



UNIVERSIDAD
MAYOR

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

**La neurogénesis adulta hipocampal se encuentra disminuida en ratones nulos
para el gen proteína receptor tirosina fosfatasa delta asociado al trastorno
del espectro autista**

Juan Salvador Jesús Ayala Castillo

Proyecto de tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago – Chile

2019



UNIVERSIDAD
MAYOR

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

**La neurogénesis adulta hipocampal se encuentra disminuida en ratones nulos
para el gen proteína receptor tirosina fosfatasa delta asociado al trastorno
del espectro autista**

Juan Salvador Jesús Ayala Castillo

Proyecto de tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutor: Dr. Gonzalo Ignacio Cancino Lobos.

Cotutora: Dra. Francisca Cornejo Castillo.

Santiago – Chile

2019

AGRADECIMIENTOS.

Dedicado a mi familia.

Para mi madre y mi padre, por el amor incondicional y libertad que me han otorgado durante toda mi vida a pesar de mis tropiezos. “Porfiaré como el Quijote, si con el fin de volar como Juan Salvador gaviota me lleve lejos”. Para mi abuelo Eduardo Castillo y mi abuela Marisol Rodríguez, por inspirarme a emprender el camino del conocimiento con el fin de compartirlo con las ganas de un niño.

Quiero dar gracias a mi tutor Dr. G. Ignacio Cancino, por la incesante paciencia durante todo este tiempo, por enseñarme el complejo camino de la ciencia aceptando mis virtudes y defectos a través del rigor metodológico.

También quiero dar gracias a mi Cotutora Dra. Francisca Cornejo, por todo el apoyo y comprensión de una hermana mayor. También por todas las enseñanzas basadas en el esfuerzo y perseverancia de su propio liderazgo.

Finalmente dar gracias a mis compañeros de laboratorio: Bastián Cortes por cada conversación, consejo y camaradería de un apasionado por la ciencia. Jessica Molina por su ejemplo de la constancia académica y laboral. Begoña Aranda por su ejemplo de jamás rendirse a las adversidades de la vida.

ANTECEDENTES DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN.

El Centro de Investigación de Biología Integrativa (Center for Integrative Biology, CIB) de la Universidad Mayor, Campus Huechuraba, emerge en el año 2017 como un nuevo paradigma de investigación interdisciplinaria de excelencia en Chile, cuya orientación central es promover la integración disciplinaria utilizando diferentes modelos de trabajo, técnicas y equipamientos de alto nivel con miras a fomentar el descubrimiento científico, la innovación y transferencia tecnológica, y la generación de capital humano avanzado, para contribuir al desarrollo de una sociedad basada en el conocimiento con un impacto a nivel país.



CENTER FOR
INTEGRATIVE
BIOLOGY

Este proyecto de tesis fue financiado por el Proyecto FONDECYT Regular: 1161374 a cargo del Dr. Gonzalo Ignacio Cancino Lobos.

ABREVIATURAS.

PTPRD: Proteína receptor tirosina fosfatasa tipo delta o Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo delta, *del inglés:* Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type D.

SGZ: Zona subgranular, *del inglés:* Subgranular Zone.

SVZ: Zona subventricular, *del inglés:* Subventricular Zone.

CGL: Capa de células granulares internas, *del inglés:* Granule Cell Layer.

ML: Capa molecular, *del inglés:* Molecular Layer.

TEA: Trastorno del espectro autista.

NRXN1: Neurexina 1, *del inglés:* Neurexin 1.

SHANK3: SH3 y múltiples dominios de repetición de ankirina 3, *del inglés:* SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3.

FMRP: Proteína 1 del retraso mental X frágil, *del inglés:* Fragile X Mental Retardation Protein 1.

MECP2: Proteína de unión 2 metil-CpG, *del inglés:* Methyl-CpG Binding Protein 2.

DISC1: Proteína 1 interrumpida en la esquizofrenia, *del inglés:* Disrupted In Schizophrenia 1 Protein.

ANKRD11: Proteína 11 contenedora de repeticiones de dominio ankirina, *del inglés:* Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 11.

SNPs: Polimorfismos de nucleótido simple, *del inglés:* Single Nucleotide Polymorphism.

CNVs: Variaciones en el número de copias, *del inglés:* Copy Number Variation.

Sox2: Región determinante del sexo Y-Caja 2, *del inglés:* Sex Determining Region Y-Box 2.

DCX: Doblecortina, *del inglés:* Doublecortin.

Tbr2: Proteína cerebral T-Caja 2, *del inglés:* T-Box Brain Protein 2.

NeuN: Antígeno de núcleos neuronales, *del inglés:* Neuronal Nuclei Antigen.

i. ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
ANTECEDENTES DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN.....	4
ABREVIATURAS.....	5
i. ÍNDICE DE CONTENIDO.....	6
ii. RESUMEN.....	7
iii. SUMMARY.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Trastorno del espectro autista.....	9
1.2. Neurogénesis adulta.....	10
1.3. Proteína Receptor Tirosina Fosfatasa Delta (PTPRD).....	16
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. MATERIALES.....	20
4.2. MÉTODOS.....	21
4.2.1. Modelo animal.....	21
4.2.2. Adquisición y tratamiento de tejidos.....	22
4.2.3. Inmunofluorescencia.....	22
4.2.4. Tinción de Nissl.....	23
4.2.5. Procesamiento de imágenes.....	23
4.2.6. Análisis estadísticos.....	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSIONES.....	36
8. PROYECCIONES.....	38
9. REFERENCIAS.....	40
10. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	46

ii. RESUMEN.

Mutaciones genéticas heredadas o espontáneas de genes implicados en el proceso de desarrollo del sistema nervioso están asociadas a enfermedades o condiciones neurológicas como el trastorno del espectro autista (TEA). El trastorno del espectro autista corresponde a un grupo de condiciones neurológicas las cuales se caracterizan por problemas en la interacción social, dificultades en la comunicación verbal y no-verbal, y en conductas repetitivas y/o estereotipadas. Existen mutaciones que se asocian al TEA que alteran la función de las células precursoras neurales, desregulando de esta forma el proceso de neurodesarrollo en etapas embrionarias y adultas. El neurodesarrollo es un proceso secuencial acontecido en toda la vida de un individuo en el cual a partir de un precursor se dará origen al linaje neural: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Dentro del neurodesarrollo, se denomina neurogénesis al proceso en el cual se da origen a una neurona a partir de un precursor neural, lo cual puede ocurrir tanto en etapas embrionarias como adultas. Este proceso es altamente regulado y se ha descrito que mutaciones en genes que se expresan en precursores neurales, y que alteran procesos celulares como la proliferación y diferenciación de estos, pueden alterar la formación de las distintas estructuras del cerebro, y como consecuencia ser la causa de diversas enfermedades o condiciones neuropsiquiátricas. En este sentido, recientemente se ha descrito que el gen que codifica para la Proteína Receptor Tirosina Fosfatasa Delta (PTPRD) se encuentra mutado en diversas enfermedades o condiciones del neurodesarrollo, incluyendo el trastorno del espectro autista. También, se ha observado que dicha proteína es expresada en estructuras en donde residen los precursores adultos y donde ocurre la neurogénesis adulta, y que la ausencia de la expresión del gen de PTPRD puede aumentar el proceso de neurogénesis embrionaria mediante la disminución de la proliferación de precursores, llevándolos a un proceso de diferenciación neuronal prematuro. Sin embargo, se desconoce el rol de PTPRD en la neurogénesis adulta y cuáles serían las consecuencias de estas mutaciones en la estructura del hipocampo, por lo que planteamos como hipótesis del presente trabajo, que en etapas adultas la neurogénesis estaría disminuida en la ausencia del gen de PTPRD. Esto se explicaría en parte a que en etapas embrionarias la ausencia en la expresión de PTPRD provoca una diferenciación prematura de los precursores hacia neuronas, por lo que dicha población de precursores es agotada, y producto de ello en la adultez se esperaría que la cantidad de precursores que den origen a nuevas neuronas sea reducida generando un cambio morfológico en el hipocampo. Con nuestros resultados sugerimos que al presentarse deleciones en el gen de PTPRD la neurogénesis hipocampal adulta disminuye sin asociarse a cambios morfológicos en el hipocampo.

iii. SUMMARY

Inherited or spontaneous gene mutations of genes involved in the development process of the nervous system are associated with diseases or neurological conditions such as autistic spectrum disorder (ASD). The autistic spectrum disorder corresponds to a group of neurological conditions which are characterized by problems in social interaction, difficulties in verbal and non-verbal communication, and in repetitive and/or stereotyped behaviors. There are mutations that are associated with ASD that alter the function of neural precursor cells, thus deregulating the neurodevelopment process in embryonic and adult stages. Neurodevelopment is a sequential process that takes place throughout the life of an individual in which, starting from a precursor, the neural lineage will be originated: neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Within neurodevelopment, neurogenesis is the process in which a neuron is originated from a neural precursor, which can occur in both embryonic and adult stages. This process is highly regulated, and it has been described that mutations in genes that are expressed in neural precursors, and that alter cellular processes such as the proliferation and differentiation of these, can alter the formation of the different structures of the brain, and therefore be the cause of various diseases or neuropsychiatric conditions. In this regard, it has recently been described that the gene encoding the Tyrosine Protein Receptor Phosphatase Delta (PTPRD) is mutated in various diseases or conditions of neurodevelopment, including autism spectrum disorder. Also, it has been observed that said protein is expressed in structures where adult precursors reside and where adult neurogenesis occurs, and that the absence of the expression of the PTPRD gene can increase the process of embryonic neurogenesis by decreasing the proliferation of precursors, leading them to a process of premature neuronal differentiation. However, the role of PTPRD in adult neurogenesis and the consequences of these mutations in the structure of the hippocampus is unknown, so we hypothesize that in adult stages neurogenesis would be reduced in the absence of the gene PTPRD. This would be explained in part by the fact that in the embryonic stages the absence of PTPRD expression causes a premature differentiation of the precursors towards neurons, so that this population of precursors is exhausted, and as a result of this, in adulthood, the amount of precursors that give rise to new neurons be reduced generating a morphological change in the hippocampus. With our results we suggest that when deletions occur in the PTPRD gene, adult hippocampal neurogenesis decreases without being associated with morphological changes in the hippocampus.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Trastorno del espectro autista.

