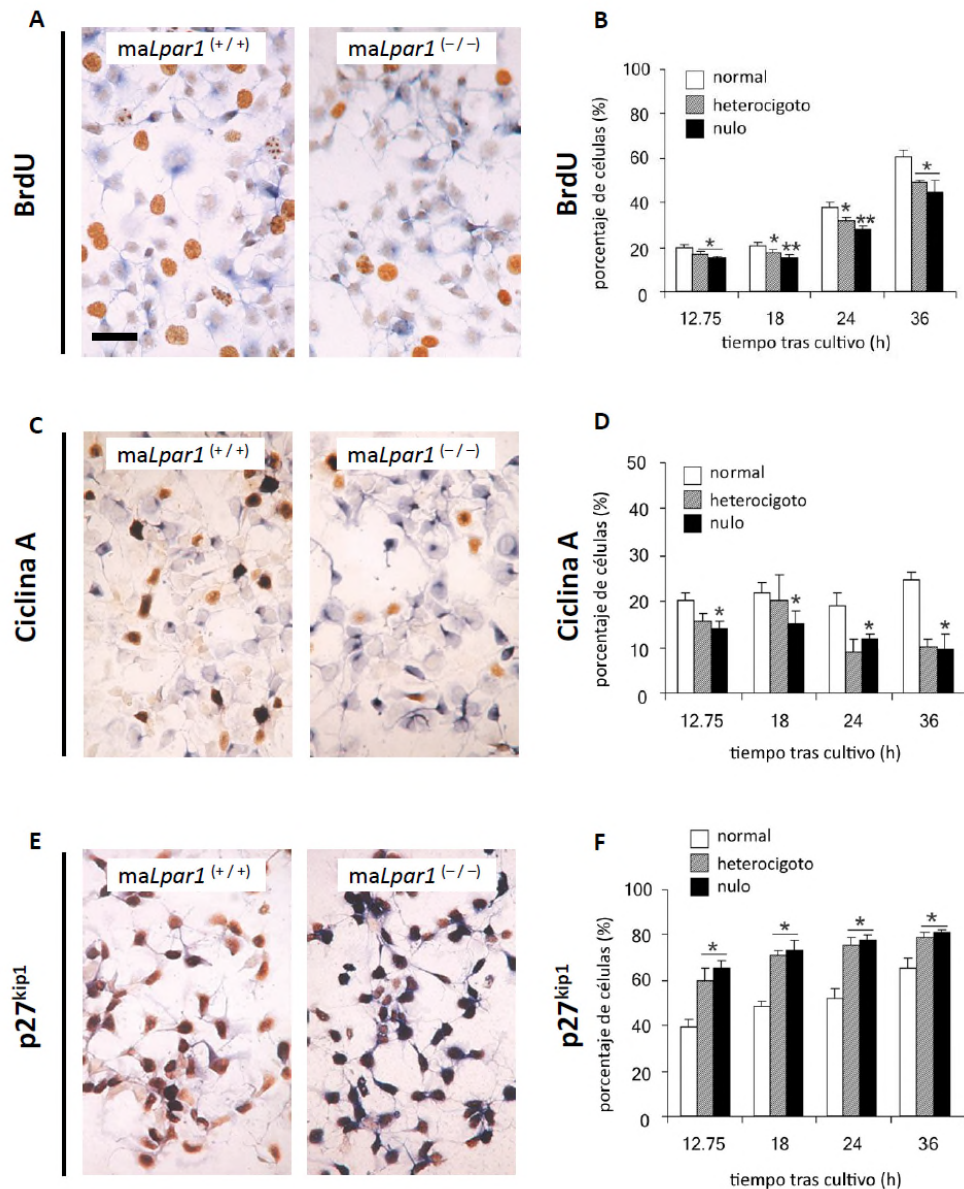


Figura 40. Análisis *in vitro* de los precursores neurales de ratones *maLPA₁*-nulos. Se muestran imágenes representativas de cultivos de neuroblastos corticales de ratón de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] y nulo [*maLpar1*^(-/-)], en E14.5, inmunoteñidas para la detección de BrdU (A, B) y de la expresión de ciclina A (C, D) y p27^{kip1} (E, F), 24 h tras cultivo y con pulso de 45 min de BrdU a 12,75 h tras cultivo. En marrón, la marca específica; en azul, inmunotinción de contraste con β -III tubulina. Las gráficas, a la derecha de cada imagen, muestran el porcentaje de células inmunoteñidas para cada marcador a los diferentes tiempos. Se detectaron diferencias significativas entre el genotipo normal y nulo en todos los tiempos medidos. (*) diferencia respecto a genotipo normal; (**) diferencia entre genotipo heterocigoto y homocigoto nulo. (*, **, $p < 0,05$, ANOVA). Escala, (A), 20 μ m; (C, E), 25 μ m.

Cinética del ciclo celular en neuroblastos corticales de ratones en E14.5

Para este análisis se recurrió al método de marcaje acumulativo con BrdU (Nowakowski et ál., 1989; Estivill-Torrús et ál., 2002) mediante el cual se añade BrdU al cultivo celular, sin retirarlo, analizando diferentes tiempos para detectar su incorporación acumulada. Establecida la proporción de células marcadas en cada tiempo, desde el inicio, es posible calcular la fracción de crecimiento (FC), el tiempo de la fase de síntesis del ciclo celular (Ts), y la longitud del ciclo celular (Tc) (Nowakowski et ál., 1989; Takahashi et ál., 1993, 1995; 1999; Estivill-Torrús et ál., 2000), pudiendo calcular con mayor exactitud la fracción de crecimiento (FC), proporción real alcanzada de células proliferantes (Fig. 41 A). En neuroblastos nulos y, de acuerdo con lo observado hasta ahora, hubo un menor número de células marcadas con BrdU al inicio del experimento ($18,5 \% \pm 2,9 \%$) respecto al genotipo normal ($26,3 \% \pm 0,7 \%$) (Fig. 41 B). Sin embargo, al sumar la totalidad del tiempo y obtener la FC, ésta es mayor en ausencia de LPA₁ ($75,8 \% \pm 4,6 \%$) respecto al genotipo normal ($63,1 \% \pm 2,9 \%$) (Fig. 41 B), lo que indica que alcanzaron el máximo número de células marcadas con BrdU en menor tiempo. La Figura 41 C presenta el cálculo de la longitud de ciclo celular (Tc), representado como la longitud de la circunferencia (un menor círculo significa un menor tiempo total de ciclo celular). Mientras que la Tc en E14.5 para los neuroblastos de genotipo normal se estimó en 16,5 h, la de los neuroblastos nulos para LPA₁ fue de 11,5 h, siendo la de la fase S (Ts) de 4 h y 2,5 h, respectivamente (Fig. 41 C). Los resultados sugerían, globalmente, que la ausencia de LPA₁ alteraba la proporción de células en proliferación, haciéndola más reducida de partida, e induciendo un ciclo celular más corto, con divisiones aceleradas, y diferenciación prematura.

Las imágenes de los cultivos de neuroblastos con presencia continuada de BrdU en el medio fueron muy llamativas y confirmaban lo expuesto. Así, frente a una dinámica convencional de cultivo, con grupos de células dispersos, y marca de BrdU en las diferentes células en proliferación (genotipo normal, Fig. 41 D, panel izquierdo), los neuroblastos de genotipo nulo se agrupaban formando cadenas de células proliferantes, muy adheridas unas a otras, e incluso imágenes aberrantes de grupos grandes de células en proliferación compactadas desde donde salían cadenas unidas de células en división, formando la apariencia de una estrella de células en división (genotipo normal, Fig. 41 D, panel derecho). Considerando los resultados de la dinámica y su comportamiento, todo parecía indicar que las células, en ausencia del receptor LPA₁, se dividían y diferenciaban en tan corto espacio de tiempo y de manera anómala que daban lugar a formaciones aberrantes de células sin tiempo alguno para separarse del grupo progenitor origen. El esquema en la misma figura (Fig. 41 E) representa la

idea propuesta, siendo las líneas continuas las células que continúan división y las quebradas, las de células diferenciadas o en proceso de diferenciación posmitótica.

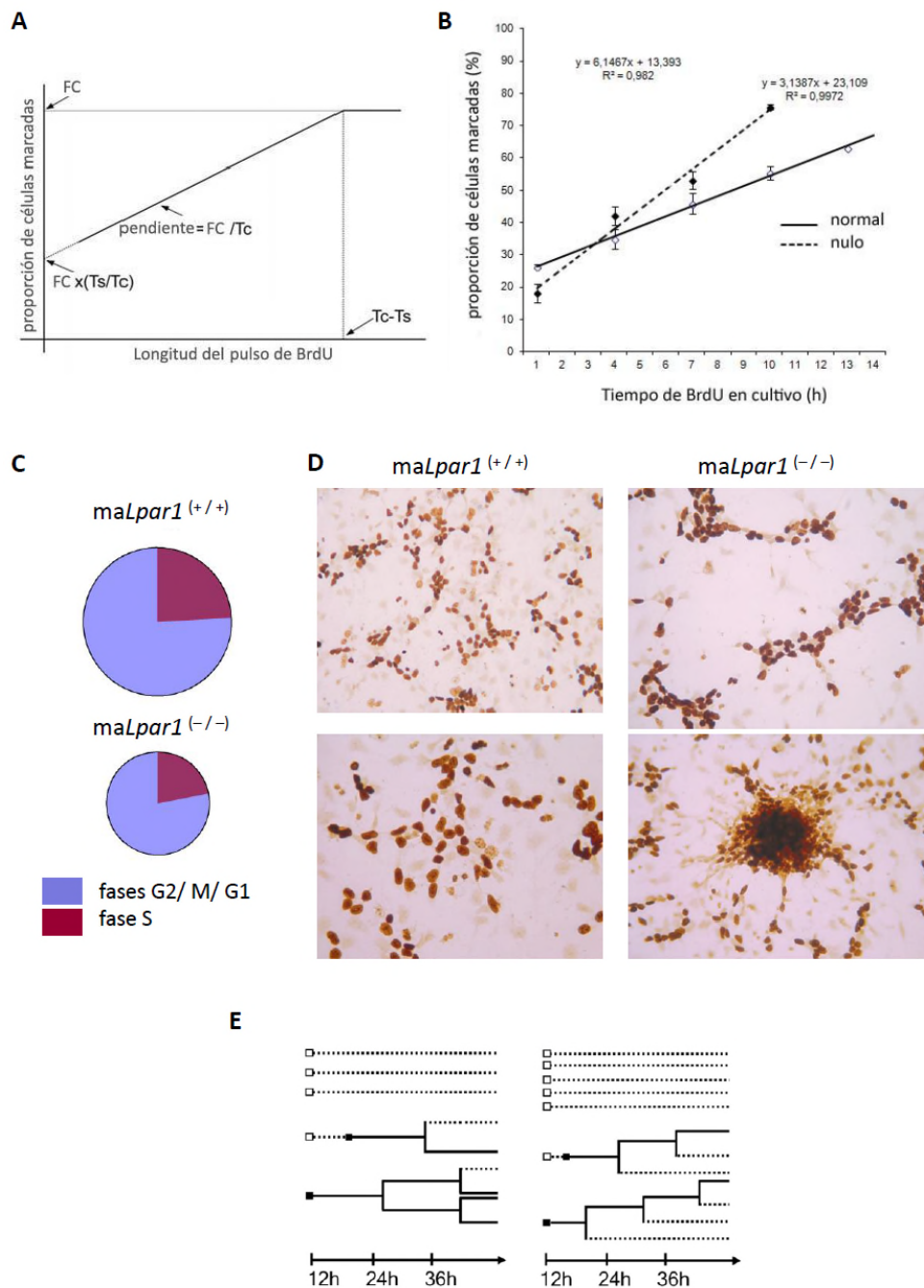


Figure 41. Cinética del ciclo celular de los precursores neurales de ratones *maLPA₁*-nulos. (A, B) Gráficas mostrando el marcaje acumulativo con BrdU en neuroblastos de genotipo normal [$maLpar1^{+/+}$] y nulo [$maLpar1^{-/-}$], en E14.5. (A) Ecuaciones para el cálculo de los diferentes parámetros. (B) Tendencia de la proporción de células marcadas (media \pm error estándar de la media). (C) Representación de la cinética del ciclo celular para ambos genotipos. La longitud del círculo es proporcional a la duración del ciclo. ($p < 0,05$, ANOVA). (D) Imágenes representativas del cultivo celular inmunoteñido para BrdU en ambos genotipos. (E) Representación de la cinética para ambos genotipos. Las líneas continuas representan células en división y las quebradas, células diferenciadas o en proceso de diferenciación posmitótica. En ausencia de LPA₁ los procesos de división rápida y diferenciación prematura se sucederían rápidamente.

4.4. Alteraciones en la formación cortical en los ratones *Málaga* nulos para LPA₁

4.4.1. Migración cortical y diferenciación anómalas en ausencia del receptor LPA₁.

Los defectos observados hasta ahora por la ausencia del receptor LPA₁ permiten inferir un papel sustancial del mismo para el correcto desarrollo de la neurogénesis cortical, cuando menos, a nivel del equilibrio de los procesos de división/diferenciación en los estadios iniciales de la corticogénesis. Para valorar el efecto de estas alteraciones y, por ello, el papel del receptor LPA₁ en la formación de la corteza cerebral, en la correcta migración neuronal y la constitución de las diferentes capas corticales, y, en última instancia, en la funcionalidad cerebral, fue preciso examinar la corteza cerebral a objeto de buscar defectos que pudieran afectar la organización cortical postnatal.

En primer lugar, considerando las alteraciones a nivel histológico, se estudió el comportamiento migratorio de los precursores neurales mediante la administración intraperitoneal de BrdU (en una proporción de 70 µg BrdU/gr de peso del animal) a hembras preñadas con crías en edad E14.5, para así marcar las células corticales que nacieran en ese preciso momento, y poder, a posteriori, examinar su distribución en estadio E18.5. Se calculó el porcentaje de células marcadas según su localización, respecto al total de marcadas (ver sección 3.4.2.3.), lo cual permitió estimar su migración (Gillies y Price, 1993; Estivill-Torrús et ál, 2000). Las células positivas a BrdU se clasificaron en células con marca densa, donde se marcaba más de la mitad del núcleo, y células con marca ligera, con menor marca en el núcleo (apariencia punteada), indicativa de que han sufrido más de un ciclo de división tras el marcaje (Gillies y Price, 1993; Taupin, 2007). Se pudo observar cómo, inmediatamente después del pulso de BrdU, los embriones en estadio E14.5 de ambos genotipos, normal y maLPA₁-nulo, mostraron patrones de marcaje similares cualitativamente, con la totalidad de células marcadas localizadas en la ZV y ZSV (no mostrado).

A las 12h de la administración de BrdU su inmunodetección en las secciones coronales corticales de los embriones normales en E14.5 mostró una amplia distribución de células marcadas en la pared cortical que ocupaba ambas, ZV y ZSV, y la ZI, donde p se localizaban en una proporción muy significativa (Fig. 42 A). Por el contrario, en los animales nulos para el receptor las células marcadas estaban prácticamente ausentes de la ZI y, las de posiciones más apicales se localizaban, mayoritariamente, en ZSV (Fig. 42 B). La cuantificación de las células en

las diferentes zonas confirmó la reducción significativa de células marcadas en la ZI y que afectaba tanto a células marcadas de manera densa, como a las de marca ligera, procedentes de divisiones anteriores (Fig. 42 C), lo que, en conjunto, parecía indicativo de deficiencias de migración en estadios iniciales.