El trastorno del espectro autista (TEA) es un grupo de condiciones neurológicas dadas en el proceso de desarrollo del sistema nervioso las cuales se caracterizan por problemas en la interacción social, dificultades en la comunicación verbal y no-verbal, y en conductas repetitivas y/o estereotipadas (1–3). Según el Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la asociación americana de psiquiatría, el TEA integra diferentes condiciones como el autismo infantil, el autismo atípico y el trastorno de Asperger, entre otras, en donde estas condiciones neurológicas varían según la gravedad de la condición autista, el nivel de desarrollo y la edad cronológica del individuo (2). En la actualidad, 1 de cada 34 niños en Estados Unidos es diagnosticado con TEA (4), y ya que la tasa de prevalencia va en aumento (3), el conocer las causas del trastorno del espectro autista ha tomado una importancia científica y social. De los diversos estudios hasta la fecha, se ha indicado que existe una gran implicancia genética en la mayoría de los casos de autismo. Por ejemplo, en el caso de gemelos idénticos en donde uno presenta autismo, el otro se verá igualmente afectado con una probabilidad 36 a 95% (5–7); y en gemelos no idénticos la probabilidad es de un 31% (6,7). También, se han observado que padres que tienen un hijo con TEA tienen una probabilidad de 2 al 18% de que el segundo hijo también presente el trastorno (8,9). Esta información, permitió proponer que el origen del trastorno del espectro autista era dado por mutaciones en el genoma de los padres que posteriormente eran heredadas a los hijos. Trabajos posteriores apoyaron este hecho determinando polimorfismos de nucleótido simple (SNP, *del Inglés*: Single Nucleotide Polymorphism) y variaciones en el número de copias (CNV, *del Inglés* Copy Number Variation) en múltiples genes presentes en individuos diagnosticados con TEA (10,11), además en estos estudios no sólo se corroboró la heredabilidad de las mutaciones, sino que también se determinaron mutaciones de novo en el genoma de los hijos que no eran presentadas por los padres (11). Con relación a las mutaciones de novo, estas han sido de particular interés debido a que representan entre un 15 y un 25% del total de los factores genéticos que no son heredados y que contribuyen a la etiología del TEA (12, 13). De aquellas mutaciones de novo, los SNPs representan un 7% del total y las CNVs que tienden a ser más frecuentes en los fenotipos más graves del TEA representan entre un 4 y un 7% del total (12, 14, 15).

Las CNV de novo muestran una gran heterogeneidad en el tamaño de las secuencias nucleotídicas, esto quiere decir que algunas son lo suficientemente pequeñas como para afectar a un solo gen o lo suficientemente grandes como para abarcar muchos genes, por lo que deleciones o duplicaciones

relacionadas a este tipo de mutaciones son estudiadas debido a que ofrecen una mayor variabilidad genética que permite explicar fenotipos diversos como los vistos en el espectro autista (12, 13). En base a lo mencionado, se han realizado diversos estudios de genómica comparativa entre hijos con trastorno del espectro autista, sus padres y entre otros individuos con el trastorno, con el fin de obtener un mapa génico asociado al TEA. De los genes candidatos que fueron identificados, se ha determinado que convergen en funciones celulares como la señalización neuronal, la función sináptica y la remodelación de la cromatina, siendo estos procesos relacionados estrechamente al neurodesarrollo (16, 17). Por ejemplo, estudios en el gen *NRXN1* que codifica para la proteína Neurexina 1, la cual está implicada en la formación y el mantenimiento de la sinapsis. Los análisis experimentales in vitro de deleciones de este gen en precursores neurales y células madre pluripotentes inducidas, han determinado que este gen juega un rol en las vías de señalización involucradas en la diferenciación de este tipo de células, y vías de señalización involucradas en la adhesión celular. Además, en dichos análisis determinaron que la diferenciación de precursores neurales hacia astrocitos era reducida, lo que sugiere que la presencia de dicho gen es necesaria para el correcto neurodesarrollo (18). Otro gen asociado al TEA por CNVs de novo es *SHANK3* (SH3 y múltiples dominios de repetición de ankirina 3, *del inglés*: SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3), el cual codifica para una proteína de la densidad postsináptica que sirve como un andamiaje principal al interactuar en complejos proteicos dirigiendo la formación, maduración y mantenimiento de la sinapsis en neuronas. Estudios in vitro de deleciones de este gen en precursores neurales y en células madre pluripotentes inducidas, determinaron que microdeleciones del gen de *SHANK3* en etapas embrionarias del neurodesarrollo aumentan la longitud y cantidad de neuritas presentes en neuronas recién nacidas, lo que significa en términos generales que este gen tiene una función en la morfogénesis neuronal afectando el proceso de sinaptogénesis (19). Estos ejemplos de genes mutados en individuos con TEA sugieren que existen convergencias a procesos biológicos interconectados en el neurodesarrollo como lo es la sinaptogénesis neuronal, y que dichas mutaciones al ocurrir en precursores neurales tendrán una implicancia funcional en las células diferenciadas a las cuales posteriormente darán origen.

1.2. Neurogénesis adulta.

Para comprender cómo estas mutaciones tienen un efecto determinado en precursores neurales y neuronas en etapas específicas del desarrollo de un individuo, en primera instancia hay que comprender qué es el neurodesarrollo y cómo alteraciones en este proceso pueden relacionarse a

trastornos neurológicos. El neurodesarrollo es un proceso secuencial en la formación del sistema nervioso el cual acontece durante toda la vida de un animal. Este proceso comienza en etapas embrionarias del desarrollo de un individuo, en donde a partir de células precursoras neurales se dará origen a todas las células del linaje neural: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, las cuales conformarán las diferentes estructuras del sistema nervioso (20, 21). Aquella organización del sistema nervioso se desarrolla en fases sucesivas de división celular y expresión génica de factores de transcripción que irán restringiendo progresivamente el potencial de las células precursoras neurales a un perfil más diferenciado, posicionando finalmente a la célula formada en una estructura específica del sistema nervioso (22). Dentro del neurodesarrollo, se denomina neurogénesis al proceso en el cual se da origen a una neurona a partir de un precursor neural. En la actualidad, es conocido que el proceso de neurogénesis no solo ocurre en periodos embrionarios, sino que también se ha demostrado que el proceso se desarrolla en mamíferos adultos, ocurriendo en dos regiones discretas del sistema nervioso central (o nichos neurogénicos), la zona subventricular (SVZ, *del inglés*: Subventricular Zone) del ventrículo lateral, en donde se formarán las interneuronas del bulbo olfatorio, y la zona subgranular (SGZ, *del inglés*: Subgranular Zone) del giro dentado en el hipocampo, en donde se formarán las nuevas neuronas granulares (23, 24). Respecto de las neuronas que son incorporadas a la SGZ del giro dentado, diversos estudios en donde se evaluó la importancia de la reducción en la población de dichas células producto de una ablación específica de precursores neurales, determinaron que la cantidad de neuronas maduras que son incorporadas en circuitos neuronales preexistentes juegan un rol crítico en el aprendizaje y la memoria. Esto último fue evidenciado mediante ensayos de comportamiento en donde los ratones utilizados presentaban deficiencias cognitivas al realizar tareas dependientes del hipocampo (25, 26, 27). Es por aquello, que en la actualidad surge el interés de estudiar cómo estas nuevas neuronas, que están siendo integradas en la SGZ del giro dentado en el hipocampo, pueden estar ejerciendo una función importante en los procesos cognitivos de mamíferos bajo diversas condiciones que afectan la biología de los precursores neurales.