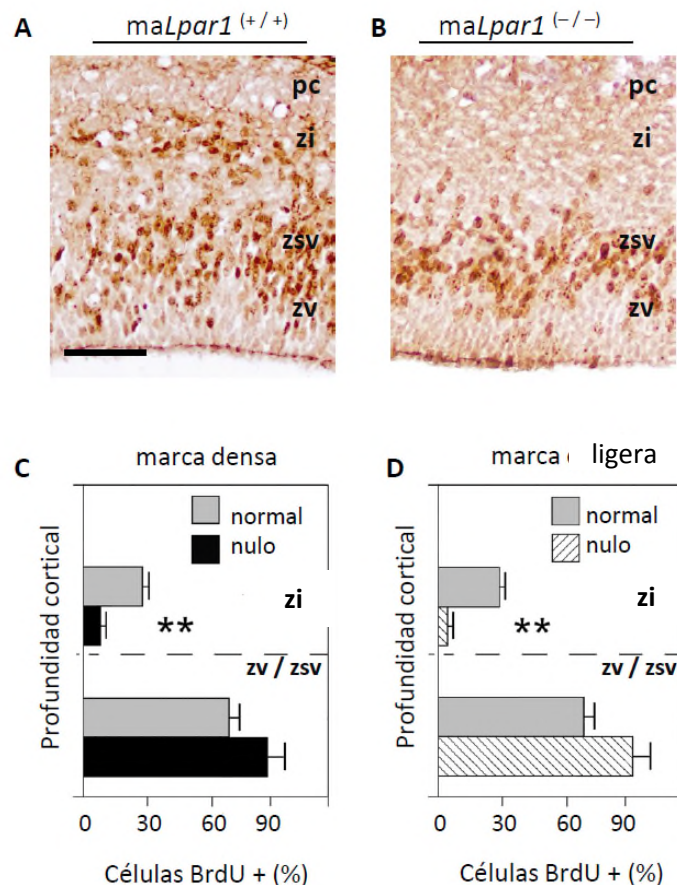


Figura 42. Migración cortical temprana alterada en ausencia del receptor LPA₁. (A, B) Inmunodetección de BrdU en células marcadas en E14.5, 12h tras su administración. La imagen muestra el patrón de marca en secciones coronales corticales de embriones de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A), y de genotipo nulo [*maLpar1*^(-/-)] (B), este último sin apenas marcaje en la zona intermedia (zi). (C) Gráficas mostrando el porcentaje de células marcadas de acuerdo a tipo de marca y localización cortical (zi vs. zv/zsv), en ambos genotipos, normal y nulo. El animal nulo mostró un número apenas significativo de células con BrdU en la zona intermedia. pc, placa cortical; zi, zona intermedia; zv, zona ventricular; zv/zsv, ventricular/ zona subventricular. Barra de escala en (A-B), 100 μ m.

Cuando el análisis se efectuó en estadio E18.5, al final del periodo neurogénico, con una placa cortical conveniente formada, ambos genotipos, normal y *maLPA₁*-nulo, presencia de células generadas en E14.5, marcadas densamente, en las capas más superficiales de la pared cortical (Fig. 43 A, B), indicando que la ausencia del receptor no incapacita a las neuronas para

migrar. Sin embargo, y siempre respecto al genotipo normal, llamaron la atención dos hechos en los animales *maLPA₁*-nulos, esto es, las pocas células presentes en la ZI y, de manera evidente y significativa, la acumulación de células marcadas (de ambas marcas, densa y ligera) en las capas más profundas de la corteza cerebral (Fig. 43 C), sugiriendo, en principio, defectos de posicionamiento, sin que pudiéramos descartar aún la influencia, igualmente, de muerte celular.

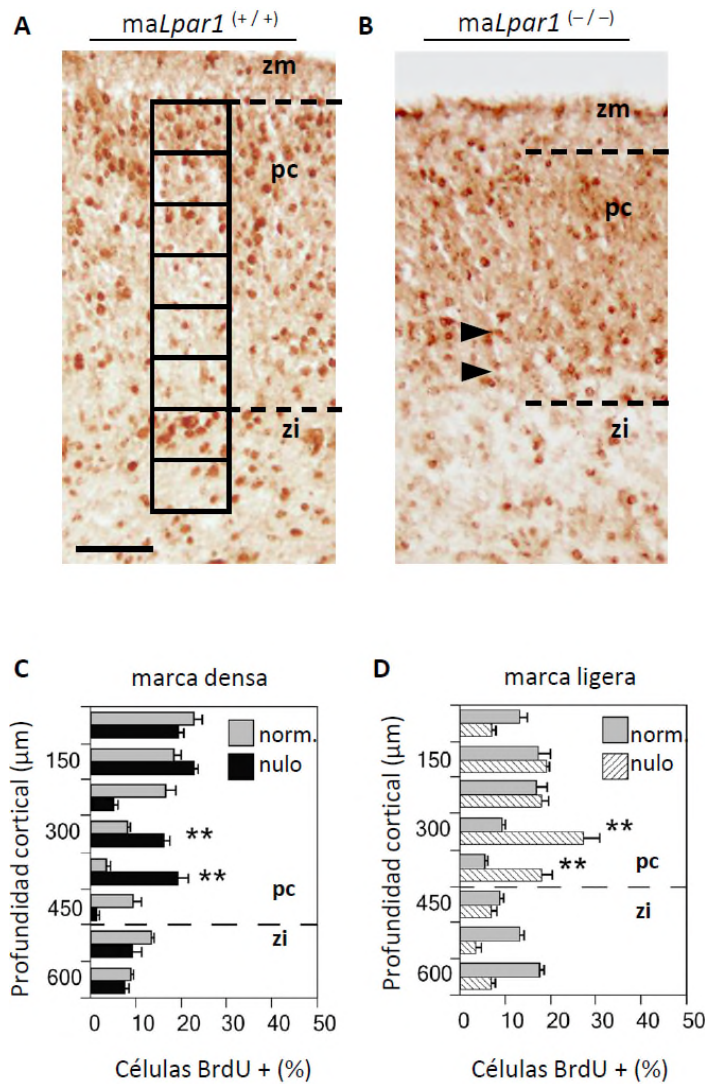


Figura 43. Migración anómala a capas superiores en ausencia del receptor LPA₁. (A, B) Inmunodetección de BrdU en células marcadas en E18.5, 4 días tras su administración. La imagen muestra el patrón de marca en secciones coronales corticales de embriones de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A), y de genotipo nulo [*maLpar1*^(-/-)] (B), este último con acumulación de células marcadas en las capas más profundas (punta de flecha). Se muestra insertada el sistema de compartimentos usado para el conteo. (C) Gráficas mostrando el porcentaje de células marcadas de acuerdo a tipo de marca y localización (en cada compartimento según profundidad cortical), en ambos genotipos, normal y nulo. El animal nulo mostró una acumulación significativa en las capas situadas a mayor profundidad en la pared cortical. zm, zona marginal; pc, placa cortical; zi, zona intermedia;. Barra de escala en (A-B), 100 μm.

La acumulación de células marcadas con BrdU podría deberse a diferentes causas. La anómala división y diferenciación sufrida por los progenitores en la ZV podría ser la más pausable para explicar los defectos de migración en sentido radial. Sin embargo es posible que otros factores influyeran en el resultado, tanto para la migración como, especialmente, la diferenciación final de las neuronas postmitóticas, especialmente por los resultados en la ZI. La ZI es una región particular por ser receptora de la migración tangencial de células, en particular las interneuronas de tipo GABAérgico. Desde E14.5 y durante el desarrollo embrionario, la eminencia ganglionar media, en el telencéfalo basal, es la fuente principal de dichas interneuronas corticales, incluyendo los subtipos que expresan parvalbúmina, que viajan por medio de migración tangencial hasta su destino final en la corteza y muy presentes en las capas más profundas de la corteza cerebral (Xu et ál., 2004, 2010; Wonders y Anderson, 2005).

En este sentido se trató de detectar anomalías en las vías tangenciales, no sólo en relación a la diferenciación de interneuronas corticales en destino, sino también en los tractos que se forman durante el desarrollo tangencialmente. El análisis de la expresión de GAP-43, una proteína que se expresa durante el desarrollo y que está implicada en el desarrollo de tractos axonales, la liberación de neurotransmisores, y la plasticidad sináptica (Jacobson et ál., 1986), permitió, observar los tractos tempranos que en sentido talamocortical se han desarrollado (López-Bendito et ál., 2003). Los resultados demostraron que, tanto en el embrión de genotipo normal, como en el nulo para el receptor LPA₁, la inmunorreactividad de GAP-43 definía perfectamente las fibras talamocorticales, que cruzaban los límites del palio/subpalio, desde las eminencias ganglionares hacia la ZI (Fig. 44 A, B). Por otra parte, el análisis mediante hibridación in situ, de la expresión de TAG-1, molécula de adhesión que se expresa durante el desarrollo selectivamente en los axones corticofugales e influye en la migración tangencial de las neuronas (Denaxa et ál., 2001), tampoco demostró diferencia alguna entre ambos genotipos (Fig. 44 C, D). Sin embargo, cuando se realizó inmunodetección de las neuronas que expresaban parvalbúmina, ya en la edad adulta, se pudo observar una reducción de éstas en las capas más profundas (V y VI) de la corteza de los ratones maLPA₁-nulos (Fig. 44 E), respecto a lo observado en el genotipo normal (Fig. 44 F), lo cual, en conjunto sugería defectos locales en su destino, más que anomalías en la migración de las células durante el desarrollo.

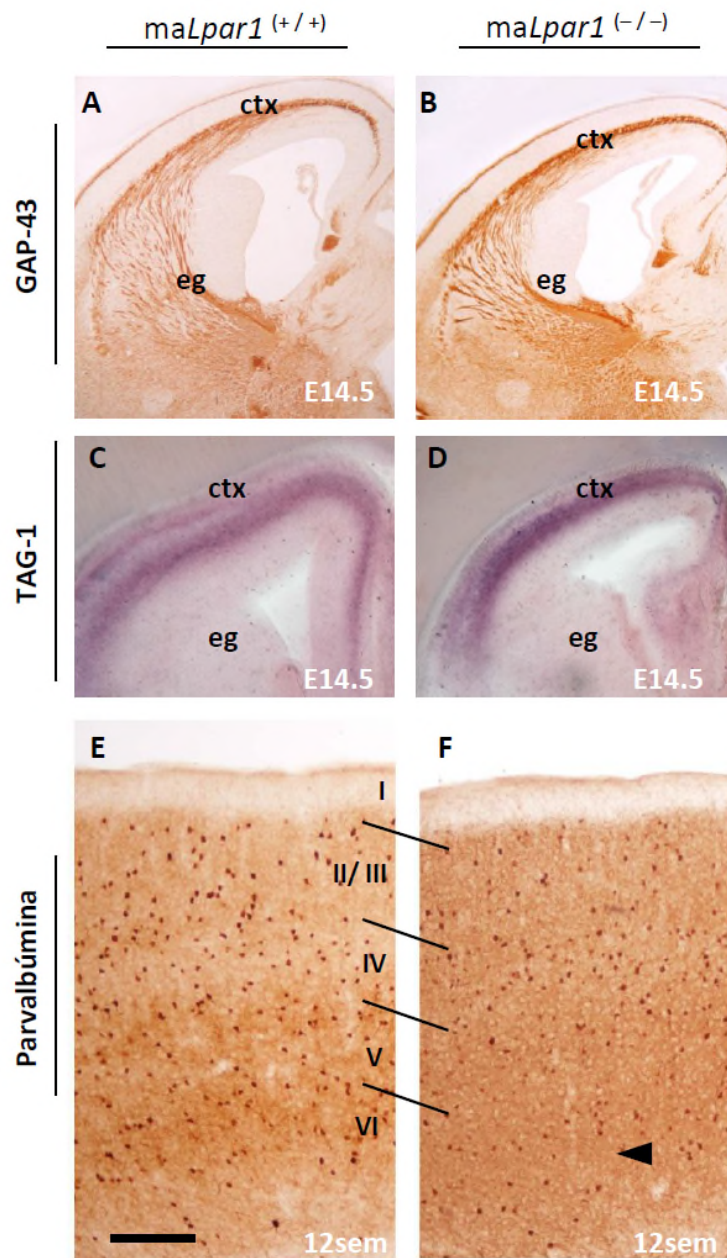


Figura 44. Conexión talamocortical y corticotalámica en ausencia del receptor LPA₁. (A, B) Inmunodetección de GAP43 en fibras talamocorticales en secciones coronales corticales de embriones en E14.5 de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A), y de genotipo nulo [*maLpar1*^(-/-)] (B). (C, D) Expresión de TAG-1 en fibras corticofugales en secciones similares. En ambos casos no se apreciaron diferencias que pudieran poner de manifiesto alteraciones en las vías tangenciales en ausencia del receptor. (E, F) Secciones coronales de corteza motora de ratones adultos (3 meses) de genotipo normal (E) y nulo (F) inmunoteñidas para detección de parvalbúmina. El animal nulo mostró menor número de neuronas con expresión de parvalbúmina en las capas corticales (indicadas en números romanos) situadas a mayor profundidad (punta de flecha) en la pared cortical. ctx, corteza cerebral; eg, eminencias ganglionares; Barra de escala en (A, B) 300 μ m; (C, D) 350 μ m; (E, F), 100 μ m.

A pesar del patrón normal de inmunoreactividad a GAP-43 exhibido por ambos genotipos en el desarrollo cortical, más allá de los tractos axonales, la expresión de esta proteína demostró un defecto acusado en la corteza de ratones maLPA₁-nulos en edad perinatal y que volvía a poner de manifiesto fallos en la diferenciación celular final en destino. En estadio P0, la detección de GAP-43 en secciones coronales corticales del animal normal mostró su expresión en neuronas distribuidas en todas las capas corticales (Fig. 45 A). Por el contrario, la corteza de los animales nulos para el receptor apenas detectó GAP-43 en la capa cortical II (Fig. 45 B), lo que sugería defectos en diferenciación neuronal. Estos defectos no impidieron, no obstante, que las células corticales de esta capa conservaran su identidad neuronal como se puso de manifiesto mediante tinción para la detección de β -III tubulina (Fig. 45 C, D).