Dado que el proceso de neurogénesis adulta es considerado parte del neurodesarrollo, éste también es separado en etapas dependiendo del perfil de diferenciación de las células involucradas. La primera etapa de la neurogénesis adulta es la proliferación (Figura 1), proceso en donde aumenta la cantidad de precursores en la SGZ y los cuales son identificados con el marcador de tipo celular Sox2 de la región determinante del sexo Y-Caja 2 (*del inglés*: Sex Determining Region Y-Box 2), que es una

proteína caracterizada por participar en la regulación del destino celular y en la mantención de las células madre, incluyendo a las células precursoras del sistema nervioso central (28). Otro marcador del linaje de precursores neurales es Nestina, la cual se caracteriza por ser requerida para la supervivencia, renovación y proliferación de este tipo de células (28). Luego de que los precursores proliferan, estos mismos se irán diferenciando a precursores neurales intermedios de tipo II, los cuales posteriormente generarán neuroblastos o también llamados precursores neurales intermedios de tipo III. Para la identificación de los progenitores neurales intermedios de tipo II se utiliza el marcador de expresión Tbr2, el cual es una proteína encargada de la regulación de la diferenciación celular (28). En la segunda etapa de la neurogénesis denominada determinación de destino, los precursores neurales intermedios de tipo II y III serán posicionados a lo largo de la estructura del giro dentado, en donde se diferenciarán a neuronas recién nacidas. Para la identificación de neuroblastos o de neuronas recién nacidas se utiliza el marcador de tipo celular doblecortina (DCX), el cual es una proteína asociada a los microtúbulos y es expresada durante el proceso de migración y diferenciación celular en el citoplasma de estos tipos celulares (28). Completado el proceso, comienza la tercera etapa de la neurogénesis denominada migración, en donde las neuronas inmaduras migrarán a la capa de células granulares internas (GCL, *del inglés*: Granule Cell Layer) del giro dentado y en donde posteriormente se diferenciarán a neuronas granulares dentadas. En este proceso, las neuronas recién nacidas en migración extienden las dendritas hacia la capa molecular (ML, *del inglés*: Molecular Layer) del giro dentado y proyectan sus axones a través del hilus hacia la región 3 del cuerpo de Amón (CA3) en el hipocampo. Y la última etapa de la neurogénesis adulta, se denomina integración sináptica o sinaptogénesis. En esta etapa las neuronas inmaduras se integran en los circuitos neuronales ya existentes. Una vez finalizada correctamente la integración sináptica, estas células son consideradas neuronas granulares maduras, las cuales son identificadas con el marcador del antígeno nuclear de neuronas NeuN (27, 28). Con relación al tiempo que dura este proceso en la vida de un individuo, es aceptado que estos eventos pueden acontecer durante toda la adultez, sin embargo, también es conocido que la capacidad de proliferación y diferenciación de precursores neurales disminuyen progresivamente con la edad, por lo que la neurogénesis adulta es reducida a medida que aumenta el envejecimiento (29).

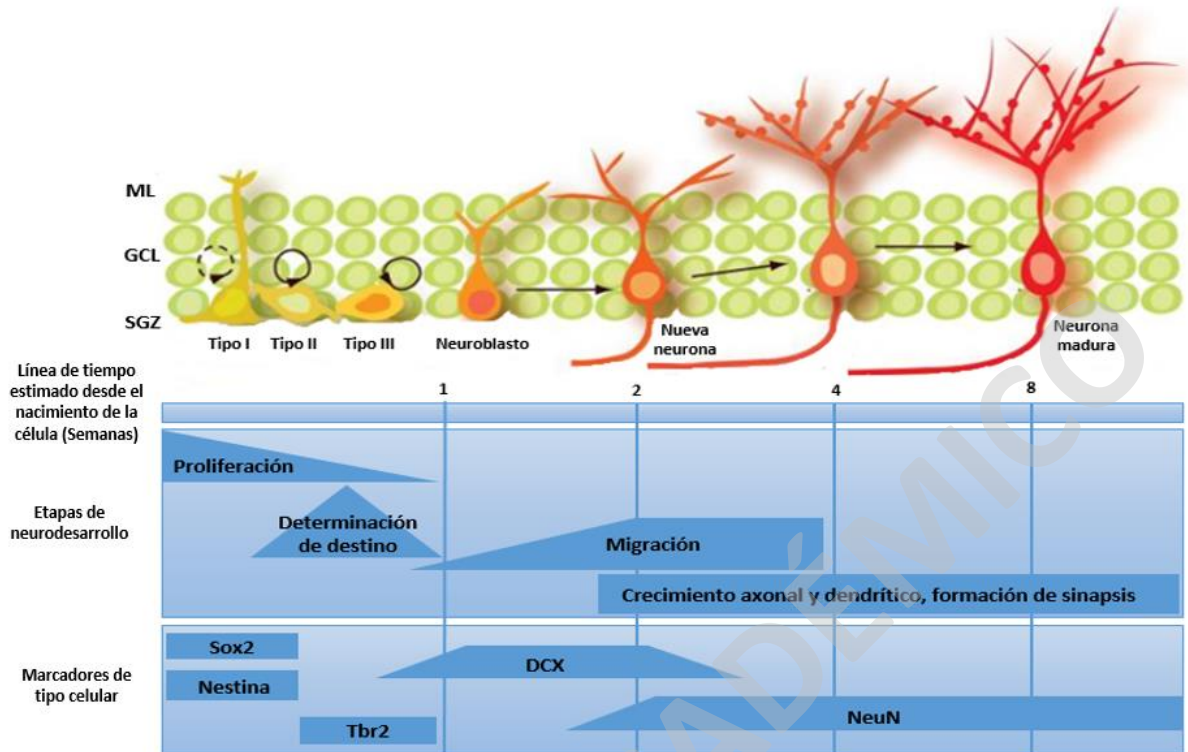


Figura 1. Neurogénesis adulta en la zona subgranular (SGZ) del hipocampo. La presente figura demuestra los diferentes tipos celulares en el proceso de neurogénesis adulta en la SGZ de ratones adultos y el tiempo estimado que demora en completarse. También se indican las etapas del neurodesarrollo y algunos de los marcadores de cada tipo celular. Imagen adaptada de Duan et al., 2008 (28).

También es conocido que el proceso de neurogénesis adulta es altamente regulado y se ha descrito que mutaciones en genes que se expresan en precursores neurales, y que alteran procesos celulares como la proliferación y diferenciación de estos, pueden alterar la formación de las distintas estructuras del cerebro, y como consecuencia ser la causa de diversas enfermedades o condiciones neuropsiquiátricas asociadas al neurodesarrollo de un individuo. A continuación, se mencionarán ejemplos de estos genes relacionados al neurodesarrollo y el cómo se ha visto que pueden regular etapas específicas de la neurogénesis embrionaria como la neurogénesis adulta.

El primer ejemplo, es el gen *FMRP* (Proteína 1 del retraso mental X frágil, *del inglés*: Fragile X Mental Retardation Protein 1), el cual es responsable del síndrome X frágil y el que también es asociado a la regulación de genes que presentan mutaciones de *novo* en el TEA (13). Este gen codifica para una proteína de unión selectiva a ARN la cual forma un complejo de ribonucleoproteína mensajera (mRNP) que puede asociarse con polirribosomas, lo que significa que esta proteína tiene un importante rol involucrado en la inhibición post-transcripcional de la síntesis de proteínas (30). Respecto a las funciones de este gen en el proceso de neurogénesis adulta, se ha visto en análisis in

vivo e in vitro que deleciones de este gen en precursores neurales conducen a una reducción en la neurogénesis, por el aumento en la proliferación de precursores neurales y la disminución en la diferenciación de estos hacia neuronas, favoreciendo en otro sentido, la diferenciación de los precursores hacia astrocitos. En aquellos estudios sugirieron que aquel proceso de neurogénesis adulta era alterado ya que FMRP regula la traducción de varias proteínas como Cdk4, ciclina D1 y GSK3 β , las cuales son involucradas en la proliferación y diferenciación de células madre (31).

Otro ejemplo es el gen *MECP2* (Proteína de unión 2 metil-CpG, *del inglés*: Methyl-CpG Binding Protein 2), el cual se encuentra mutado en el síndrome de Rett y que codifica para una proteína cromosómica con capacidad de unirse a DNA metilado para mediar la represión transcripcional. Con relación a deleciones en este gen, se ha demostrado no altera el correcto desarrollo de precursores neurales en etapas postnatales de crecimiento, pero si se ha observado que interfiere en la transición de neuronas recién nacidas a neuronas maduras. Los autores de estas investigaciones determinaron que dicho resultado fue producto de una disminución en la cantidad de espinas dendríticas y la expresión diferencial de genes asociados a la sinaptogénesis (32). El presente estudio toma relevancia ya que, en el proceso de sinaptogénesis, anomalías en la morfología y en la densidad de espinas dendríticas se presentan en otros tipos de trastornos del neurodesarrollo como el TEA y el síndrome de X frágil (33). Y porque dicho proceso de sinaptogénesis puede estar ligado a cambios morfológicos, como los vistos en otros estudios de mutaciones del gen *MECP2* en el cerebro de ratones adultos, en donde se ven afectadas estructuras como la corteza cerebral y el giro dentado en el hipocampo (34).

Continuando con los ejemplos de genes relacionados a la regulación de la neurogénesis, también se encuentra el gen *DISC1* (Proteína 1 interrumpida en la esquizofrenia, *del inglés*: Disrupted In Schizophrenia 1 Protein), que es implicado en el desarrollo del trastorno esquizofrénico. Este gen ha sido de particular interés debido a que se han identificado diversos SNPs y haplotipos del gen *DISC1* en diferentes poblaciones humanas las cuales han sido asociadas al trastorno bipolar y el trastorno del espectro autista (35, 36). La proteína que es codificada por dicho gen participa en la regulación de múltiples aspectos del proceso de neurogénesis embrionaria y adulta. En la neurogénesis embrionaria, inhibiciones de este gen provocan una deslocalización y disminución en la cantidad de precursores neurales corticales en la SGZ y SVZ, producto de una diferenciación prematura de los precursores hacia neuronas recién nacidas, en síntesis, cuando *DISC1* se encuentra mutado la neurogénesis embrionaria aumenta. Este resultado fue asociado a la mantención de la proliferación

de precursores neurales corticales, debido a que cuando sobreexpresan *DISC1* la cantidad de precursores en la SGZ y SVZ aumenta y con ello la cantidad de neuronas (36). Otros estudios de mutaciones de *DISC1* en etapas embrionarias determinaron que dicho fenómeno de neurogénesis también es relacionado a cambios morfológicos en la corteza cerebral de ratones (37). Respecto al conocimiento que se tiene de este gen en el proceso de neurogénesis adulta, otros análisis han determinado que en ratones nulos para el gen de *DISC1* existe una reducción en la proliferación de precursores neurales y una disminución en la cantidad de neuronas recién nacidas. Además, en aquellos análisis evidenciaron que la reducida cantidad de neuronas que eran integradas en la SGZ, generaban un cambio morfológico reduciendo el volumen de la estructura del giro dentado (38).

Como último ejemplo, se encuentra el gen *ANKRD11* (Proteína 11 contenedora de repeticiones de dominio ankirina, *del inglés*: Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 11), el cual es uno de los genes relacionados a la remodelación de la cromatina, y que mutaciones en aquel son asociadas a la disfunción cognitiva y al TEA en humanos (14). Este gen codifica para una proteína nuclear la cual es implicada en la acetilación de histonas, ya que se une a enzimas modificadoras de la cromatina como las histonas desacetilasas, formando un complejo co-regulador de la transcripción (39, 40). Estudios de deleciones en este gen determinaron que *ANKRD11* juega un rol tanto en la neurogénesis embrionaria como en la neurogénesis adulta. En etapas embrionarias, se sugirió que la neurogénesis era disminuida producto de una reducción en la proliferación de los precursores neurales corticales, provocando con ello una baja en la cantidad de neuronas recién nacidas. En dicho estudio, al realizar una disminución en la expresión de *ANKRD11* también observaron una deslocalización de los precursores neurales corticales en donde aumentaba la cantidad de células en la SGZ y SVZ, no obstante, en la placa cortical era reducida. Respecto a la neurogénesis adulta, se observó que los precursores neurales y las neuronas recién nacidas disminuyen. Dichos resultados asociaron posteriormente a *ANKRD11* como un co-regulador de la transcripción mediante la interacción con HDAC3 y potencialmente con la interacción de otras desacetilasas, las cuales en conjunto podrían regular genes asociados a la proliferación (40).

Estos genes que fueron presentados como ejemplos, plantean la evidencia necesaria para explicar que mutaciones en diversos genes asociados a trastornos del neurodesarrollo tienen implicancias en la biología de precursores neurales como de neuronas, y que al alterar la correcta función de estas células desencadenarán anormales procesos de neurogénesis en etapas embrionarias como adultas, afectando en algunos casos, la morfología del cerebro.

1.3. Proteína Receptor Tirosina Fosfatasa tipo Delta (PTPRD).

De la variedad de genes mutados que son asociados a trastornos del neurodesarrollo, se ha observado uno en particular el cual se presenta en individuos con síndrome de piernas inquietas (41), trastorno obsesivo compulsivo (42) y TEA (43). Dicho gen codifica para la Proteína Receptor Tirosina Fosfatasa tipo Delta (PTPRD) y el cual se encuentra frecuentemente duplicado o con deleciones de su secuencia nucleotídica en los trastornos neurológicos antes mencionados. Dicho gen también ha sido sugerido como uno de los candidatos de estudio para determinar la etiología del TEA, debido a que presenta mutaciones relacionadas a la variación en el número de copias (CNVs, *del inglés*: Copy Number Variation) de *nov*o (13). A la fecha, el gen de PTPRD a tomando relevancia debido a que se han presentado casos clínicos en humanos, en donde los individuos que presentan microdeleciones en el gen de *PTPRD* también presentan cambios morfológicos en el cerebro (trigonocefalia), pérdida auditiva y discapacidad intelectual (43). También este gen tomado importancia en el último tiempo debido a que la evidencia experimental asocia a la proteína PTPRD en múltiples procesos celulares del neurodesarrollo como como la sinaptogénesis, la proliferación, la migración y la localización celular (44, 45, 46). Por lo que esta información en conjunto indica que la proteína PTPRD tiene una función crítica en el proceso de neurodesarrollo, y que mutaciones en el gen que la codifica pueden originar trastornos neurológicos debido a que compromete a múltiples procesos celulares asociados al desarrollo del sistema nervioso.

Con relación a la clasificación y estructura de esta proteína, existen dos tipos de proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), las que se encuentran en el citosol y las que se encuentran en forma de receptor en membranas celulares (RPTP), (47, 48). El tipo de proteínas RPTP son una gran familia de proteínas clasificadas en función de sus dominios. Los RPTP de tipo IIa, son compuestos por tres miembros en vertebrados, los cuales son: la proteína LAR (*Leukocyte common antigen-related*), PTPR sigma (PTPRS) y PTPR delta (PTPRD) (49). Estas proteínas receptoras contienen dominios extracelulares de adhesión celular de inmunoglobulina (Ig) y fibronectina III (FNIII); y dos dominios de tirosina fosfatasa intracelulares, lo que sugiere que participan en interacciones célula-célula y en vías de señalización intracelulares. Respecto a la estructura de la proteína PTPRD, esta presenta cuatro variantes de splicing A, B, C y D (Ver Figura 2), en donde la cantidad de dominios Ig y FNIII varía dependiendo de la isoforma. Estas isoformas de PTPRD son ampliamente expresadas en estructuras del sistema nervioso en donde ocurre neurogénesis adulta como el bulbo olfatorio y el giro dentando en el

hipocampo. Además de también ser expresadas en otras estructuras del cerebro de ratones adultos como la corteza cerebral (49, 50).

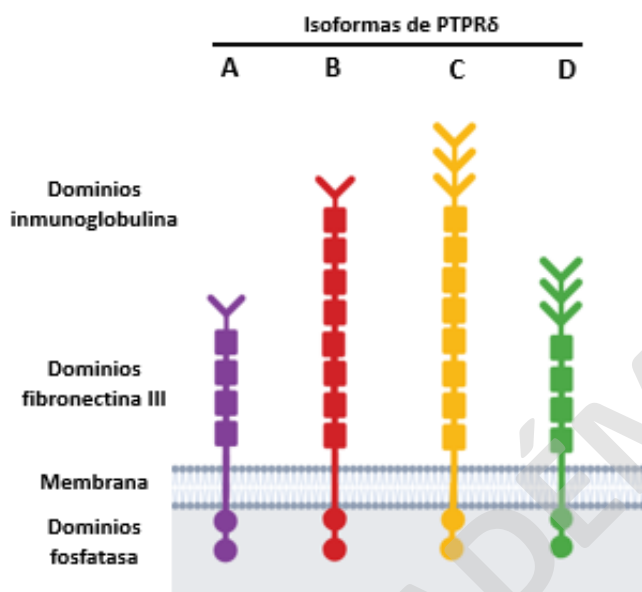


Figura 2. Representación de las isoformas de la proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo delta (PTPRD). La presente figura demuestra la cantidad de repeticiones del dominio fibronectina (Cuadros), de los dominios inmunoglobulina (ángulos en V) y de los dominios fosfatasa para cada isoforma de PTPRD (Círculos). Imagen adaptada de Shishikura et al., 2016 (49).

En estudios recientes llevados a cabo por nuestro laboratorio (En revisión), han sugerido que cuando el gen de PTPRD se encuentra deletado de forma homocigota o heterocigota en embriones de ratón, la cantidad y la proliferación de los precursores neurales corticales disminuye, y que en parte esto se debe a una diferenciación prematura de los precursores neurales hacia neuronas. Además de evidenciar que la neurogénesis embrionaria cortical era aumentada, también evidenciaron que este prematuro aumento de neuronas provocaba una deslocalización de las nuevas células en la corteza cerebral. Otros análisis llevados a cabo en el mismo estudio, y de los cuales tenían por objetivo determinar los mecanismos moleculares subyacentes a la función de la proteína PTPRD, determinaron que el proceso de neurogénesis embrionaria era regulado por dicha fosfatasa a través de la desfosforilación de los receptores tirosina quinasa TrkB y PDGFR β , los cuales estaban relacionados a la activación de las vías de señalización MEK-ERK1/2 (51).

Hasta la fecha se desconoce si PTPRD también puede jugar un rol en la neurogénesis adulta. Por lo tanto, el objetivo central de la presente tesis es determinar si el proceso de neurogénesis adulta es modulado por PTPRD, esto porque: (i) Mutaciones de novo en el gen de PTPRD son asociadas a

trastornos del neurodesarrollo y específicamente del TEA (11, 13, 41, 42); (ii) El gen de PTPRD es expresado en estructuras en donde ocurre la neurogénesis hipocampal adulta (49, 50); (iii) Deleciones del gen PTPRD provocan un aumento en la neurogénesis embrionaria (51). Dicho esto, se plantea como hipótesis para el presente trabajo que la neurogénesis adulta será disminuida en ratones nulos para el gen de PTPRD, lo que es contrario a lo observado en etapas embrionarias. Esto porque como fue mencionado en etapas embrionarias, la ausencia en la expresión de PTPRD provoca una diferenciación prematura de los precursores hacia neuronas, por lo que dicha población de precursores es agotada y que producto de ello en la adultez se esperaría que fuese reducida la cantidad de precursores que den origen a nuevas neuronas. También se propone que aquella disminución en la cantidad de células evidenciará un cambio morfológico reduciendo el grosor de la estructura del giro dentado en el hipocampo de ratones nulos para el gen de PTPRD (Figura 3).