A objeto de poder cuantificar la expresión de dicha proteína en la zona se recurrió a su detección en electrotransferidos tras electroforesis de extractos de proteína de muestras corticales de las regiones dorsales superior y media, comprendiendo las capas corticales II/ III, indicadas ambas regiones en la figura como "1" (dorsal superior) y "2" (dorsal media) respectivamente. Este análisis de las citadas regiones confirmó lo observado en inmunohistoquímica. La Fig. 45 E muestra un resultado representativo de muestras corticales de ambos genotipos, normal y nulo, procesados para la inmunodetección de GAP-43. Se detectó una banda de proteína de aproximadamente 46 kDa correspondiente a GAP-43. La cuantificación de la intensidad de la banda mediante densitometría mostró una reducción significativa de los niveles de GAP-43 en la capa II de la corteza cerebral de los ratones nulos para el receptor LPA₁, por comparación con el genotipo normal (Fig. 45 F) lo que, junto a los resultados mencionados hasta ahora, venía a sugerir que los defectos durante los procesos proliferativos en ausencia del receptor LPA₁ afectaban, en última instancia, a la diferenciación en destino generando, en este caso, una deficiencia en la expresión de GAP-43, es decir, alteraciones relacionadas con plasticidad y, en definitiva, una incorrecta formación de la corteza.

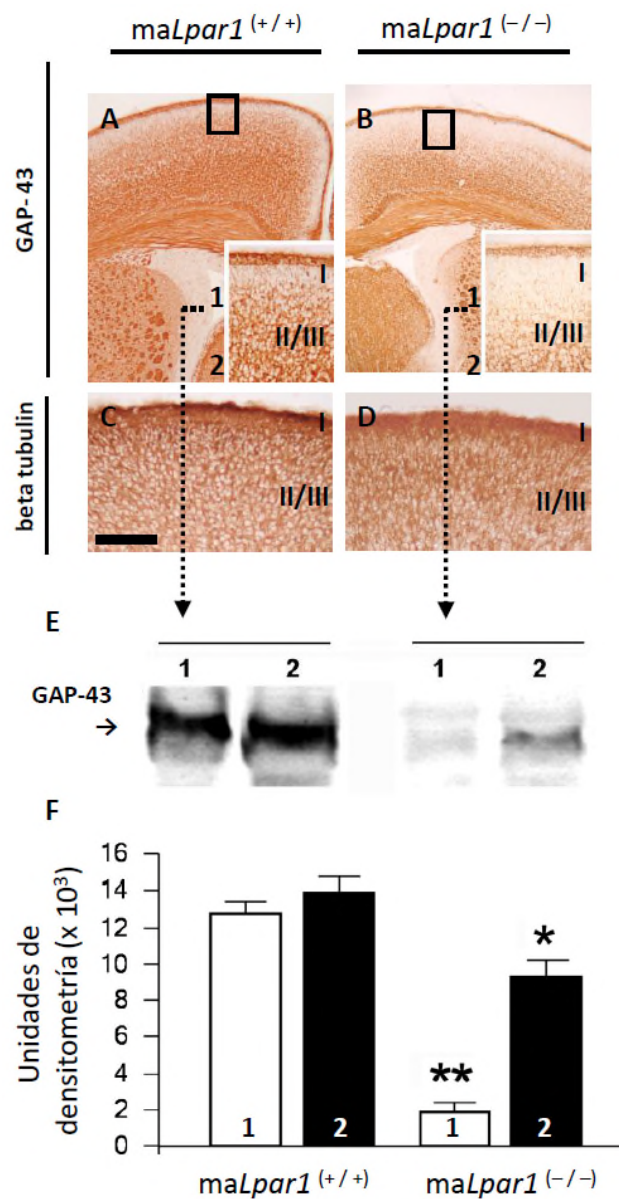


Figura 45. Deficiencia cortical de GAP-43 como consecuencia de las alteraciones de desarrollo en ratones nulos para LPA₁. (A, B) Expresión de GAP-43 detectada por inmunohistoquímica en secciones coronales de ratones de edad P0 de genotipo normal [*maLpar1*^{+/+}] (A), y de genotipo nulo [*maLpar1*^{-/-}] (B). El recuadro (en blanco, siendo x3 del señalado en negro) muestra la reducción significativa de marcaje en las capas corticales superficiales (en números romanos) de los ejemplares nulos en comparación con los de genotipo normal. (C, D) Marcaje para la β-III tubulina en secciones similares. Barra de escala en (A-B), 300 μm; (C, D) 175 μm. (E) Detección de GAP-43 en muestras proteicas electrotransferidas obtenidas por disección de las áreas corticales 1 y 2 (mostradas en A, B) en ratones normales y nulos de estadio P0. Obsérvese la reducción en el marcaje de los ratones *maLPA*₁-nulos, especialmente en la zona 1 correspondiente al área más superficial de la capa cortical II. (F) Cuantificación de la intensidad de las bandas mediante densitometría confirmando la menor expresión de GAP-43 en ausencia del receptor LPA₁ en ambas capas (indicadas 1, 2) (n=8; **, normal 1 vs. nulo 1, p < 0,001; *, normal 2 vs. nulo 2).

4.4.2. Apoptosis cortical embrionaria y postnatal en ratones maLPA₁-nulos

Diferentes trabajos han demostrado, con anterioridad, los efectos antiapoptóticos de la señalización mediada por LPA (Ye et ál., 2002; Kingsbury et ál., 2003). De especial relevancia fueron los desarrollados por Kingsbury et ál. (2003), en explantes de corteza, donde la inhibición de apoptosis durante la neurogénesis resulta en un incremento sustancial del grosor cortical (Kingsbury et ál., 2003). Resulta razonable pensar, por tanto, que, al ser eliminada la vía de señalización del receptor LPA₁, pueda tener lugar un aumento en los niveles de apoptosis, lo cual podría explicar la reducción en tamaño del encéfalo de los ratones maLPA₁-nulos así como las diferentes anomalías en el patrón migratorio o de diferenciación en destino. Por ello, decidimos analizar los niveles corticales de apoptosis mediante una técnica de detección colorimétrica basada en la técnica TUNEL (ver sección 3.5). El análisis se realizó en la corteza cerebral de embriones y en ejemplares postnatales. Los estadios elegidos para el experimento fueron dos representativos que permitieran observar tanto defectos tempranos tras las primeras fases de neurogénesis, como a largo plazo, en período postnatal, siendo por tanto E15.5, por tratarse, además, del estadio donde tiene lugar la mayor presencia de procesos de apoptosis durante el desarrollo (Thomaidou et ál., 1997) y P7, ya en periodo postnatal donde la corteza está más formada y que coincide con la mayor presencia de apoptosis (periodo P4-P7) (Gohlke et ál., 2004). No obstante, es preciso considerar la diferencia entre la muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo, y la que tiene por objeto optimizar el número final de neuronas y las conexiones sinápticas, más restringida al periodo de sinaptogénesis, entre P0 y P14 en ratón (Blaschke et ál., 1998; Gohlke et ál., 2004).

Tras realizar la técnica en secciones transversales de ejemplares E15.5, apreciamos un aumento significativo de células apoptóticas en la corteza de embriones carentes del receptor LPA₁, especialmente en la ZSV, respecto a los de genotipo salvaje (Fig. 46 A, B). El porcentaje de núcleos apoptóticos en los embriones maLPA₁-nulos fué prácticamente el doble respecto a los de genotipo normal (Fig. 46 E). Dadas las diferencias observadas y, por las alteraciones postnatales que se detectaron, se analizaron animales de edad P7 lo que, una vez más, vino a confirmar los mismos resultados, con aumento de apoptosis en la corteza de los ratones maLPA₁-nulos (Fig. 46 C), respecto a los de genotipo normal (Fig. 46 D), y que, si bien afectaba a las diferentes capas corticales, se daba de manera más pronunciada en las más profundas, V y VI, como demostraba, igualmente, la cuantificación realizada (Fig. D, E).

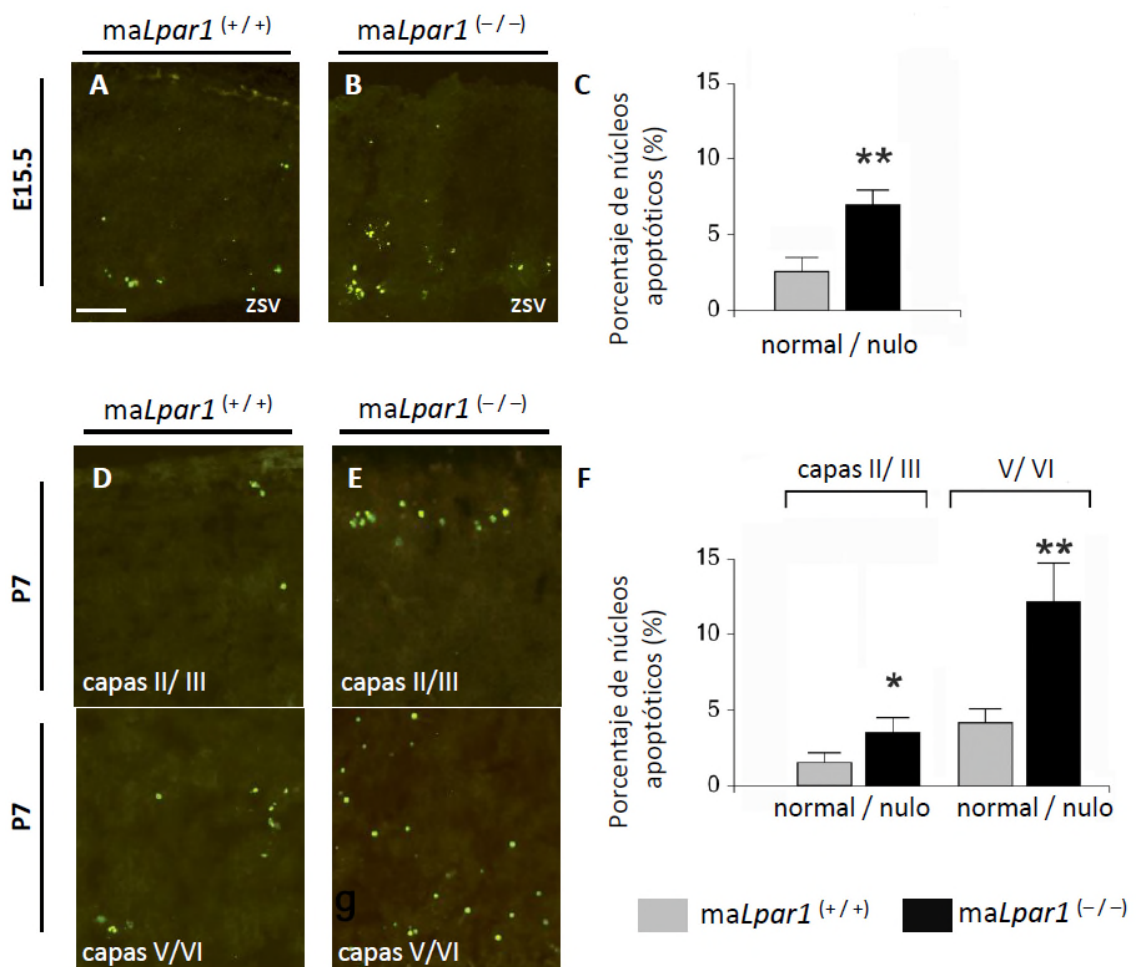


Figura 46. Aumento de apoptosis en la corteza cerebral de ratones Málaga nulos para LPA₁. (A, B, D, E) Fotografías representativas de criosecciones coronales de la corteza cerebral de embriones de edad E15.5 (A, B) y corteza, a nivel dorsomedial, de ratones adultos de edad P7 (D, E) de genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (A, D), y de genotipo nulo [*maLpar1*^(-/-)] (B, E) mostrando núcleos apoptóticos detectados por fluorescencia usando el sistema *DeadEnd*tm *fluorometric TUNEL System*. Zsv, zona subventricular. Barra de escala en (A-B), 150 μ m; (D, E) 115 μ m. (C, F) Cuantificación del porcentaje de núcleos apoptóticos detectados en las áreas corticales mencionadas. Aunque las diferencias entre cada genotipo para cada región fueron significativas, con aumento del número de células en apoptosis en ausencia del receptor LPA₁ la mayor presencia de apoptosis se presentó en E15.5 y en las capas profundas de la corteza en estadio postnatal. (n= 8*; P<0.005 en normal vs. nulo, P7 capas II/III, **; P<0.001 en normal vs. nulo, en E15.5 y P7 capas V/VI).

4.4.3. Reducción neuronal en la corteza cerebral de ratones maLPA₁-nulos

Dadas las alteraciones de proliferación y diferenciación, la aparente reducción de interneuronas, y el aumento de muerte celular, era preciso verificar si el menor tamaño cerebral de la corteza de los ratones *Málaga* nulos para LPA₁ era debido a pérdida neuronal. Para ello decidimos cuantificar la densidad numérica de las neuronas (*Nv*), detectadas de acuerdo a la presencia del marcador neuronal NeuN (Mullen et ál., 1992), en la corteza motora primaria (Fig. 47 A, B, rectángulo negro) y en la corteza somatosensorial (Fig. 47 A, B, rectángulo blanco) de individuos adultos (12 semanas) utilizando el método disector óptico (West, 1993). La cuantificación se realizó en los tres genotipos, para poder detectar mejor cualquier diferencia atribuible a la presencia/ausencia del receptor.

La corteza motora primaria se caracteriza por presentar una capa V bien destacada, que contiene una densidad relativamente baja de las grandes neuronas piramidales, y una capa IV estrecha que contiene neuronas granulares dispersas, tal y como se puede observar en el ratón de genotipo normal (Fig.47 D). En ausencia del receptor LPA₁ la corteza cerebral era más delgada de lo normal pero las capas corticales se encontraban definidas aunque sus límites fueran menos precisos. El cálculo del número de neuronas por unidad volumen (*Nv*) mostró que no había diferencias significativas entre los genotipos normal y nulo en las capas corticales I y IV (Tabla 3). Sin embargo, las capas II/III, V y VI del genotipo nulo presentaban una reducción significativa en el número de neuronas respecto al ratón normal, bien llamativa a nivel de las capas más profundas, V y VI, y en consonancia con los datos que mostraban mayor proporción de muerte celular en dichas capas (Tabla 3). Además, las comparaciones post hoc permitieron detectar diferencias más sutiles, demostrando diferencias significativas entre los ratones *Málaga* heterocigotos y homocigotos nulos en la capa cortical V, y, en las capas II/III y VI entre los ratones heterocigotos y normales (Tabla 3). El análisis de la corteza somatosensorial (Fig. 47 E, F; Tabla 3) demostró, una vez más, la reducción muy significativa de neuronas en el genotipo nulo respecto al normal, muy drástico en las capas profundas, en este caso en la capa V, y, de manera similar a la corteza motora, en las capas II/III. En conjunto, los datos demostraron la necesidad del receptor LPA₁ para el correcto mantenimiento del número de neuronas corticales.