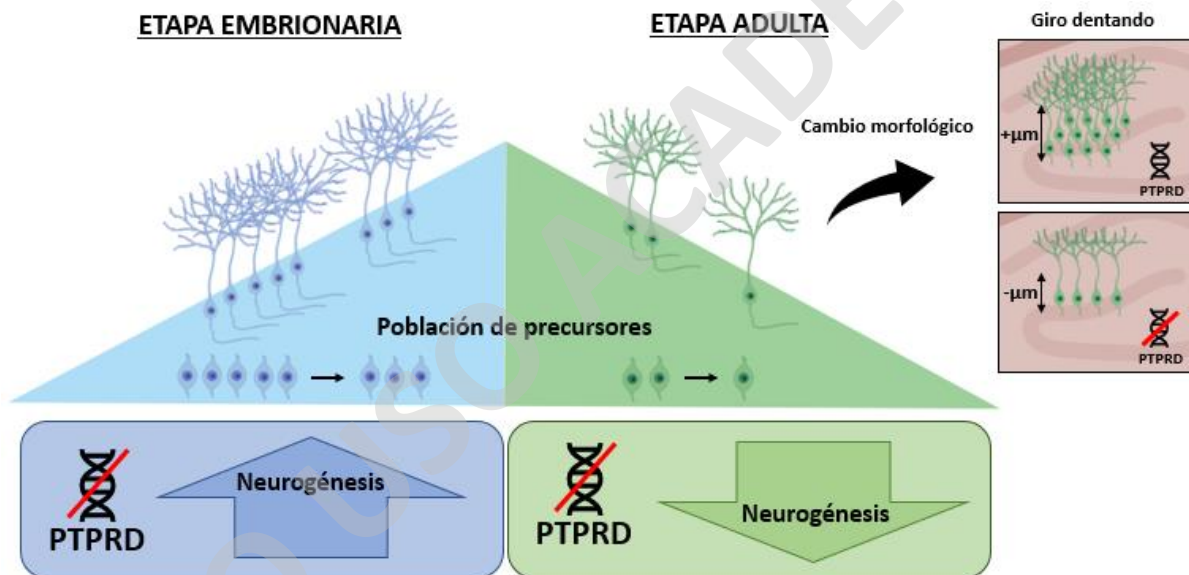


Figura 3. Figura resumen de Hipótesis. La presente figura plantea que la neurogénesis adulta será disminuida producto de la escasa población de precursores neurales causada por la deleción de PTPRD en etapas embrionarias, y que debido a la reducida cantidad de células se evidencie un cambio morfológico en la estructura del giro dentado en el hipocampo de ratones adultos.

2. HIPÓTESIS.

La neurogénesis hipocampal adulta disminuye en ratones nulos para el gen proteína receptor tirosina fosfatasa delta reduciendo el tamaño del giro dentado en el hipocampo

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de la ausencia del gen de PTPRD en la neurogénesis adulta y evaluar los posibles cambios en la morfología del giro dentado en el hipocampo en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 3.2.1. Analizar posibles alteraciones en la cantidad de precursores neurales adultos en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.
- 3.2.2. Determinar si existen cambios en el número de neuronas recién nacidas en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.
- 3.2.3. Estudiar posibles cambios morfológicos en la estructura del giro dentado en el hipocampo de ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MATERIALES.

Materiales	Marca	Número de catálogo	Utilizado en:
Isoflurano USP	Baxter	HUMXVXTOOO1	Adquisición y tratamiento de tejidos.
Paraformaldehído	Merck	30525-89-4	
Sacarosa	Merck	1076511000	
Cloruro de sodio	Merck	7647-14-5	
Tissue-Tek® O.C.T.	Compound, Sakura® Finetek	1189H01	
Portaobjetos	Thermo Scientific™ SuperFrost	6776214	
Cubreobjetos	Merck	VWRI48366-067	
Etanol	Merck	1070172511	Tinción de Nissl
Violeta de cresilo	Merck	1052350025	
Xileno	Sigma	534056	
Medio de montaje	Entellan®-Merck	1079610100	Inmunofluorescencia.
Tris-Buffered Saline (TBS)	Merck	1083870500	
Solución de albúmina de suero bovino (BSA)	Winkler	BM-0150	
Triton X-100	Merck	9036-19-5	
Hoechst	Sigma	911004-45-0	
Medio de montaje	PermaFluor Aqueous Mounting Medium, Thermo Scientific	TA-006-FM	

Anticuerpos	Marca	Número de catálogo	Utilizado en:
Sox2-Cabra	Santa Cruz	SC-17320	Inmunofluorescencia
DCX-Cabra	Santa Cruz	SC-8066	
Anti-cabra Alexa fluor 555	Jackson InmunoResearch	705-165-147	

Equipos	Marca	Utilizado en:
Criostato	Leica CM1850 UV	Adquisición y tratamiento de tejidos.
Microscopio de epifluorescencia y luz transmitida	Leica DMI8	Inmunofluorescencia y Tinción de Nissl

Softwares y recursos virtuales	Utilizado en:
Software LAS X de Leica	Adquisición y procesamiento de imágenes.
ImageJ	Procesamiento de imágenes.
Photoshop CS6	
Prism 7 (GraphPad)	Análisis estadístico y recursos gráficos.

4.2. MÉTODOS.

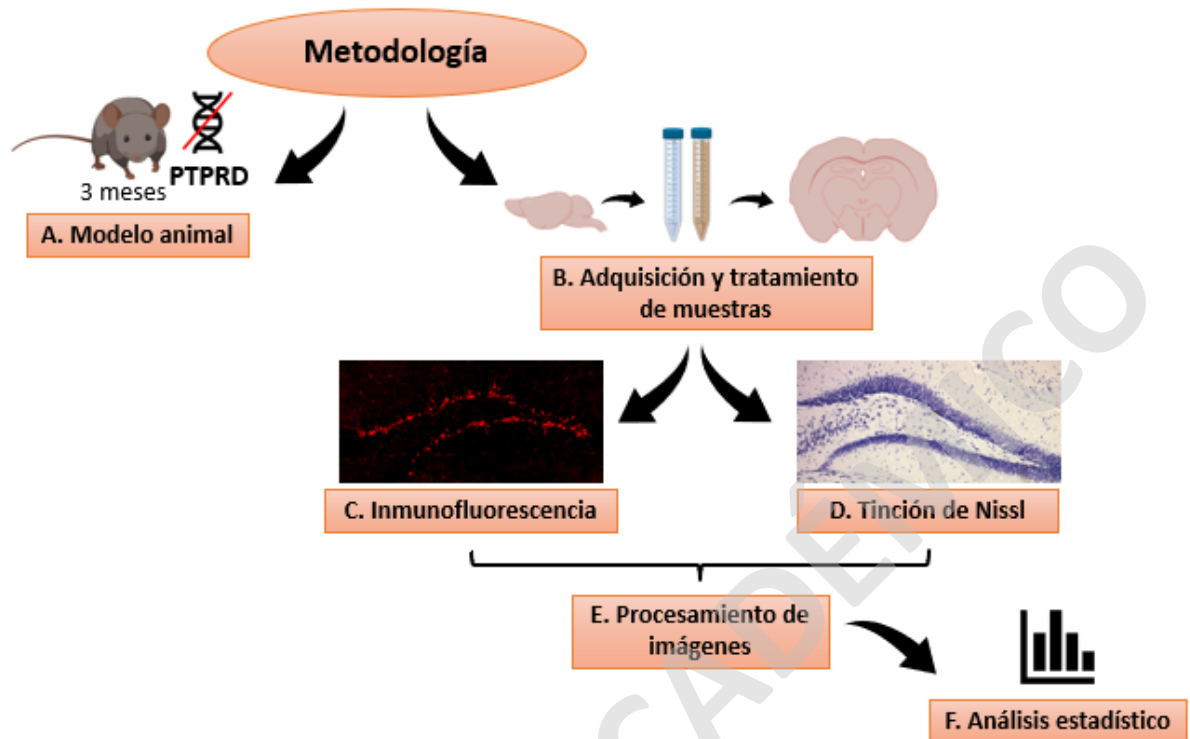


Figura 4. Esquema del procedimiento metodológico. En la presente figura se presenta de forma secuencial de la metodología utilizada para la obtención de resultados. (A) Obtención del modelo murino nulo y heterocigoto para el gen de PTPRD. (B) Adquisición, tratamiento de tejidos nerviosos y obtención de cortes coronales. (C) Inmunofluorescencia para la detección de células Sox2+ y DCX+. (D) Tinción de Nissl para estudios morfológicos. (E) Cuantificación de células y mediciones morfológicas. (F) Análisis de comparación múltiple.

4.2.1. Modelo animal.

Se empleó un modelo murino mutante para el gen de la proteína receptor tirosina fosfatasa delta ($Ptprd^{tm2a(KOMP)Wtsi}$; protein tyrosine phosphatase, receptor type, D; targeted mutation 2a, Wellcome Trust Sanger Institute; MGI:4458607), el cual es localizado en la posición del genoma: Chr4:75941237-78211895 bp y la delección del gen se genera en la posición 75998265 bp. Para más información sobre la estrategia de mutación utilizada visitar el enlace: http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/IKMC_schematics.shtml. El trabajo experimental fue llevado a cabo en el bioterio de la Universidad Mayor. El uso de animales de laboratorio cumplió con lo estipulado en la Ley N°20.380 Sobre Protección Animal en Chile, y fue autorizado por el comité de bioética y bioseguridad de la Universidad Mayor. Para más información visitar el enlace: <https://www.umayor.cl/um/vicerrectoria-investigacion/direccion-investigacion-creacion-artistica-comite-bioetica-bioseguridad>. Las colonias fueron mantenidas con animales heterocigotos y la obtención de animales nulos fue mediante cruces. Los animales fueron genotipados mediante PCR

convencional utilizando los siguientes partidores: Ptprd FLOX fwd 1: 5'-TCACCTCGCTGTTCTTCCTG-3'; Ptprd FLOX rvs 1: 5'-CTTCTCAGTGCCCAACCCTC-3'; Ptprd FLOX fwd 2: 5'-TCACCTCGCTGTTCTTCCTG-3'; Ptprd FLOX rvs 2: 5'-CTTCTCAGTGCCCAACCCTC-3'; Ptprd FLOX CAS 1: 5'-TCGTGGTATCGTTATGCGCC-3'; Ptprd FLOX CAS 2: 5'-TCGTGGTATCGTTATGCGCC-3'.

4.2.2. Adquisición y tratamiento de tejidos.

Para la obtención de tejidos nerviosos a experimentar, se utilizaron ratones de 3 meses de edad para los genotipos control, heterocigoto y nulos para PTPRD. En primera instancia, los animales fueron anestesiados con isoflurano por 5 minutos en una caja aislada. Posteriormente, se procedió a realizar la perfusión intracardiaca utilizando una solución salina fisiológica de cloruro de sodio al 0,9% y la posterior fijación con paraformaldehído al 4%, lo cual se realizó utilizando una bomba peristáltica configurada a 8 rpm. Luego de la perfusión, se llevó a cabo un proceso de disección para la extracción del cerebro según los protocolos establecidos por el laboratorio. Una vez extraídos los cerebros, estos son post-fijados en 10 mL de paraformaldehído al 4% por 24 horas. Completado el tiempo, los cerebros fueron deshidratados en un gradiente de sacarosa al 20%, 25% y 30%, en un total de 72 horas (24 horas en cada concentración de sacarosa). Concluida esta etapa, los cerebros fueron mantenidos por 7 días adicionales en sacarosa al 30%. Los cerebros deshidratados fueron embebidos en O.C.T (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek) y almacenados a -80°C. A partir de los cerebros embebidos, se obtuvieron cortes coronales con un grosor de 18 µm utilizando el criostato (Leica CM1850 UV). Estas secciones coronales fueron montadas en portaobjetos (Thermo Scientific™ SuperFrost), de forma seriada ubicando 12 secciones coronales por portaobjeto. En total se utilizaron 15 portaobjetos, en los cuales 10 portaobjetos abarcaron la región del hipocampo y 5 portaobjetos la región del ventrículo lateral.

4.2.3. Inmunofluorescencia.

Esta técnica se utilizó para determinar la cantidad de células precursoras neurales y neuronas recién nacidas presentes en la zona subgranular del giro dentado. La inmunofluorescencia fue realizada según el protocolo descrito por Cancino et al., 2015 (52). Brevemente, los portaobjetos con la muestra se lavaron con TBS 1X, se permeabilizaron con una solución Triton X-100 al 0,3%, y luego se bloquearon con TBS-BSA al 5%, Triton X-100 al 0,3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario a 4°C durante la noche en solución TBS-BSA al 5%, Triton X-100 al 0,3%. Luego del tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados con TBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente en solución TBS 1X, posteriormente se volvió a lavar los tejidos con TBS 1X y se incubó con Hoechst por

10 minutos. El proceso se finalizó superponiendo un cubreobjetos (Merck) sobre el medio de montaje (PermaFluor Aqueous Mounting Medium, Thermo Scientific). Para la identificación de los precursores neurales adultos, se utiliza el anticuerpo primario contra Sox2 (Proteína de la región determinante del sexo Y-Box2; Sox2-Cabra, 1:500; Santa Cruz). Y para la identificación de neuronas recién nacidas, se utiliza el anticuerpo primario contra la proteína doblecortina asociada a los microtúbulos (DCX-Cabra, 1:500; Santa Cruz). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-cabra conjugados con el fluoróforo Alexa fluor 555 (1:500; Jackson InmunoResearch) y anti-cabra conjugados con Alexa fluor 488 (1:500; Jackson InmunoResearch). La contratinción se realizó con el marcador de núcleos Hoechst (1:1.000; Sigma). Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Leica DMI8 con objetivo de 10X y analizadas usando el programa LAS X (Leica microsystems).

4.2.4. Tinción de Nissl.

Esta técnica fue utilizada para determinar posibles alteraciones en el grosor de la estructura del giro dentado del hipocampo. Esta técnica fue elegida por ser ampliamente utilizada en estudios morfológicos por su capacidad de teñir de ácidos nucleicos (ARNm y ARNr), de esta forma se facilita la visualización de estructuras como el núcleo y el citoplasma de las células. La tinción se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por el *Atlas The Mouse Brain in stereotaxic coordinate* (Atlas de cerebro de ratón) (53). En breve, los cortes coronales montados en los portaobjetos se hidrataron en un gradiente de etanol 100°, 95°, 80° y 50°. Luego de la hidratación, las muestras se sumergieron en violeta de cresilo (Merck) al 0,25% por 10 minutos, luego fueron sumergidas en etanol 100° y posteriormente en xileno. Estas muestras fueron cubiertas por un cubreobjetos (Merck) utilizando medio de montaje (Entellan®-Merck). Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Leica DMI8 con objetivo de 5X y 10X en campo claro, luego analizadas usando el software de Leica LAS X (Leica microsystems).

4.2.5. Procesamiento de imágenes.

Para la cuantificación de los precursores neurales Sox2 positivos, se consideró la suma total de células positivas para Sox2 en 6 cortes coronales que representan partes de la extensión rostro-caudal del cerebro del animal. Este procedimiento se replicó en 3 animales por cada genotipo. La cuantificación se realizó considerando solo las células positivas para Sox2 de la zona subgranular del giro dentado (ver Figura 5). Posteriormente, las imágenes fueron procesadas utilizando la herramienta FIJI del software ImageJ.

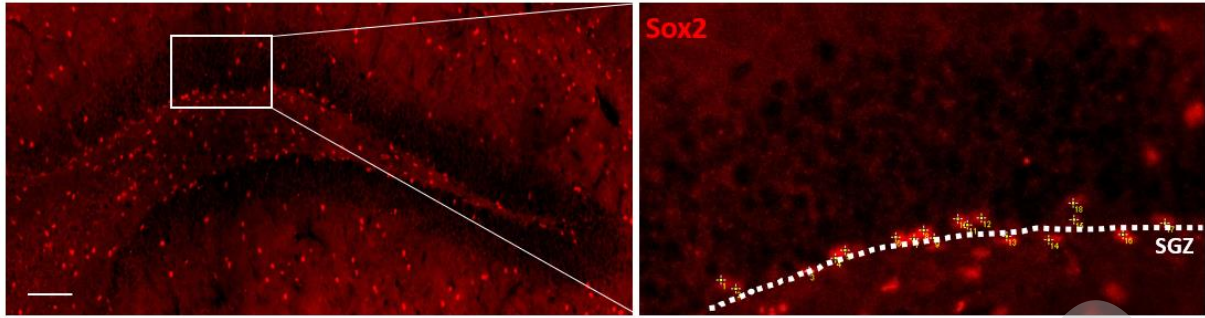


Figura 5. Forma de cuantificación para células positivas para Sox2 en la SGZ. La presente figura demuestra la zona subgranular en líneas punteadas la cual se ocupa como referencia para la cuantificación de células Sox2+. Aumento 10X. Escala 100 μ m.

De forma similar para la cuantificación de neuronas recién nacidas DCX positivas, se consideró la suma total de células positivas en 6 cortes coronales que representan partes de la extensión rostro-caudal del cerebro del animal. El procedimiento se replicó en 3 animales por cada genotipo. La forma de cuantificación fue llevando la imagen de un canal rojo a un formato blanco y negro (.BITS), ya que de esta forma se permitió visualizar mejor la contraposición de las células en la estructura del giro dentado, mejorando de esta forma la cuantificación de las células (ver Figura 6). Posteriormente, las imágenes fueron procesadas utilizando la herramienta FIJI del software ImageJ.

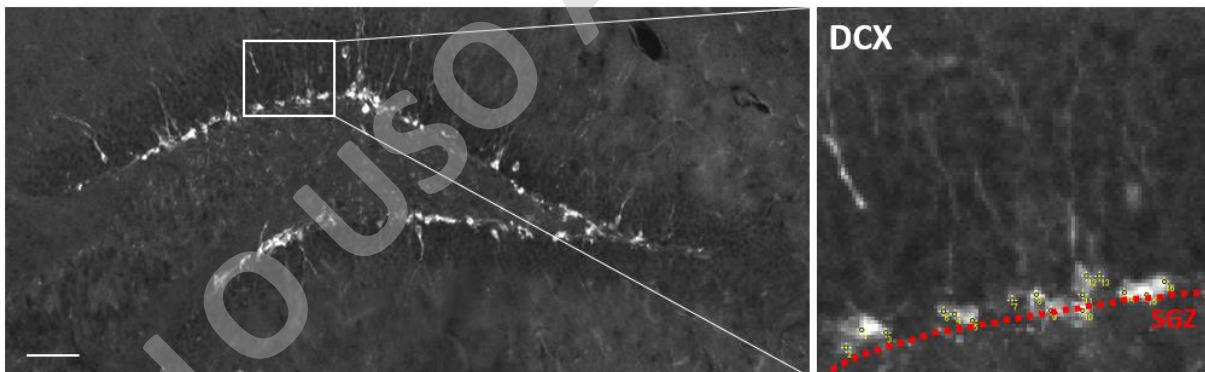


Figura 6. Forma de cuantificación para células positivas para DCX en la SGZ. La presente figura demuestra la zona subgranular en líneas punteadas la cual se ocupa como referencia para la cuantificación de células DCX+. Aumento 10X. Escala 100 μ m.