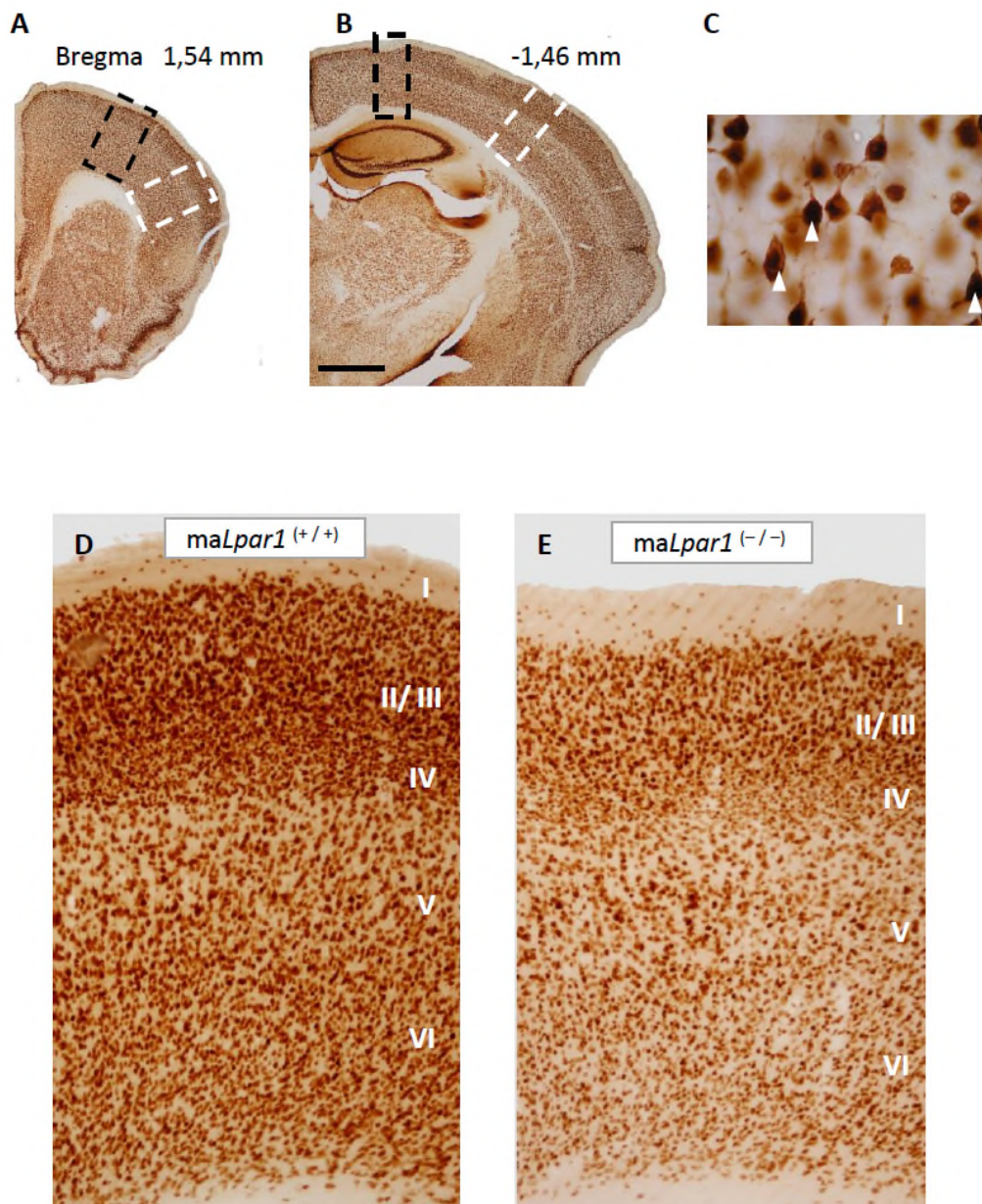


Figura 47. Reducción neuronal en la corteza cerebral de ratones Málaga nulos para LPA₁. (A, B) Secciones representativas de la inmunodetección de NeuN en la corteza cerebral de ratones adultos de 12 semanas de edad usadas para el análisis estereológico. Las secciones representan la parte más rostral (A) y caudal (B) (se indica Bregma) para el estudio de la corteza motora primaria (recuadro en negro) y la corteza somatosensorial (recuadro en blanco). Las secciones corresponden a un animal normal y son similares a las obtenidas para ratones heterocigotos y nulos para el receptor. (C) Imagen representativa en capa V de la sección anterior, que muestra con detalle las neuronas inmunorreactivas a NeuN. (D, E) Imágenes de secciones transversales de la corteza motora primaria de ratones adultos del genotipo normal [*maLpar1*^(+/+)] (D), y de genotipo nulo [*maLpar1*^(-/-)] (E) mostrando, merced a la expresión de NeuN, el patrón de laminación. Se indican las capas corticales en números romanos. Barra de escala en (A-B), 1 mm; (C) 200 μ m; (D, E) 55 μ m.

Genotipo	Corteza motora primaria			Corteza somatosensorial		
	(+/+)	(+/-)	(-/-)	(+/+)	(+/-)	(-/-)
Capa I	30.9 ± 2.21	24.6 ± 17.7	43.7 ± 7.44	50 ± 26	34 ± 15	45 ± 19.4
Capa II / III	250 ± 50.4	172 ± 8.02	164 ± 17.4 *	191 ± 63	187 ± 4.8	154 ± 20*
Capa IV	215 ± 6.16	185 ± 18.6	179 ± 9.75	226 ± 50	227 ± 16.3	201 ± 50
Capa V	148 ± 3.79	136 ± 9.58	113 ± 7.97 ** #	303 ± 34	121 ± 8.79	94 ± 16 **
Capa VI	228 ± 7.65	184 ± 2.28 *	159 ± 9.43 **	188 ± 26	181 ± 28	177 ± 28

Tabla 3. Cuantificación estereológica del número de neuronas corticales en los ratones adultos de los diferentes genotipos estudiados. Estimaciones de la densidad numérica de las neuronas (neuronas / mm³; expresados como la media ± SEM) en las diferentes capas corticales de la corteza motora primaria la corteza somatosensorial de ratones adultos, de 12 semanas de edad, del genotipo normal [*maLpar1*^(+/+), indicado como (+ / +)], heterocigoto [*maLpar1*^(+/-), indicado (+ / -)] y nulo [*maLpar1*^(-/-), indicado (-/-)]. (n =6; *, P <0,05 y **, P <0,005 en comparación con el genotipo normal; #, P <0,05 en comparación con el genotipo heterocigoto)..

5.DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en esta memoria demuestran que la señalización mediada por el receptor LPA₁ es necesaria para que tenga lugar una correcta neurogénesis cortical durante el desarrollo cerebral. Esta demostración ha sido posible gracias al análisis de una nueva variedad de ratón nulo para el receptor, la variedad *Málaga*, derivada del original descrito por Contos et ál. (2000) durante el proceso estandarizado de reproducción y expansión de la colonia de animales. La ausencia del receptor en los ratones malLPA₁-nulos genera un fenotipo caracterizado por una reducción de la población de progenitores corticales, aumento de apoptosis, y alteraciones en la formación de la corteza cerebral.

Los estudios previos de ganancia de función han sido esenciales para entender los mecanismos ligados a la señalización mediada por el LPA, especialmente en los ratones carentes de los receptores LPA₁ y LPA₂. (Kingsbury et ál., 2003, 2004). Sin embargo, hasta ahora los animales nulos descritos hasta la fecha no habían mostrado alteraciones destacadas a nivel cortical (Contos et ál., 2000, 2002) por lo que resultaba imposible demostrar, más allá de la administración exógena de LPA, un papel in vivo para el receptor LPA₁. Es precisamente por este motivo por el que el aporte más relevante del trabajo que hemos realizado es demostrar la necesidad de la expresión del receptor LPA₁ in vivo para el desarrollo cortical.

Las observaciones in vivo en ausencia del receptor muestran una zona proliferativa reducida, con una expresión prematura de marcadores neuronales en la ZV, ZSV y ZI. Los neuroblastos corticales derivados de los ratones malLPA₁-nulos muestran una reducción de la población proliferativa de inicio y una relativa sobreproducción de células diferenciadas, en consonancia con nuestras observaciones in vivo así como con cambios similares descritos con anterioridad (Kingsbury et ál., 2003; Rehen et ál., 2006). Estos datos parecen indicar que los efectos son intrínsecos de las células corticales y no debido a la presencia de factores indirectos en la zona. Los estudios in vitro de administración exógena de LPA sobre neuroblastos permitieron proponer a las neuronas postmitóticas como fuente exógena de LPA que actuaría sobre los precursores neurales de la ZV a modo de control por retroalimentación e induciendo, por medio de cambios en el citoesqueleto, la retracción de prolongaciones celulares, la esfericidad celular y la migración nuclear intercinética (Fukushima et ál., 2000, 2002, 2004). Los mismos estudios proponen que, por procesos similares, en neuronas más

viejas causaría una parada del cono de crecimiento axonal y una modulación de su orientación. De acuerdo a esto, la ausencia de LPA₁ debería esperar que, en fases iniciales de neurogénesis, generara un aumento en la proporción de neuronas fusiformes, tal como se observa en nuestros resultados que muestran, en los embriones malLPA₁-nulos, células con destino inexacto, con expresión de β -tubulina de forma prematura y con morfología alargada en la presunta zona proliferativa donde en los individuos de genotipo normal no concurren estos fenómenos.

Los resultados también muestran que, de manera paralela a estos procesos, tiene lugar una reducción en el número de figuras mitóticas, siempre respecto a un momento dado no acumulado. No sólo se trata de la capacidad proliferativa sino del modo de división. La señalización por LPA afecta el desarrollo normal de la ZV y ZSV. Las proporciones de divisiones simétricas no terminales, simétricas terminales, y asimétricas se solapan durante el desarrollo en un equilibrio que determina la capacidad para generar, en primer lugar, una población significativa de células progenitoras y, una vez alcanzado un nivel crítico, y por medio de divisiones asimétricas, una población progenitora y otra de precursores que diferenciarán para poder generar los diferentes subtipos de células neurales (Noctor et ál., 2004). Por los resultados que mostramos aquí, la ausencia del receptor LPA₁ conlleva en la célula cambios de orientación del huso mitótico que resultan en un aumento de las proporciones de los precursores apicales con plano de división horizontal y oblicuo que, con toda probabilidad y según está ampliamente descrito, se dividirán por medio de división asimétrica (Haydar et al. 2003; Noctor et ál., 2004; Götz and Huttner 2005).

El receptor LPA₁ se acopla a tres tipos de proteínas G: G α i/o, G α q/11, G α 12/13, activando, entre otras, las vías de señalización por MAPK, fosfolipasa C, Akt, y Rho, e inhibiendo la mediada por la adenilato ciclasa (Choi et ál., 2010). Los estudios de Fukushima et ál., (2007) demostraban que la diferenciación neuronal mediada por LPA a través del receptor LPA₁ tenía lugar merced a la interacción con la subunidad G α i/o. Resulta interesante observar que, además, la sobreexpresión de esta subunidad parece ser responsable de desestabilización del huso mitótico (Du y Macara, 2004). Los últimos estudios demuestran un papel ciertamente relevante para los progenitores intermedios. La división simétrica en las etapas tempranas generará progenitores apicales cuya población se expandirá lateralmente y radialmente transformándose, en este último caso, en las llamadas (por razones históricas) células de la glia radial (CGR) (Noctor et ál., 2004; Götz y Huttner, 2005; Tan y Shi, 2013), que serán la mayoría de la población progenitora en la ZV y que no dejan de ser igualmente progenitores apicales, células troncales neurales, capaces de generar otro tipo de progenitores, neuronas y células

gliales. La división de las CGR apicales suele ser simétrica en estadios iniciales, para facilitar su propia renovación pero conforme avanza la neurogénesis será asimétrica para dar lugar a una CGR y una célula hija que, bien migrará hacia la superficie y diferenciará en neurona, o bien migrará a la ZSV para dar lugar a un progenitor intermedio. Estos progenitores intermedios son capaces de generar en la fase neurogénica, de manera simétrica, dos neuronas (Haydar et ál. 2003; Haubensak et ál. 2004; Miyata et ál. 2004; Noctor et ál. 2004; Götz and Huttner 2005; Kriegstein et al. 2006). A la vista de los resultados que muestran una preponderancia de las divisiones con plano horizontal/oblícuo en los progenitores nulos para LPA₁, debería tener lugar un incremento de división de los progenitores intermedios. Sin embargo nuestras observaciones no muestran un aumento de las divisiones apoventriculares sino un aumento de maduración neuronal temprana y de apoptosis. En este sentido, sería preciso considerar, como una posible explicación, los cambios de polaridad celular y reestructuración de procesos apicales/basales en el embrión de genotipo nulo (observados por el aumento de células fusiformes con expresión de β -tubulina que se orientan de manera paralela a la superficie ventricular) dada su relevancia en el control de la división y destino celular (Miyata et ál. 2004; Götz and Huttner 2005; Cappello et ál., 2006; Buchman and Tsai, 2007). De esta manera, ambos, la proliferación deficiente y los cambios morfológicos debidos a la ausencia del receptor LPA₁ generarían (bien uno, bien ambos, no son excluyentes) una asimetría incompleta que produciría células de la ZV y ZSV, con maduración temprana, deslocalizadas, con la viabilidad comprometida, lo que conduciría a la apoptosis.

Sin embargo, más allá de estas explicaciones, cabe preguntarse si, por un lado, la mayor presencia de divisiones simétricas debería generar necesariamente un aumento de progenitores intermedios y, si realmente, la reducción del número de mitosis es indicativa de una menor tasa de división. Los resultados de la expresión de alguno de los factores involucrados en estos procesos llaman bastante la atención. La expresión de manera secuencial de los factores de transcripción *Pax6* y *Tbr2* termina en la diferenciación de los precursores neurales hacia progenitores intermedios de la ZSV (Englund et ál., 2005; Vasistha et ál., 2005; Quinn et ál., 2007). Considerando que la identidad de los progenitores intermedios de la ZSV viene determinada, como hemos mencionado, por una regulación al alza de *Tbr2* y otra, a la baja de *Pax6*, nuestros resultados apoyarían que la ausencia del receptor LPA₁ induciría abandonar antes de tiempo la condición de progenitor apical (bajada de expresión de *Pax6*) con una salida de ciclo prematura por parte de los precursores neurales y la inmediata adquisición de identidad de progenitor intermedio (*Tbr2*) en ZSV. Esta salida

prematura quedaría confirmada además, por la alteración de la expresión de *Tis 21* y *Ngn1* y *Ngn2*. Especialmente por la expresión de *Tis21*, cuya expresión se da en células que no suelen generar neuronas directamente, sino progenitores basales intermedios que darán lugar a neuronas (Attardo et ál., 2008, 2010). Así, frente al comportamiento normal en el que, en E14.5 hay una fracción destacada de precursores con expresión de *Tis21* que van a dar lugar a progenitores intermedios, en el animal nulo para el receptor no se completa este requisito, habida cuenta del aumento de células que ya han salido prematuramente. En ese desequilibrio, también tendría su razón de ser la anomalía en el patrón de expresión de *Ngn1* y *Ngn2*, con un desajuste temporal, diferente en E14.5 y E16.5, de lo que deberían ser dos expresiones proporcionales. Por tanto, y en relación con lo expuesto anteriormente, la carencia del receptor generaría progenitores intermedios antes de tiempo. No resulta lógico pensar que no sea posible un aumento de mitosis apoventriculares capaces, por tanto, de aumentar el número de progenitores intermedios, habida cuenta de que se parte de una menor población proliferativa con divisiones anómalas condujentes a maduración temprana y que, a pesar de ello, se alcanzan patrones de expresión de *Tbr2* similares a los del genotipo normal. Junto a estos patrones de división y diferenciación anómalos hay que considerar, por ello, el modelo propuesto de divisiones aceleradas en los experimentos in vitro de marcaje con BrdU. Es precisamente con ese supuesto con el que podemos interpretar más adecuadamente la aparente reducción del número de mitosis inmunorreactivas a H3 y que bien podría deberse a que, ante un número acelerado de mitosis continuadas, un análisis en un punto temporal restringido es incapaz de hacer visible un incremento del número de mitosis en una escala mayor de tiempo. No obstante, los procesos de divisiones aceleradas se han demostrado que generan, de manera general y si no concurren otros factores, una ZSV expandida (Charvet y Striedter, 2011) por lo que, resulta necesario añadir elementos adicionales que puedan explicar parte de los fenómenos observados.

En ese sentido, y como se ha citado la muerte celular programada, que juega un importante papel durante el desarrollo cortical (Blaschke et ál., 1996, 1998), parece jugarlo también en nuestro caso. Uno de los resultados de la adquisición prematura de determinados caracteres es el aumento de apoptosis cortical que presentan los embriones maLPA₁-nulos, en consonancia con el papel propuesto para el LPA como regulador necesario para la supervivencia neuronal y la correcta formación cortical (Ye et ál., 2002; Kingsbury et ál., 2003, 2004). A tenor de los resultados presentados en esta memoria, los efectos de la ausencia del receptor resultan en la suma cooperativa de proliferación alterada y apoptosis. Aunque las

observaciones in vivo e in vitro son consistentes respecto al papel en el balance supervivencia/apoptosis, deberíamos considerar algunas discrepancias respecto a su papel en proliferación habida cuenta de los trabajos que demuestran que el LPA podría provocar un aumento del número de células en mitosis sin aumentar la proliferación per se, es decir, aumentando las mitosis terminales e inhibiendo la apoptosis (Kingsbury et ál., 2003, 2004). En ese sentido, parece claro que la ausencia del receptor en los animales maLPA₁-nulos demuestra que éste actúa directamente sobre procesos proliferativos, y que no sólo se trata de la regulación de un equilibrio entre división celular y muerte celular programada. El embrión maLPA₁-nulo muestra una disminución significativa del número de mitosis, tanto de localización ventricular como apoventricular. Sin embargo, y aún cuando no consideráramos elementos adicionales como el efecto de las múltiples divisiones aceleradas, resulta difícil establecer la influencia de los procesos mitóticos en la tasa final de apoptosis en lugar de considerar, de manera más lógica, que la apoptosis vendrá determinada por la adquisición de un estado postmitótico prematuro, más aún cuando la apoptosis vinculada a la proliferación neuronal no se hace evidente hasta que las células postmitóticas están presentes (Blaschke et ál., 1998).

Como se ha mencionado, las células de la ZSV juegan un importante papel en el mantenimiento de la expansión cortical y se conoce la existencia de factores reguladores capaces de inducir el destino de los progenitores apicales de la ZV hacia progenitores de ZSV, adquiriendo determinantes de división y de destino celular propios de progenitores de la ZSV (Cappello et ál., 2006). El LPA ha sido propuesto como uno de ellos, siendo liberado desde las células postmitóticas para influir en la organización nuclear, la morfología, y la migración de las células de la ZV (Fukushima et ál., 2000, 2002). En ambos casos, tanto la adición exógena de LPA como la carencia del receptor LPA₁, tienen un efecto directo sobre la organización y maduración de la ZSV. Sin embargo, mientras que el LPA produce in vitro un desplazamiento de células mitóticas hacia células de ZSV (Kingsbury et ál., 2003, 2004; Rehen et ál., 2006) y cambios morfológicos en las prolongaciones celulares (Fukushima et ál., 2000, 2002; Rehen et ál., 2006) que no están, no obstante, en discrepancia con una liberación postmitótica de LPA a demanda de la proporción existente de precursores neurales (Fukushima et ál., 2000), la delección de LPA₁ en los animales nulos tendría como resultado el bloqueo real de este control postmitótico sobre los precursores neurales de la ZV, desencadenando un ciclo celular defectuoso y una reducción de la proliferación, con las consecuencias que hemos descrito.

Durante el desarrollo embrionario normal se ha visto que las diferencias en la proliferación de células neuroprogenitoras pueden conducir a variaciones en el grosor de las capas de la corteza cerebral (Caviness et al. 1995; Rakic 1995). Tanto los factores intrínsecos celulares como los extrínsecos contribuyen a los cambios en la producción de células, afectando el crecimiento cortical y la supervivencia neuronal. Los mecanismos genéticos y moleculares que se encuentran detrás de estos procesos no se encuentran totalmente definidos. Se ha demostrado desde hace tiempo que factores extrínsecos en el medio cercano a las células neuroprogenitoras de la zona ventricular son capaces de regular su destino (Campbell 2005). Las alteraciones de las células neuroprogenitoras en los embriones nulos para LPA₁ que hemos descrito en este trabajo proporcionan evidencias de la participación de la señalización mediada por el LPA₁ en estos procesos neurogénicos, particularmente aquellos que conciernen a la maduración y a la apoptosis. Además de las alteraciones en la proliferación y supervivencia, una considerable cantidad de neuronas del prosencéfalo en los ratones nulos para LPA₁ parece quedarse en las capas corticales más profundas en lugar de migrar a zonas más superficiales. Este dato es consistente con el posicionamiento anormal de las células corticales nulas para LPA₁ y el aumento de apoptosis postnatal en las capas V y VI. Mientras que el receptor LPA₁ se expresa principalmente en la ZV, el receptor LPA₂ se expresa también en las regiones postmitóticas al final de la neurogénesis (Hecht et ál., 1996; Contos and Chun, 2001). Más tarde en el desarrollo, una compensación parcial del receptor LPA₂ podría rescatar algunas de estas neuronas con posición anómala. El resultado de esta compensación daría lugar a la corteza anormal, pero con la disposición habitual de capas distinguible, que encontramos en el ratón maLPA₁-nulo. Por otra parte el análisis en estos animales de las vías de migración tangencial, los estudios de las vías corticofugales y talamocorticales, así como la localización de interneuronas con expresión de parvoalbúmina sugiere defectos locales en destino, más que defectos de tipo migratorio, si bien, es preciso realizar más análisis para discriminar adecuadamente si se puede tratar bien de un defecto en la capacidad de las células para alcanzar su destino o bien una diferenciación anómala, o incluso de una combinación de ambos.

La expresión de GAP-43 está relacionada con la formación de sinapsis, la plasticidad neuronal y el desarrollo de la inervación serotoninérgica en el cerebro (Donovan et al 2002). La reducida expresión perinatal de GAP-43 en la corteza del ratón maLPA₁-nulo sugiere que algunas de los defectos y secuelas debidos a la ausencia de LPA₁ se encontrarían vinculados a la función de GAP-43. De esta manera, una conectividad sináptica anómala podría

perfectamente producir defectos de excitabilidad neuronal y un aumento de la apoptosis. Son necesarios más estudios para ver consecuencias de estos defectos corticales. No obstante, resulta muy interesante la relación de GAP-43 y su necesidad para un adecuado desarrollo del sistema serotoninérgico. En consonancia con el trabajo inicial de Harrison et ál. (2003), en ausencia del receptor LPA₁, y por comparación con el fenotipo silvestre, los ratones maLPA₁-nulos manifiestan un claro déficit exploratorio cuando son expuestos a contextos espaciales novedosos en la prueba de campo abierto, así como un aumento del comportamiento de tipo ansioso en la prueba del laberinto en cruz elevado (Santín et ál., 2009). Una posible causa de estas anomalías, podría relacionarse con las deficiencias en el sistema serotoninérgico presentes en los ratones nulos para el LPA₁ (Harrison et ál., 2003), ya que esta carencia puede modificar e influir sobre las respuestas emocionales como la ansiedad, el estrés o la depresión (Parks et ál., 1998; Lopez et ál., 1999; Mueller y Beck, 2000; Belzung y Griebel, 2001; Joca et ál., 2007; Savitz et ál., 2009) y parte de la misma pudiera tener su origen en los defectos observados en la expresión de GAP-43..

Recientemente, mediante técnicas de marcaje de linaje celular y expresión condicionada se ha demostrado que los progenitores intermedios contribuyen de manera significativa a la laminación cortical y al engrosamiento de las capas corticales pero además, de manera significativa, contribuyen al desarrollo de un 65% las neuronas glutamatérgicas de todas las capas corticales, no así las GABAérgicas o los linajes celulares de tipo astrocítico (Vasistha et ál., 2015). En los animales nulos para LPA₁ hemos descrito que, aun habiendo una reducción de la población proliferativa en la ZV así como de la expresión de Pax6, no se observaron diferencias de expresión en Tbr2 en la ZSV, por lo que parecía demostrar una salida temprana del ciclo y una adquisición, antes de tiempo, del fenotipo de progenitor intermedio, indicando una maduración rápida anómala, con las consecuencias que, a largo plazo, termina por generar en el animal adulto donde, además de otros muchos defectos específicos, tiene lugar una clara alteración del sistema glutamatérgico (Roberts et ál., 2005; Harrison et ál., 2003; Murph et ál., 2008; Musazzi et ál., 2010; Blanco et ál., 2012). Las observaciones de Vasistha et ál. (2015) parecen aportar, con ello, un nexo de unión entre las anomalías en las poblaciones glutamatérgicas y las posibles alteraciones corticales tempranas en dichas neuronas, con independencia de las adquiridas posteriormente en procesos neurogénesis y maduración en el individuo adulto y, cuando menos, si no son causa de aquellas, sí que aumentarían, en determinados casos, la susceptibilidad a alteraciones del sistema glutamatérgicoadulto.

Por otra parte, hay diferentes elementos que han de sumarse a todos los estudios citados. En el momento en que esta tesis doctoral se concluyó desde su apartado experimental aún quedaban una serie de aspectos por estudiar de relevancia para el papel del receptor LPA₁ en el desarrollo cortical. Uno de ellos es el que incorpora a otra serie de protagonistas presentes en el nicho neurogénico, como es el caso de los astrocitos. Los astrocitos juegan un papel fundamental en el desarrollo, produciendo diferentes citoquinas, factores de crecimiento, y componentes de matriz extracelular, que actúan coordinando la comunicación neuroglial y cuya influencia en el desarrollo cortical es evidente (Sloan y Barres, 2014), además de actuar sobre la proliferación de los neuroblastos de manera indirecta (Spohr et ál., 2008, 2011)

La variante *Málaga* de ratón nulo para LPA₁ permite demostrar una función para el receptor LPA₁ en el desarrollo normal de la corteza cerebral y en el mantenimiento de las poblaciones de células neuroprogenitoras que no han permitido otras variantes de animales nulos para LPA₁ descritas hasta la fecha. Las anomalías neurales descritas en la variante *Málaga* prueban la existencia de modificadores genéticos no identificados aun, a tenor de las similitudes fenotípicas de esta variante con el resto de animales nulos para el receptor. La razón por la que apareció el fenotipo modificado del ratón *maLPA₁*-nulo no la conocemos. Debemos remarcar que la presencia de modificadores genéticos desconocidos que actúan un alelo con mutación es un hecho bastante común en el estudio de las variaciones espontáneas de fenotipos mutantes de animales y suelen venir influidas por el fondo genético de la cepa donde se han desarrollado (Sibilia y Wagner, 1995). Alguno de los ejemplos bien conocidos de modificaciones genéticas que afectan al desarrollo cerebral incluyen los animales deficientes en caspasa, o las asociadas al alelo *Orl* del ratón *reeler* (Goffinet 1990; Rice and Curran 2001; Leonard et al. 2002; Nadeau 2002; Bergren et al. 2005). En todos estos casos, como en la amplia mayoría de diferencias específicas dependientes de cepa, el tipo o variedad de modificadores genéticos es desconocido. Los modificadores genéticos, como otros genes, virus, retrotransposones, etc, pueden contribuir al desarrollo de un nuevo fenotipo y su identificación excede del propósito de nuestro estudio, además de requerir un trabajo cuantioso y con elevado coste. Sin embargo, considerando que el ratón *Málaga* nulo para LPA₁ ha permitido establecer y caracterizar un fenotipo reproducible y con alta penetrancia, entendemos que debe servir como punto de partida hacia la identificación futura y comprensión de genes y otros diferentes factores que interactuen con la expresión del receptor LPA₁.

Resulta evidente la relevancia de los resultados que hemos mostrado en este trabajo, especialmente si se tiene en cuenta toda la serie de estudios que han sido resultado de este punto de partida y que han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación, así como otros ajenos.

Los estudios realizados hasta la fecha por medio de aproximaciones experimentales tales como la deleción génica, que permitiera el desarrollo de animales nulos carentes de los receptores específicos, han representado una herramienta de indudable valía para demostrar la necesidad de, al menos, la expresión del receptor LPA₁ para el desarrollo normal de la función cerebral y su función en numerosos procesos que incluyen la proliferación y diferenciación neural, supervivencia celular, sinapsis, neurotransmisión, o el balance neuroquímico, en diferentes áreas cerebrales y, de manera notable, en el hipocampo. Actualmente, son ya numerosos los trabajos que muestran alteraciones que afectarían a los procesos cognitivos y emocionales en correlación con las alteraciones estructurales y neuroquímicas descritas y que se han detallado ampliamente en la introducción y son diversos los grupos a nivel nacional e internacional que han requerido de la variedad *Málaga* de ratones nulos para LPA₁ para el desarrollo de diferentes estudios.

6. CONCLUSIONES

1) La ausencia del receptor LPA₁ en el ratón nulo para LPA₁ de la variedad *Málaga* viene asociada a una alteración del patrón proliferativo de la zona ventricular embrionaria durante el desarrollo de la corteza cerebral, con una reducción del tamaño de la zona ventricular así como del número de mitosis, expresión de marcadores neuronales de forma prematura en la capa cortical y alteración de la expresión de factores de transcripción.

2) La delección del receptor en el ratón nulo para LPA₁ de la variedad *Málaga* altera la proporción del tipo de división celular presente en la zona proliferativa, observación que se correlaciona con el aumento de la proporción de divisiones asimétricas y la salida temprana del ciclo celular que se observa en cultivo de neuroblastos corticales de dichos animales.

3) En la corteza cerebral del ratón nulo para LPA₁ de la variedad *Málaga* las neuronas postmitóticas que, durante la neurogénesis migran hacia la superficie pial para incorporarse a las correspondientes capas corticales se acumulan de manera anómala en las capas profundas de la corteza cerebral y muestran, con ello, un patrón migratorio defectuoso.

4) En el ratón nulo para LPA₁ de la variedad *Málaga*, los defectos observados durante el desarrollo vienen asociados a un déficit perinatal en la expresión de la proteína GAP43, indicativo de alteraciones de tipo plástico, estructural y funcional durante los primeros estadios de la corticogénesis.