Para los tejidos con tinción de Nissl, se seleccionaron los cortes más íntegros de cada muestra para ser medidos en una misma sección del hipocampo, estos cortes coronales fueron morfológicamente similares entre sí utilizando como referencia el atlas del cerebro de ratón (53). Posteriormente, se utilizaron 2 formas de medición distintas para la medición del grosor de la lámina superior (LS) e

inferior del giro dentado (LI) y para la medición del grosor en la corteza cerebral, las cuales se detallan a continuación.

La primera forma de medición, que corresponde a la medida del grosor en la lámina superior e inferior del giro dentado, se realizó con la herramienta de medición del software LAS X. Esta herramienta ya viene configurada según el aumento óptico utilizado en el microscopio, y al trazar la línea sobre la estructura define automáticamente la unidad de medida en micrones (ver Figura 7). Es importante mencionar, que al trazar la línea de medición de las estructuras se comienza desde el núcleo de una célula ubicada en el borde superior de la estructura hasta el núcleo de la célula en el borde contrario, y esto se aplica para la medición del grosor en la corteza y para la medición de la lámina superior e inferior del giro dentado. Con relación a las mediciones en el giro dentado, no se utilizó una plantilla otorgada por el Atlas de cerebro de ratón para definir una única línea de medición en todos los tejidos. Esto se debe, a que la estructura del giro dentado es muy dinámica en su morfología, por lo que se mide tomando en cuenta siempre la misma posición. Para ambas formas de medición mencionadas anteriormente, se utilizaron cortes coronales de ratones control (n=3), heterocigotos (n=3) y nulos (n=3).

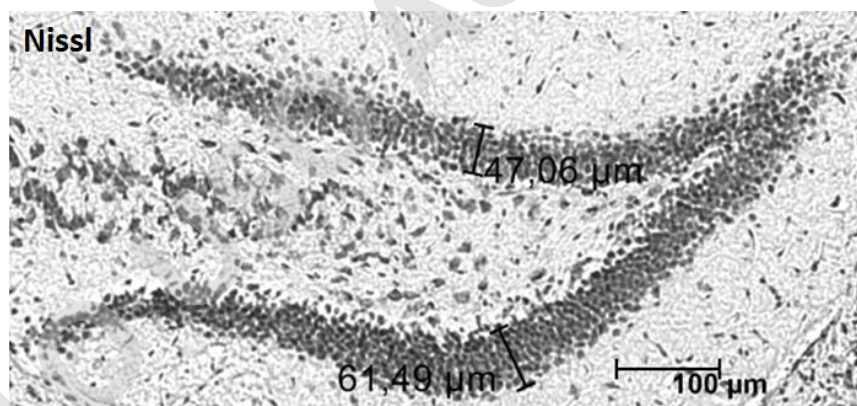


Figura 7. Forma de medición del grosor de la estructura del giro dentado. La presente figura ejemplifica la forma de medición en la lámina superior e inferior del giro dentado utilizando la herramienta de medición del software LAS X. Aumento 10X. Escala 100 μm .

4.2.6. Análisis estadísticos.

El análisis estadístico para la comparación de los grupos experimentales control (n=3), heterocigotos (n=3) y nulos (n=3), se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía (análisis no paramétrico), tomando una distribución Gaussiana. Luego, las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron con un análisis post-hoc de Tukey. Finalmente, todos los análisis y recursos gráficos se obtuvieron con el software Prism 7 (GraphPad).

5. RESULTADOS.

Objetivo específico N°1: Analizar posibles alteraciones en la cantidad de precursores neurales adultos en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.

En diversos trastornos del neurodesarrollo se ha estudiado la implicancia de la delección de genes en precursores neurales. Esto se debe a que este tipo de células son las que orquestan el inicio del neurodesarrollo tanto en etapas embrionarias de un individuo como en etapas adultas. De esta forma se puede ligar la función de un gen en la etiología de un trastorno neurológico basado en el efecto que tiene a nivel celular. Ejemplo de delecciones en genes como *ARKRD11*, *DISC1* y *FMRP* han evidenciado que tienen implicancia en la cantidad de precursores neurales afectando con ello la neurogénesis adulta (31, 38, 40). En base a lo planteado, el objetivo del presente resultado fue determinar un posible cambio en la cantidad de precursores neurales en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo de ratones adultos dado por una delección homocigota y heterocigota del gen de PTPRD. Para aquello se aplicó la técnica de inmunofluorescencia utilizando el marcador de tipo celular Sox2 para precursores neurales en cortes coronales obtenidos a partir de ratones control, heterocigotos y nulos para PTPRD.

En las figuras de la SGZ del giro dentado, se observó que hay una menor cantidad de células positivas para Sox2 en ratones nulos al comparar con el control, y que en ratones heterocigotos al comparar con el control también se observa una menor cantidad células, no obstante, la cantidad de células es mayor comparado con el genotipo nulo (Figura 8A-F). Al analizar estadísticamente los genotipos entre sí, no obtuvimos diferencias significativas en el número precursores neurales adultos (Sox2+) al evaluar el genotipo heterocigoto contra el control ($P > 0,05$; ns). Sin embargo, si obtuvimos como resultado una diferencia significativa entre el genotipo nulo contra el control ($P \leq 0,01$; **) y que esta diferencia también se presentaba al evaluar el genotipo heterocigoto contra el nulo ($P \leq 0,01$; **), (Figura 8.G).

En esta sección evidenciamos que la ausencia de la expresión de PTPRD disminuye la cantidad de precursores neurales en la zona subgranular del giro dentado en ratones nulos y que la población de precursores en el genotipo heterocigoto no difiere estadísticamente en cantidad respecto de un genotipo control.

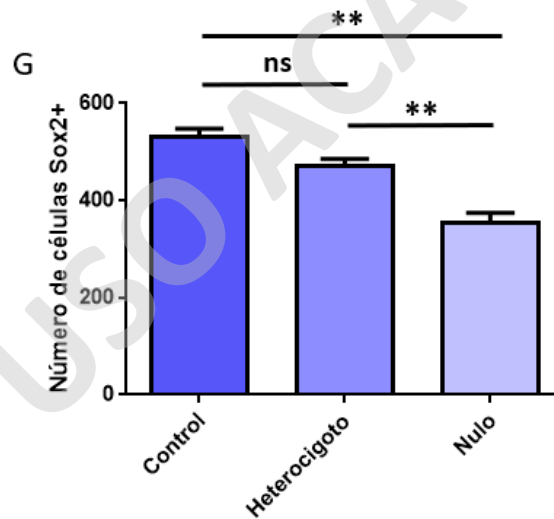
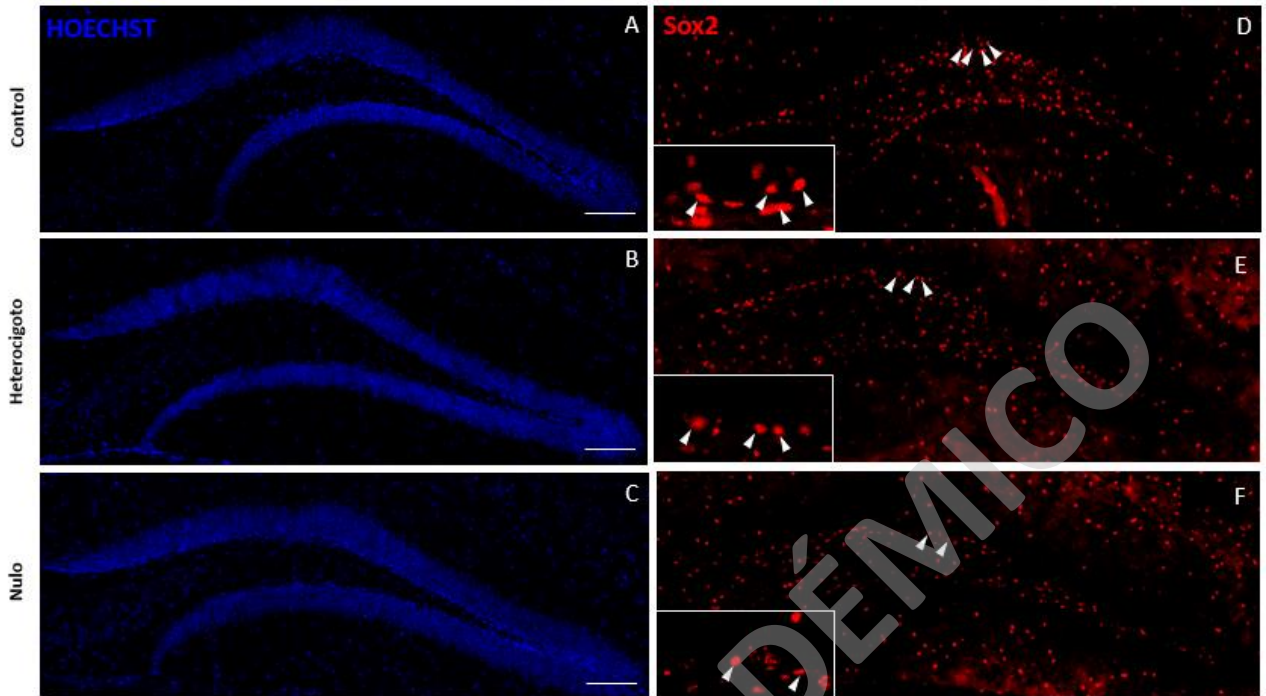


Figura 8. La cantidad células Sox2+ disminuye en ratones nulos para PTPRD. (A-F) Imágenes de cortes coronales de 18 μm que representan la estructura del giro dentado obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Aumento 10X. Escala 100 μm . (A-C) Imágenes del marcador de núcleos (Hoechst; 1:1.000). (D-F) Inmunofluorescencia del marcador para precursores neurales (Sox2, 1:1.000). En las imágenes también se muestra una magnificación de una parte del giro dentando, en donde las flechas blancas ejemplifican las células cuantificadas. (G) Cuantificación de células positivas para Sox2 en la zona subgranular del giro dentado de un total de 6 cortes coronales por cada animal control (n=3), heterocigoto (n=3) y nulo (n=3), (ns= no significativo; $P \leq 0,01$; **). Cada barra representa el promedio de células por genotipo \pm el error estándar de la media.