5) El ratón adulto nulo para LPA₁ de la variedad *Málaga* muestra reducción del grosor cortical, un nivel elevado de apoptosis en las capas corticales profundas, presente también en estadios anteriores, y reducción del número de neuronas en las capas II/III, V, y VI de la corteza cerebral, consecuencia, o cuando menos, indicativos, de los defectos en neurogénesis que presentan durante el desarrollo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams RJ (1996). Metaphase spindles rotate in the neuroepithelium of the rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 16: 7610-7618.
- Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J (2015). Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *Journal of Biochemistry* 157: 81-89. *Experimental Cell Research* 333: 171-177.
- Akahoshi N, Ishizaki Y, Murashima YL, Shinba T, Goto K, Himi T, Chun J, Ishii I (2011). Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2. *Epilepsy & Behavior* 22:659-665.
- Albers HM, Dong A, van Meeteren LA, Egan DA, Sunkara M, van Tilburg EW, Schuurman K, van Tellingen O, Morris AJ, Smyth SS, Moolenaar WH, Ovaa H (2010). Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 7257-7262.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM (2002). Neurogenesis in the adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience* 22: 629-634.
- Angevine JB Jr, Sidman RL (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766-768.
- Anliker B, Choi JW, Lin ME, Gardell SE, Rivera RR, Kennedy G, Chun J (2013). Lysophosphatidic acid (LPA). and its receptor, LPA₁, influence embryonic schwann cell migration, myelination, and cell-to-axon segregation. *Glia*. 61: 2009-2022.
- Anliker B, Chun J (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 457-465.
- Anliker B, Chun J (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279: 20555-20558.
- Aoki J (2004). Mechanisms of lysophospholipid acid production. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 477-489.
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S (2008). Two pathways for lysophospholipid acid production. *Biochimica et Biophysica Acta* 1781: 513-518.
- Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R, Arai H (2002). Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *Journal of Biological Chemistry* 277: 48737-48744.

- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F, Huttner WB (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nature Communications* 2: 154.
- Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB (2008). Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One* 3: e2388.
- Attardo A, Fabel K, Krebs J, Haubensak W, Huttner WB, Kempermann G (2010). Tis21 expression marks not only populations of neurogenic precursor cells but also new postmitotic neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cerebral Cortex* 20: 304-314.
- Baker DL, Umstot ES, Desiderio DM, Tigyi GJ (2000). Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 905: 267-269.
- Baker JR (1946). The histochemical recognition of lipine. *Quarterly Journal of Microscopy Science* 87:441-470.
- Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Letters* 478: 159-165.
- Bektas M, Payne SG, Liu H, Goparaju S, Milstien S, Spiegel S (2005). A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *Journal of Cell Biology* 169: 801-811.
- Bergren SK, Chen S, Galecki A, Kearney JA (2005). Genetic modifiers affecting severity of epilepsy caused by mutation of sodium channel Scn2a. *Mammalian Genome* 16:683-690.
- Birgbauer E, Chun J (2006). New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2695-2701.
- Blanco E, Bilbao A, Luque-Rojas MJ, Palomino A, Bermudez-Silva FJ, Suarez J, Santin LJ, Estivill-Torres G, Gutierrez A, Campos-Sandoval JA, Alonso-Carrion FJ, Marquez J, de Fonseca FR (2012). Attenuation of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA₁ receptors. *Psychopharmacology* 220: 27-42.
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122: 1165-1174.

- Blaschke AJ, Weiner JA, Chun J. (1998). Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 396: 39-50.
- Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, Guigne C, Prevot D, Ferry G, Boutin JA, Carpene C, Valet P, Saulnier-Blache JS (2005). Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48:569-577.
- Bowden NA, Weidenhofer J, Scott RJ, Schall U, Todd J, Michie PT, Tooney PA (2006). Preliminary investigation of gene expression profiles in peripheral blood lymphocytes in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 82:175-183.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bravo R, Macdonald-Bravo H (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *Journal of Cell Biology* 105: 1549-1554.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* 9:883-897.
- Buchman JJ, Tsai L. 2007. Spindle regulation in neural precursors of flies and mammals. *Nature Reviews Neuroscience* 8:89--100.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 110-122.
- Callaerts-Vegh Z, Leo S, Vermaercke B, Meert T, D'Hooge R (2012). LPA(5) receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes, Brain, and Behavior* 11: 1009-1019.
- Cameron RS, Rakic P (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4: 124-137.
- Campbell K (2005). Cortical Neuron Specification: It Has Its Time and Place. *Neuron* 46, 373-376.

- Canning CA, Lee L, Irving C, Mason I, Jones CM (2007). Sustained interactive Wnt and FGF signaling is required to maintain isthmic identity. *Developmental Biology* 305: 276-286.
- Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Brauninger M, Eilken HM, Rieger MA, Schroeder TT, Huttner WB, et al. (2006). The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nature Neuroscience*. 9:1099--1107.
- Caric D, Gooday D, Hill RE, McConnell SK, Price DJ (1997). Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development* 124: 5087-5096.
- Castilla-Ortega E, Escuredo L, Bilbao A, Pedraza C, Orio L, Estivill-Torrús G, Santín LJ, de Fonseca FR, Pavón FJ (2004). 1-Oleoyl lysophosphatidic acid: a new mediator of emotional behavior in rats. *PLoS One* 9: e85348.
- Castilla-Ortega E, Hoyo-Becerra C, Pedraza C, Chun J, Rodriguez De Fonseca F, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2011a). Aggravation of chronic stress effects on hippocampal neurogenesis and spatial memory in LPA(1) receptor knockout mice. *PLoS one* 6: e25522.
- Castilla-Ortega E, Pedraza C, Chun J, de Fonseca FR, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2012). Hippocampal c-Fos activation in normal and LPA(1)-null mice after two object recognition tasks with different memory demands. *Behavioural Brain Research* 232: 400-405.
- Castilla-Ortega E, Pedraza C, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2011b). When is adult hippocampal neurogenesis necessary for learning? evidence from animal research. *Reviews in the Neurosciences* 22: 267-283.
- Castilla-Ortega E, Sanchez-Lopez J, Hoyo-Becerra C, Matas-Rico E, Zambrana-Infantes E, Chun J, De Fonseca FR, Pedraza C, Estivill-Torrus G, Santin LJ (2010). Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA₁ receptor. *Neurobiology of Learning and Memory* 94: 73-82.
- Caviness VS Jr, Takahashi T, Nowakowski RS (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends in Neurosciences* 18: 379-383.
- Cervera P, Tirard M, Barron S, Allard J, Trottier S, Lacombe J, Dumas-Duport C, Sokoloff P (2002). Immunohistological localization of the myelinating cell-specific receptor LP(A1). *Glia* 38: 126-136.

- Chamberlain CJ (1932). *Methods in Plant Histology*. University of Chicago Press. Chicago, Estados Unidos.
- Charvet CJ, Striedter GF (2011). Causes and consequences of expanded subventricular zones. *European Journal of Neuroscience* 34: 988-993.
- Chenn A, McConnell SK (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch 1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82: 631-641.
- Chi XX, Nicol GD (2010). The sphingosine 1-phosphate receptor, S1PR(1), plays a prominent but not exclusive role in enhancing the excitability of sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* 104: 2741-2748.
- Choi JW, Chun J (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831: 20-32.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 157-186.
- Chun J, Brinkmann V (2011). A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya). *Discovery Medicine* 12:213-228.
- Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G (2002) International union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological Reviews* 54: 265-269.
- Chun J (2005). Lysophospholipids in the nervous system. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 77: 46-51.
- Contos JJ, Chun J (1998). Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, lpA1/vzg-1/Gpchr26. *Genomics* 51: 364-378.
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J (2000). Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13384-13389.
- Contos JJ, Ishii I, Chun J (2000). Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular Pharmacology* 58: 1188-1196.
- Contos JJ, Chun J (2001). The mouse lpA3/Edg7 lysophosphatidic acid receptor gene: genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Gene* 267: 243-253.

- Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J (2002). Characterization of *lpa2* (*Edg4*) and *lpa1/lpa2* (*Edg2/Edg4*) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to *lpa2*. *Molecular Cell Biology* 22: 6921-6929.
- Contos JJA, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J (2000). Requirement for the *lpa₁* lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13384- 13389 .
- Cruz-Orive LM (1987). Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *Journal of Microscopy* 145: 121-142.
- Czech B, Pfeilschifter W, Mazaheri-Omrani N, Strobel MA, Kahles T, Neumann-Haefelin T, Rami A, Huwiler A, Pfeilschifter J (2009). The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389:251-256.
- Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelt B, Traganos F (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 25: 1-13.
- Dash PK, Orsi SA, Moody M, Moore AN (2004). A role for hippocampal Rho-ROCK pathway in long-term spatial memory. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322: 893-898.
- De Carlos JA, O'Leary DD (1992). Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *Journal of Neuroscience* 12: 1194-1211.
- Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D (2001). The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635--4644.
- Dennis J, White MA, Forrest AD, Yuelling LM, Nogaroli L, Afshari FS, Fox MA, Fuss B (2008). Phosphodiesterase- α /autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Molecular and Cellular Neuroscience* 37: 412-424.
- Dircks L, Sul HS (1999). Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. *Progress in Lipid Research* 38: 461-479.
- Donovan SL (2002). GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation in forebrain. *Journal of Neuroscience* 22: 3543-3552.

- Du Q, Macara IG (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119: 503–516.
- Dubin AE, Bahnson T, Weiner JA, Fukushima N, Chun J (1999). Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *Journal of Neuroscience* 19: 1371-1381.
- Eder AM, Sasagawa T, Mao M, Aoki J, Mills GB (2000). Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clinical Cancer Research* 6: 2482-2491.
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochemical Journal* 291:677-680.
- Eisenstat DD, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, Ghattas I, Puelles L, Rubenstein JL (1999). DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *Journal of Comparative Neurology* 414: 217-237.
- English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, Brindley DN, Garcia JG (1999). Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 8: 627-634.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 2005;25:247-251.
- Estivill-Torres G, Pearson H, Van Heyningen V, Price DJ, Rashbass P (2002). Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129: 455-466.
- Feng Y, Walsh CA (2004). Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron* 44: 279-293.
- Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomar P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS (2003). Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *Journal of Biological Chemistry* 278: 18162-18169.

- Fonseca M, Del Río JA, Martínez A, Gómez S, Soriano E (1995). Development of calretinin immunoreactivity in the neocortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 361: 177-192.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Pappas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V (2010). ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental Biology* 339: 451-464.
- Friauf E, McConnell SK, Shatz CJ (1990). Functional synaptic circuits in the subplate during fetal and early postnatal development of cat visual cortex. *Journal of Neuroscience* 10: 2601-2613.
- Frisca F, Sabbadini RA, Goldshmit Y, Pébay A (2012). Biological effects of lysophosphatidic acid in the nervous system. *International Review of Cell and Molecular Biology* 296: 273-322.
- Frugier T, Crombie D, Conquest A, Tjhong F, Taylor C, Kulkarni T, McLean C, Pebay A (2011). Modulation of LPA receptor expression in the human brain following neurotrauma. *Cellular and Molecular Neurobiology* 31:569-577.
- Fujita R, Ma Y, Ueda H (2008). Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia. *Journal of Neurochemistry* 107: 152-160.
- Fujiwara Y, Sebok A, Meakin S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tigyi G (2003). Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 87: 1272-1283.
- Fukushima N, Chun J (2001). The LPA receptors. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 64:21-32.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J (2001). Lysophospholipid receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 507-534.
- Fukushima N, Ishii S, Tsujiuchi T, Kagawa N, Katoh K (2015). Comparative analyses of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72: 2377-2394.
- Fukushima N, Kimura Y, Chun J (1998). A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6151-6156.

- Fukushima N, Morita Y (2006). Actomyosin-dependent microtubule rearrangement in lysophosphatidic acid-induced neurite remodeling of young cortical neurons. *Brain Research* 1094: 65-75.
- Fukushima, N., Shano, S., Moriyama, R., and Chun, J. (2007). Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA1-G(i/o). pathway. *Neurochemistry International* 50: 302-307.
- Fukushima N, Weiner JA, Chun J (2000). Lysophosphatidic acid (LPA). is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Developmental Biology* 228: 6-18.
- Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Contos JJ, Rehen SK, Kingsbury MA, Kim KY, Chun J (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20: 271-282.
- Fukushima N (2004). LPA in neural cell development. *Journal of Cell Biochemistry* 92: 993-1003.
- Fuss J, Ben Abdallah NM, Hensley FW, Weber KJ, Hellweg R, Gass P (2010). Deletion of running-induced hippocampal neurogenesis by irradiation prevents development of an anxious phenotype in mice. *PLoS one* 5: e12769.
- Furuta D, Yamane M, Tsujiuchi T, Moriyama R, Fukushima N (2012). Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA3. *Molecular and Cellular Neuroscience* 50:21-34.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *Journal of Neuroscience* 26: 1045-1056
- García-Díaz B. Garcia-Diaz B, Riquelme R, Varela-Nieto I, Jimenez AJ, de Diego I, Gomez-Conde AL, Matas-Rico E, Aguirre JA, Chun J, Pedraza C, Santin LJ, Fernandez O, Rodriguez de Fonseca F, Estivill-Torres G (2015). Loss of lysophosphatidic acid receptor LPA₁ alters oligodendrocyte differentiation and myelination in the mouse cerebral cortex. *Brain Structure and Function* 220: 3701-3720.
- García-Fernández M, Castilla-Ortega E, Pedraza C, Blanco E, Hurtado-Guerrero I, Barbancho MA, Chun J, Rodriguez-de-Fonseca F, Estivill-Torres G, Santin Nunez LJ (2012). Chronic immobilization in the malpar1 knockout mice increases oxidative stress in the hippocampus. *The International Journal of Neuroscience* 122: 583-589.
- Geach TJ, Faas L, Devader C, Gonzalez-Cordero A, Tabler JM, Brunson H, Isaacs HV, Dale L (2014). An essential role for LPA signalling in telencephalon development. *Development* 141: 940-949.

- Gillies K, Price DJ (1993). Cell migration and subplate loss in explant cultures of murine cerebral cortex. *Neuroreport* 4: 911-914.
- Gillies K, Price DJ (1993). The fates of cells in the developing cerebral cortex of normal and methylazoxymethanol acetate-lesioned mice. *European Journal of Neuroscience* 5: 73-84.
- Goetzl EJ, Graeler M, Huang MC, Shankar G (2002). Lysophospholipid growth factors and their G protein-coupled receptors in immunity, coronary artery disease, and cancer. *The Scientific World Journal* 2: 324-338.
- Goetzl EJ, Tigyi G (2004). Lysophospholipids and their G protein-couple receptors in biology and diseases. *Journal of Cellular Biochemistry* 92: 867-868.
- Goffinet AM. (1990). Cerebellar phenotype of two alleles of the 'reeler' mutation on similar backgrounds. *Brain Research* 519: 355-357.
- Gohlke JM, Griffith WC, Faustman EM (2004). The role of cell death during neocortical neurogenesis and synaptogenesis: implications from a computational model for the rat and mouse. *Developmental Brain Research* 151: 43-54.
- Goldshmit Y, Munro K, Leong SY, Pebay A, Turnley AM (2010). LPA receptor expression in the central nervous system in health and following injury. *Cell and Tissue Research* 341:23-32.
- González de San Román E, Manuel I, Giralt MT, Chun J, Estivill-Torrús G, Rodríguez de Fonseca F, Santín LJ, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R (2015). Anatomical location of LPA1 activation and LPA phospholipid precursors in rodent and human brain. *Journal of Neurochemistry* 134: 471-485.
- González-Gil I, Zian D, Vázquez-Villa H, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML (2015). The status of the lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA₁R). *Medchemcomm* 6: 13-23
- Götz M, Huttner WB (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 : 777-788
- Guillemot F (2007). Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Progress in Neurobiology* 83: 37-52.
- Guillemot F (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134: 3771-3780.
- Gundersen HJG (1986). Stereology of arbitrary particles: a review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, In memory of William R. Thompson. *Journal of Microscopy* 143: 3-45.

- Hama K, Bando K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H (2002). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Letters* 523: 187-192.
- Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gildea DH (2004). Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Multiple Sclerosis* 10: 245-260.
- Handford EJ, Smith D, Hewson L, McAllister G, Beer MS (2001). Edg2 receptor distribution in adult rat brain. *Neuroreport* 12: 757-760.
- Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B, Davies CH, Dawson LA, Grau E, Heidbreder C, Hemmati P, Hervieu G, Howarth A, Hughes ZA, Hunter AJ, Latcham J, Pickering S, Pugh P, Rogers DC, Shilliam CS, Maycox PR (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24: 1170-1179.
- Hatten ME (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annual Review of Neuroscience* 22: 511-539.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3196-3201.
- Haydar TF, Ang E Jr., Rakic P (2003). Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2890-2895.
- He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nature Neuroscience* 8: 616-625.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *Journal of Cell Biology* 135: 1071-1083.
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Götz M (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nature Neuroscience* 5: 308-315.

- Heise CE, Santos WL, Schreihof AM, Heasley BH, Mukhin YV, Macdonald TL, Lynch KR (2001). Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA₁/LPA₃ receptor antagonist. *Molecular Pharmacology* 60:1173-1180.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106: 348-360.
- Herr KJ, Herr DR, Lee CW, Noguchi K, Chun J (2011). Stereotyped fetal brain disorganization is induced by hypoxia and requires lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA₁) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:15444-15449.
- Herrup K, Yang Y (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature Reviews Neuroscience* 8: 368-378.
- Iacopetti P, Michelini M, Stuckmann I, Oback B, Aaku-Saraste E, Hutner WB (1999). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4639-4644.
- Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, Lynch KR (2000). Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Molecular Pharmacology* 57: 753-759.
- Ino H, Chiba T (2000). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain Research; Molecular Brain Research* 78: 163-174 (2000).
- Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H (2008). Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 152:296-298.
- Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H (2004). Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nature Medicine* 10:712-718.
- Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual Review of Biochemistry* 73: 321-354.
- Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y (2009). Expression of autotaxin,

an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *American Journal of Reproductive Immunology* 62: 90-95.

- Jacobson RD, Virag I, Skene JH (1986). A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *Journal of Neuroscience* 6: 1843-1855.
- Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C (2005). Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *Journal of Neuroscience* 25: 1459-1469.
- Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH (1990). Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺(+)-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *Journal of Biological Chemistry* 265: 12232-12239
- Janssens R, Boeynaems JM, Godart M, Communi D (1997). Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y₅ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236: 106-112.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11946-11950.
- Joo JY, Kim BW, Lee JS, Park JY, Kim S, Yun YJ, Lee SH, Lee SH, Rhim H, Son H (2007). Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *Journal of Cell Science* 120: 1358-1370.
- Kakizawa K, Nomura H, Yoshida A, Ueda H (1998). Signaling of lysophosphatidic acid-evoked chloride current: calcium release from inositol trisphosphate-sensitive store. *Brain Research; Molecular Brain Research* 61: 232-237.
- Kaldis P, Aleem E (2005). Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. *Cell Cycle* 4:1491-1494.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000). Principios de Neurociencia. Cuarta edición. McGraw-Hill, Interamericana, Madrid.
- Kawagoe H, Soma O, Goji J, Nishimura N, Narita M, Inazawa J, Nakamura H, Sano K (1995). Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2). *Genomics* 30: 380-384.

- Kawauchi T, Shikanai M, Kosodo Y (2013). Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK). and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders. *Genes to Cells* 18: 176-194
- Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J (2014). Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *British Journal of Pharmacology* 17: 3575-3594.
- Kihara Y, Mizuno H, Chun J (2015). Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Experimental Cell Research* 333: 171-177.
- Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *Journal of Biological Chemistry* 284: 31052-31061.
- Kim J, Keys JR, Eckhart AD (2006). Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA). is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cellular Signalling* 18: 1695-1701.
- Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Shimazaki K, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y (2008). Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. *Stroke* 39:3411-3417.
- Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J (2003). Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nature Neuroscience* 6: 1292-1299.
- Kingsbury MA, Rehen SK, Ye X, Chun J (2004). Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling during cortical neurogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 92: 1004-1012.
- Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, Lidington D, Bolz SS, Friedman TB, Hla T, Proia RL (2007). Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *Journal of Biological Chemistry* 282:10690-10696.
- Kosaka T, Katsumaru K, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987). GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Research* 419: 119-130.
- Kostovic I, Rakic P (1990). Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *Journal of Comparative Neurology* 297: 441-470.

- Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, Nilsson NE, Norberg A, Hansson S, Owman C, Sillard R, Leeb-Lundberg LM, Olde B (2006). Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318: 619-628.
- Kriegstein A, Noctor S, Martínez-Cerdeño V (2006). Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 883-890.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laguesse S, Peyre E, Nguyen L (2015). Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell and Tissue Research*. 359: 17-32
- Lee CW, Rivera R, Dubin AE, Chun J (2007). LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *Journal of Biological Chemistry* 282: 4310-4317.
- Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, Windle JJ, Chen CK, Fang X (2008). Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Molecular Biology of the Cell* 19: 5435-5445.
- Leonard JR, Klocke BJ, D'Sa C, Flavell RA, Roth KA (2002). Strain dependent neurodevelopmental abnormalities in caspase-3-deficient mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61: 673-677.
- Li Y, Gonzalez MI, Meinkoth JL, Field J, Kazanietz MG, Tennekoon GI (2003). Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 9585-9591.
- Li ZG, Yu ZC, Wang DZ, Ju WP, Zhan X, Wu QZ, Wu XJ, Cong HM, Man HH (2008). Influence of acetylsalicylate on plasma lysophosphatidic acid level in patients with ischemic cerebral vascular diseases. *Neurological Research* 30:366-369.
- Lin ME, Rivera RR, Chun J (2012). Targeted deletion of LPA5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain. *Journal of Biological Chemistry* 287:17608-17617.
- Liu S, Umezū-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, Yu S, Stephens LC, Cui X, Murrow G, Coombes K, Muller W, Hung MC, Perou CM, Lee AV, Fang X, Mills GB (2009). Expression of

autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 15: 539-550.

- Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA, Billiard J (2010). LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *Journal of Cellular Biochemistry* 109: 794-800.
- Lopez-Bendito G, Molnar Z (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nature Reviews Neuroscience* 4, 276–289 (2003).
- Llona-Minguez S, Ghassemian A, Helleday T (2015). Lysophosphatidic acid receptor (LPA₁) modulators: The current pharmacological toolbox. *Progress in Lipid Research* 58: 51-75.
- Lu WY, Xiong ZG, Lei S, Orser BA, Dudek E, Browning MD, MacDonald JF (1999). G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 2: 331-338.
- Luskin MB (1993). restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173-189.
- Lynch KR, Macdonald TL (2002). Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582: 289-294.
- Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Chun J, Aoki J, Ueda H (2009). Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: an initiator of nerve injury-induced neuropathic pain. *Molecular Pain* 5:64.
- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, Anderson KJ, Roper SN, Lee N (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *European Journal of Neuroscience* 14:203-209.
- Marín O (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *European Journal of Neuroscience* 38: 2019-2029.
- Marin O, Rubenstein JL (2013). Cell migration in the forebrain. *Annual Review of Neuroscience* 26: 441-483.
- Matas-Rico E (2009). Participación de la señalización mediada por ácido lisofosfatídico en los procesos de neurogénesis del sistema nervioso central en la etapa adulta. Tesis Doctoral Universidad de Málaga.

- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, Anderson KJ, Roper SN, Lee N (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *European Journal of Neuroscience* 14:203-209.
- McConnell SK (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15, 761-768.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989). Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245: 978-982.
- McGiffert C, Contos JJ, Friedman B, Chun J (2002). Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for *s1p1* in neurogenesis and *s1p1-3* in angiogenesis. *FEBS Letters* 531: 103-108.
- McLean IW, Nakane PK (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 22:1077-1083.
- Meiri KF, Pfenninger KH, Willard MB (1986). Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 3537-3541.
- Menezes JR, Luskin MB (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *Journal of Neuroscience* 14: 5399-5416.
- Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 704-709.
- Messier PE (1978). Microtubules, interkinetic nuclear migration and neurulation. *Experientia* 34: 289-296.
- Mi D, Carr CB, Georgala PA, Huang YT, Manuel MN, Jeanes E, Niisato E, Sansom SN, Livesey FJ, Theil T, Hasenpusch-Theil K, Simpson TI, Mason JO, Price DJ (2013). Pax6 exerts regional control of cortical progenitor proliferation via direct repression of Cdk6 and hypophosphorylation of pRb. *Neuron* 78: 269-284.
- Mione MC, Cavanagh JFR, Harris B, Parnavelas JG (1997). Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 17:2018-2029.

- Miyama S, Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr (1997). A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. *Cerebral Cortex* 7: 678-689.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131: 3133-3145.
- Miyata T (2008). Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: role of pseudostratification and cellular 'community'. *Development, Growth & Differentiation* 50 Suppl 1: S105-12.
- Möller T, Musante DB, Ransom BR (1999). Lysophosphatidic acid-induced calcium signals in cultured rat oligodendrocytes. *Neuroreport* 10: 2929-2932.
- Molnár Z, Métin C, Stoykova A, Tarabykin V, Price DJ, Francis F, Meyer G, Dehay C, Kennedy H (2006). Comparative aspects of cerebral cortical development. *European Journal of Neuroscience* 23: 921-934.
- Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC, Verlaan I, Bierman AJ, de Laat SW (1986). Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323: 171-173.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26: 870-881.
- Muessel MJ, Harry GJ, Armstrong DL, Storey NM (2013). SDF-1a and LPA modulate microglia potassium channels through rho gtpases to regulate cell morphology. *Glia* 61: 1620-1628.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211.
- Musazzi L, Di Daniel E, Maycox P, Racagni G, Popoli M (2011). Abnormalities in alpha/beta-CaMKII and related mechanisms suggest synaptic dysfunction in hippocampus of LPA1 receptor knockout mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 14: 941-953.
- Mutoh T, Rivera R, Chun J (2012). Insights into the pharmacological relevance of lysophospholipid receptors. *British Journal of Pharmacology* 165: 829-844.
- Nadeau JH. (2002). Modifier genes in mice and humans. *Nature Reviews Genetics* 2:165-174.
- Nagai J, Uchida H, Matsushita Y, Yano R, Ueda M, Niwa M, Aoki J, Chun J, Ueda H (2010). Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. *Molecular Pain* 6:78.

- Nahum S, Morice-Picard F, Taieb A, Sprecher E (2011). A novel mutation in LPAR6 causes autosomal recessive hypotrichosis of the scalp. *Clinical and Experimental Dermatology* 36: 188-194.
- Nakamura K, Igarashi K, Ide K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Masuda A, Oshima N, Takeuchi T, Nangaku M, Okudaira S, Arai H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y (2008). Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clinica Chimica Acta* 388: 51-58.
- Nakamura K, Kishimoto T, Ohkawa R, Okubo S, Tozuka M, Yokota H, Ikeda H, Ohshima N, Mizuno K, Yatomi Y (2007a). Suppression of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine formation in the plasma in vitro: proposal of a plasma sample preparation method for laboratory testing of these lipids. *Analytical Biochemistry* 367: 20-27.
- Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Tozuka M, Okada M, Aoki S, Aoki J, Arai H, Ikeda H, Yatomi Y (2007b). Measurement of lysophospholipase D/autotaxin activity in human serum samples. *Clinical Biochemistry* 40: 274-277.
- Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Ikeda H, Yatomi Y, Igarashi K, Ide K, Kishimoto T, Masuda A, Yamamoto T, Tsuji S, Saito N, Kurokawa M, Okudaira S, Aoki J (2009). Autotaxin enzyme immunoassay in human cerebrospinal fluid samples. *Clinica Chimica Acta* 405: 160-162.
- Nakamura K, Takeuchi T, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Tozuka M, Aoki J, Arai H, Ikeda H, Ohshima N, Kitamura T, Yatomi Y (2007c). Serum lysophospholipase D/autotaxin may be a new nutritional assessment marker: study on prostate cancer patients. *Annals of Clinical Biochemistry* 44: 549-556.
- Nakane S, Tokumura A, Waku K, Sugiura T (2001). Hen egg yolk and white contain high amounts of lysophosphatidic acids, growth factor-like lipids: distinct molecular species compositions. *Lipids* 36: 413-419.
- Nakasaki T, Tanaka T, Okudaira S, Hirokawa M, Umemoto E, Otani K, Jin S, Bai Z, Hayasaka H, Fukui Y, Aozasa K, Fujita N, Tsuruo T, Ozono K, Aoki J, Miyasaka M (2008). Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *American Journal of Pathology* 173: 1566-1576.
- Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML (2000). Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* 19: 241-247.

- Narita M, Goji J, Nakamura H, Sano K (1994). Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha). from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 269: 28235-28242.
- Narita Y, Rijli FM (2009). Hox genes in neural patterning and circuit formation in the mouse hindbrain. *Current Topics in Developmental Biology* 88: 139-167.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience* 7: 136-144.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, Kriegstein AR (2007). Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found Symposium* 288: 59-73.
- Nogaroli L, Yuelling LM, Dennis J, Gorse K, Payne SG, Fuss B (2009). Lysophosphatidic acid can support the formation of membranous structures and an increase in MBP mRNA levels in differentiating oligodendrocytes. *Neurochemistry Research* 34: 182-193.
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 15-23.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytoogy*. 18: 311-318.
- Ohuchi H, Hamada A, Matsuda H, Takagi A, Tanaka M, Aoki J, Arai H, Noji, S (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Developmental Dynamics* 237: 3280-3294.
- O'Leary DDM, Nakagawa Y (2002). Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 14-25.
- Okudaira S, Yukiura H, Aoki J (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92: 698-706.
- Paridaen JT, Huttner WB (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports* 15: 351-364.
- Pasternack SM, von Kugelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nothen MM, Betz RC (2008). G protein-coupled

receptor P2Y₅ and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature Genetics* 40: 329-334

- Paxinos G, Franklin KBJ (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego. Academic Press.
- Pedraza C, Sanchez-Lopez J, Castilla-Ortega E, Rosell-Valle C, Zambrana-Infantes E, Garcia-Fernandez M, Rodriguez de Fonseca F, Chun J, Santin LJ, Estivill-Torres G (2014). Fear extinction and acute stress reactivity reveal a role of LPA₁ receptor in regulating emotional-like behaviors. *Brain Structure and Function* 219: 1659-1672.
- Perkins LM, Ramirez FE, Kumar CC, Thomson FJ, Clark MA (1994). Activation of serum response element-regulated genes by lysophosphatidic acid. *Nucleic Acids Research* 22: 450-452.
- Pieringer RA, Hokin LE (1962). Biosynthesis of phosphatidic acid from lysophosphatidic acid and palmitoyl coenzyme A. *Journal of Biological Chemistry* 237: 659-663.
- Pilpel Y, Segal M (2004). Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *European Journal of Neuroscience* 19: 3151-3164.
- Pilpel Y, Segal M (2006). The role of LPA₁ in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 97: 1379-1392.
- Pilz GA, Shitamukai A, Reillo I, Pacary E, Schwausch J, Stahl R, Ninkovic J, Snippert HJ, Clevers H, Godinho L, Guillemot F, Borrell V, Matsuzaki F, Götz M (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nature Communication*. 4: 2125.
- Pines J, Hunter T (1991). Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends in Cell Biology* 1: 117-121.
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66.
- Pradere JP, Klein J, Gres S, Guigne C, Neau E, Valet P, Calise D, Chun J, Bascands JL, Saulnier-Blache JS, Schanstra JP (2007). LPA₁ receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 18: 3110-3118.
- Price DJ, Aslam S, Tasker L, Gillies K (1997). Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *Journal of Comparative Neurology* 377: 414-422.

- Puelles L, Rubenstein JL (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in Neuroscience* 26: 469-476.
- Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S (1997). FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18: 81-93.
- Quinn JC, Molinek M, Martynoga BS, Zaki PA, Faedo A, Bulfone A, Hevner RF, West JD, Price DJ (2007). Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Developmental Biology* 302:50-65.
- Rakic P, Ayoub AE, Breunig JJ, Dominguez MH (2009). Decision by division: making cortical maps. *Trends in Neuroscience* 32: 291-301.
- Rakic P (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends in Neuroscience* 18: 383-388.
- Rakic P (2002). Neurogenesis in the adult primate neocortex: An evaluation of the evidence. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 65-71.
- Ramakers GJ, Moolenaar WH (1998). Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Experimental Cell Research* 245: 252-262.
- Rehen SK, Kingsbury MA, Almeida BSV, Herr DR, Peterson S, Chun J (2006). A new method of embryonic culture for assessing global changes in brain organization
- Reynolds R, Carey EM, Herschkowitz N (1989). Immunohistochemical localization of myelin basic protein and 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in flattened membrane expansions produced by cultured oligodendrocytes. *Neuroscience* 28: 181-188.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss SA (1992). Multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience* 12, 4565-4574.
- Rhee HJ, Nam JS, Sun Y, Kim MJ, Choi HK, Han DH, Kim NH, Huh SO (2006). Lysophosphatidic acid stimulates cAMP accumulation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in immortalized hippocampal progenitor cells. *Neuroreport* 17: 523-526.
- Rice DS, Curran T (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annual Reviews in Neuroscience* 24:1005-1039.
-

- Ridley AJ (1994). Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho. *Journal of Cell Science Suppl* 18: 127-131.
- Roberts C, Winter P, Shilliam CS, Hughes ZA, Langmead C, Maycox PR, Dawson LA (2005). Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia. *Neurochemical Research* 30: 371-377.
- Rosell del Valle C (2014). Nuevas aproximaciones terapéuticas mediante las vías de señalización del ácido lisofosfatídico: regulación farmacológica y trasplante neuronal. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (3ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, Estados Unidos.
- Sansom SN, Livesey FJ (2009). Gradients in the brain: the control of the development of form and function in the cerebral cortex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: a002519.
- Santin LJ, Bilbao A, Pedraza C, Matas-Rico E, Lopez-Barroso D, Castilla-Ortega E, Sanchez-Lopez J, Riquelme R, Varela-Nieto I, de la Villa P, Suardiaz M, Chun J, De Fonseca FR, Estivill-Torres G (2009). Behavioral phenotype of maLPA₁-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes, Brain, and Behavior* 8: 772-784.
- Sato K, Malchinkhuu E, Muraki T, Ishikawa K, Hayashi K, Tosaka M, Mochiduki A, Inoue K, Tomura H, Mogi C, Nochi H, Tamoto K, Okajima F (2005). Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *Journal of Neurochemistry* 92: 904-914.
- Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Baer A, Lubec G, van Meeteren LA, Kishi Y, Aoki J, Moolenaar WH, Nitsch R, Brauer AU (2007). Autotaxin (NPP-2). in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 230-243.
- Savitz SI, Dhallu MS, Malhotra S, Mammis A, Ocava LC, Rosenbaum PS, Rosenbaum DM (2006). EDG receptors as a potential therapeutic target in retinal ischemia-reperfusion injury. *Brain Research* 1118:168-175.
- Sayas CL, Avila J, Wandosell F (2002). Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582: 144-153.

- Schilling, T., Stock, C., Schwab, A., and Eder, C. (2004). Functional importance of Ca²⁺-activated K⁺ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *European Journal of Neuroscience* 19: 1469-1474.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrinology Reviews* 14: 133-151.
- Sengupta S, Wang Z, Tipps R, Xu Y (2004). Biology of LPA in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 503-512.
- Sessa A, Mao CA, Hadjantonakis AK, Klein WH, Broccoli V (2008). Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* 60: 56-69.
- Shano S, Moriyama R, Chun J, Fukushima N (2008). Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochemistry International* 52: 216-220.
- Shen Q, Fuchs T, Sahir N, Luscher B (2012). GABAergic control of critical developmental periods for anxiety- and depression-related behavior in mice. *PLoS One* 7: e47441.
- Sheng X, Yung YC, Chen A, Chun J (2015). Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development* 142: 1390-1395.
- Shen Z, Belinson J, Morton RE, Xu Y, Xu Y (1998). Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecologic Oncology* 71: 364-368.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13: 1501--1512.
- Shimomura Y, Garzon MC, Kristal L, Shapiro L, Christiano AM (2009). Autosomal recessive woolly hair with hypotrichosis caused by a novel homozygous mutation in the P2RY5 gene. *Experimental Dermatology* 18: 218-221.
- Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *Journal of Neuroscience* 31: 3683-3695.
- Sibilian M, Wagner EF (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269: 234-238.

- Sidman RL, Miale IL, Feder N (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental Neurology* 1: 322-333.
- Sidman RL, Rakic P (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research* 62: 1-35.
- Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M (1999). Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6931-6936.
- Sim-Selley LJ, Goforth PB, Mba MU, Macdonald TL, Lynch KR, Milstien S, Spiegel S, Satin LS, Welch SP, Selley DE (2009). Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *Journal of Neurochemistry* 110:1191-1202.
- Skene JH (1989). Axonal growth-associated proteins. *Annual Review of Neuroscience* 12: 127-156.
- Sloan SA, Barres BA (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 27:75-78.
- Spohr TC, Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rehen SK, Gomes FC, Chun J (2008). Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 7470-7479.
- Spohr TC, Dezone RS, Rehen SK, Gomes FC (2011). Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway. *Journal of Neurochemistry* 119: 113-123.
- Sprinkle TJ (1989). 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Critical Reviews in Neurobiology* 4: 235-301.
- Squire LR, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A, Spitzer N (2008). *Fundamental Neuroscience*. Tercera edición. Academic Press. Elsevier Science, Londres.
- Sterio DC. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy* 134: 127-136.

- Stricker SH, Meiri K, Götz M (2006). P-GAP-43 is enriched in horizontal cell divisions throughout rat cortical development. *Cerebral Cortex* 16 Suppl 1: 121-131.
- Sun Y, Kim NH, Ji L, Kim SH, Lee J, Rhee HJ (2013). Lysophosphatidic acid activates betacatenin/T cell factor signaling, which contributes to the suppression of apoptosis in H197 cells. *Molecular Medicine Reports* 8: 1729-1733.
- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104: 365-376.
- Sutor B, Hagerty T (2005). Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1719: 59-68.
- Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD (2008). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature Medicine* 14:45-54.
- Takahashi T, Caviness VS Jr (1993). PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *Journal of Neurocytology* 22: 1096-1102.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of embryonic murine cerebral wall. *Journal of Neuroscience* 15: 6046-6057.
- Takahashi T, Goto T, Miyama S, Nowakowski RS, Caviness VS Jr (1999). Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *Journal of Neuroscience* 19: 10357-10371.
- Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VM, Trojanowski JQ, Tomita T, Iwatsubo T (2011). BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *Journal of Neuroscience* 31: 6850-6857.
- Tan X, Shi SH (2013). Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Developmental Biology* 2: 443-459.
- Tanaka DH, Toriumi K, Kubo K, Nabeshima T, Nakajima K (2011). GABAergic precursor transplantation into the prefrontal cortex prevents phencyclidine-induced cognitive deficits. *Journal of Neuroscience* 31: 14116-14125.

- Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry* 281: 25822-25830.
- Tarui T, Takahashi T, Nowakowski RS, Hayes NL, Bhide PG, Caviness VS (2005). Overexpression of p27 Kip 1, probability of cell cycle exit, and laminar destination of neocortical neurons. *Cerebral Cortex* 15: 1343-1355.
- Taupin P (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews* 53:198-214.
- Theiler K (1989). The house mouse. Atlas of embryonic development. Segunda edición. Springer Verlag. New York.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JFR, Parnavelas JG (1997). Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 17: 1075-1085.
- Tigyi G, Miledi R (1992). Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 267: 21360-21367.
- Tigyi G, Parrill AL (2003). Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in Lipid Research* 42: 498-526.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Tokumura A (2004). Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* 92: 869-881.
- Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K (2002). Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 39436-39442.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.

- Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cerebral Cortex* 13: 580-587.
- Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battfeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Brauer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, Nitsch R (2009). Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* 138:1222-1235.
- Tsuda S, Okudaira S, Moriya-Ito K, Shimamoto C, Tanaka M, Aoki J, Arai H, Murakami-Murofushi K, Kobayashi T (2006). Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 26081-26088.
- Tümpel S, Wiedemann LM, Krumlauf R (2009). Hox genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Current Topics in Developmental Biology* 88: 103-137.
- Turner CA, Thompson RC, Bunney WE, Schatzberg AF, Barchas JD, Myers RM, Akil H, Watson SJ (2014). Altered choroid plexus gene expression in major depressive disorder. *Frontiers in Human Neuroscience* 8, 238.
- Ulloa F, Briscoe J (2007). Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle* 6: 2640-2649.
- Umemura K, Yamashita N, Yu X, Arima K, Asada T, Makifuchi T, Murayama S, Saito Y, Kanamaru K, Goto Y, Kohsaka S, Kanazawa I, Kimura H (2006). Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neuroscience Letters* 400: 97-100.
- Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H (2002). Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *Journal of Cell Biology* 158: 227-233.
- Uylings HBM, van Eden CG, Hofman MA (1986). Morphometry of size/volume variables and comparison of their bivariate relations in the nervous system under different conditions. *Journal of Neuroscience Methods* 18: 19-37.
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59: 45-54.

- van Lookeren-Campagne M, Gill R (1998). Tumor-suppressor p53 is expressed in proliferating and newly formed neurons of the embryonic and postnatal rat brain: comparison with expression of the cell cycle regulators p21waf1, p27Kip1, p57Kip2, p16Ink4a, cyclin G1, and the protooncogene Bax. *Journal of Comparative Neurology* 397: 181-198.
- van Meeteren LA, Brinkmann V, Saulnier-Blache JS, Lynch KR, Moolenaar WH (2008). Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Letters* 266: 203-208.
- van Meeteren LA, Moolenaar WH (2007). Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Progress in Lipid Research* 46: 145-160.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Christodoulou E, Goding JW, Takakusa H, Kikuchi K, Perrakis A, Nagano T, Moolenaar WH (2005). Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 21155-21161.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and Cellular Biology* 26: 5015-5022.
- Vasistha NA, García-Moreno F, Arora S, Cheung AF, Arnold SJ, Robertson EJ, Molnár Z (2005). Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cerebral Cortex* 25: 3290-3302
- Walther C, Gruss P (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113. 1435-1449
- Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen J A, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ (1999). The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 9: 627-635.
- Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Aoki J, Hama K, Okudaira S, Tanaka M, Tomiya T, Yanase M, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y (2007). Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Gastroenterology* 41: 616-623.
- Watterson KR, Lanning DA, Diegelmann RF, Spiegel S (2007). Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 15: 607-616.

- Weiner JA, Hecht JH, Chun J (1998). Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *Journal of Comparative Neurology* 398: 587-598.
- Weiner JA, Chun J (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5233-5238.
- West MJ. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*.14:275--285.
- Wolffe AP (1992). New insights into chromatin function in transcriptional control. *FASEB Journal* 6: 3354-3361.
- Wonders C and Anderson SA (2005). Cortical interneurons and their origins. *The Neuroscientist* 11: 199-205.
- Woo RA1, Poon RY (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2:316-324
- Wu YP, Mizugishi K, Bektas M, Sandhoff R, Proia RL (2008). Sphingosine kinase 1/S1P receptor signaling axis controls glial proliferation in mice with Sandhoff disease. *Human Molecular Genetics* 17:2257-2264.
- Xie W, Matsumoto M, Chun J, Ueda H (2008). Involvement of LPA1 receptor signaling in the reorganization of spinal input through Abeta-fibers in mice with partial sciatic nerve injury. *Molecular Pain* 4:46.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JLR, Anderson SA. (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *Journal of Neuroscience* 24:2612-2622.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010). Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *Journal of Comparative Neurology* 518:389-404.
- Yamane M, Furuta D, Fukushima N (2010). Lysophosphatidic acid influences initial neuronal polarity establishment. *Neuroscience Letters* 480: 154-157.
- Yamazaki J, Katoh H, Negishi M (2008). Lysophosphatidic acid and thrombin receptors require both G alpha12 and G alpha13 to regulate axonal morphology in hippocampal neurons. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31: 2216-2222.

- Yan H, Lu D, Rivkees SA (2003). Lysophosphatidic acid regulates the proliferation and migration of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 44: 26-36.
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S (2009). Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 17731-17741.
- Yang C, Lafleur J, Mwaikambo BR, Zhu T, Gagnon C, Chemtob S, Di Polo A, Hardy P (2009). The role of lysophosphatidic acid receptor (LPA1) in the oxygen-induced retinal ganglion cell degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50:1290-1298.
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435: 104-108.
- Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J (2002). Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1585: 108-113.
- Yung YC, Stoddard NC, Mirendil H, Chun J (2005). Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron* 85: 669-682.
- Yung YC, Mutoh T, Lin ME, Noguchi K, Rivera RR, Choi JW, Kingsbury MA, Chun J (2011). Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Science Translational Medicine* 3:99ra87.
- Zhang J, Jiao J (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Research International* 2015: 727542.
- Zhao J, Lin Q, Kim KJ, Dardashti FD, Kim J, He F, Sun Y (2015). Ngn1 inhibits astrogliogenesis through induction of miR-9 during neuronal fate specification. *Elife* 4:e06885.
- Zheng ZQ, Fang XJ, Zhang Y, Qiao JT (2005). Neuroprotective effect of lysophosphatidic acid on AbetaP31-35-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Sheng li xue bao: [Acta Physiologica Sinica]* 57:289-294.