Objetivo específico N°2: Determinar si existen cambios en el número de neuronas recién nacidas en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.

Tomando en cuenta que deleciones en genes como *ANKRD11* y *DISC1* afectan la cantidad de precursores neurales y que producto de aquello es disminuida la cantidad neuronas recién nacidas en ratones adultos (38, 40), es que el objetivo del presente resultado fue de determinar cambios en la cantidad de neuronas recién nacidas que se posicionan en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo. Para aquello se utilizó la técnica de inmunofluorescencia utilizando el marcador de tipo celular DCX para neuronas recién nacidas en cortes coronales obtenidos a partir de ratones control, heterocigotos y nulos para PTPRD con una edad de 3 meses.

En las figuras de la SGZ del giro dentado, fue posible observar que la cantidad de células positivas para DCX en dicha zona es menor en ratones nulos comparadas contra con la cantidad de células vistas en el control y en el genotipo heterocigoto. También se pudo observar que ratones heterocigotos presentan menor cantidad de células positivas al comparar contra el control, no obstante, hay una mayor cantidad de células comparado con animales nulos (Figura 9A-F). En nuestros resultados de la comparación múltiple entre los genotipos, determinamos una disminución significativa en el número de neuronas recién nacidas (DCX+) en el genotipo heterocigoto al compararlas con el control ($P \leq 0,05$; *). También pudimos determinar que dicha disminución significativa en la cantidad de neuronas recién nacidas, se presenta al comparar el genotipo nulo contra el control ($P \leq 0,001$; ***) y al comprar el genotipo heterocigoto contra el nulo ($P \leq 0,01$; **), (Figura 9G).

En esta sección, los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de la expresión de PTPRD en ratones heterocigotos y nulos de 3 meses, la cantidad de neuronas recién nacidas en la zona subgranular del giro dentado es reducida. En resumen, tomando en cuenta el resultado obtenido de la disminución en la cantidad de precursores y que la cantidad de neuronas recién nacidas en la SGZ también presentan una reducción, es que sugerimos que en animales PTPRD nulos la neurogénesis hipocampal disminuye.

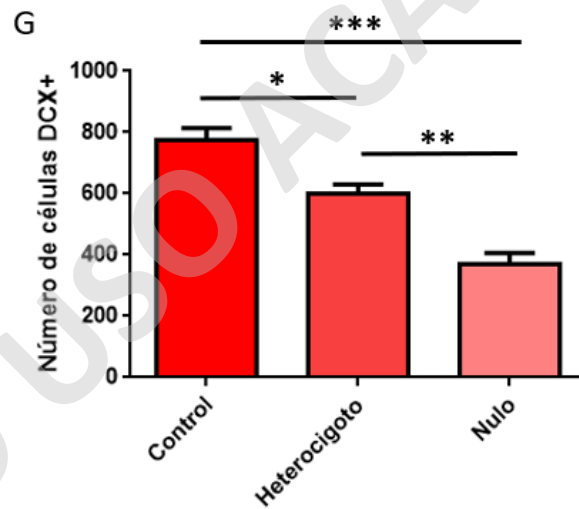
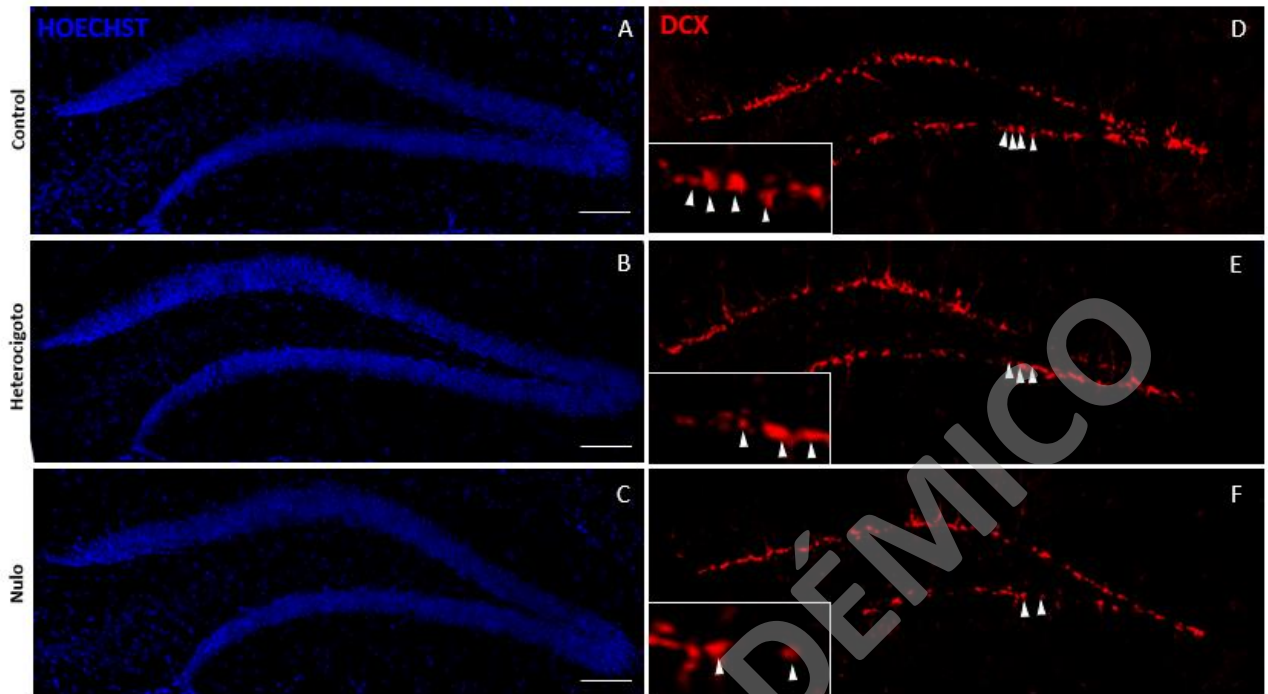


Figura 9. La cantidad de células DCX+ disminuye en ratones heterocigotos y nulos para PTPRD. (A-F) Imágenes de cortes coronales de 18 μm que representan la estructura del giro dentado para animales con genotipo control, heterocigoto y nulos obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Aumento 10X. Escala 100 μm . (A-C) Imágenes del marcador de núcleos (Hoechst; 1:1.000). (D-F) Inmunofluorescencia del marcador de neuronas recién nacidas (DCX; 1:500). En las imágenes también se muestra una magnificación de una parte del giro dentando, en donde las flechas blancas ejemplifican las células cuantificadas. (G) Cuantificación de células positivas para DCX en la zona subgranular del giro dentado de un total de 6 cortes coronales por cada animal control (n=3), heterocigoto (n=3) y nulo (n=3), ($P \leq 0,05$; *, $P \leq 0,01$; **, $P \leq 0,001$; ***). Cada barra representa el promedio de células por genotipo \pm el error estándar de la media.

Objetivo específico N°3: Estudiar posibles cambios morfológicos en la estructura del giro dentado en el hipocampo de ratones nulos y heterocigotos para PTPRD.

Como existen ejemplos de mutaciones en genes como *MECP2* y *DISC1* que están relacionadas a un proceso de neurogénesis adulta alterado y que producto de ello la cantidad de neuronas recién nacidas genera un cambio morfológico en la estructura del hipocampo (34), específicamente de la SGZ (37), es que el objetivo del presente resultado fue confirmar si la delección homocigota y heterocigota del gen de PTPRD afecta la morfología de la estructura del giro dentado la cual es causada por una neurogénesis disminuida. Para aquello se aplicó la técnica de tinción Nissl en cortes coronales obtenidos a partir de ratones control, heterocigotos y nulos para PTPRD con una edad de 3 meses.

De las figuras obtenidas del giro dentado, no visualizaron cambios aparentes al comparar las estructuras del giro dentado del control contra los genotipos heterocigoto y nulo (Figura 10B-D). Posteriormente, al realizar nuestros análisis de comparación múltiple no obtuvimos diferencias significativas en el grosor de la lámina superior e inferior de la estructura del giro dentado entre los genotipos heterocigoto y nulo contra el control ($P > 0,05$; ns), (Figura 10E-F).

Con el presente resultado determinamos que la ausencia en la expresión de PTPRD no afecta la morfología de la estructura del giro dentado de ratones heterocigotos y nulos. En resumen, no se puede sugerir que la neurogénesis disminuida por la ausencia de PTPRD afecte la morfología del giro dentado.

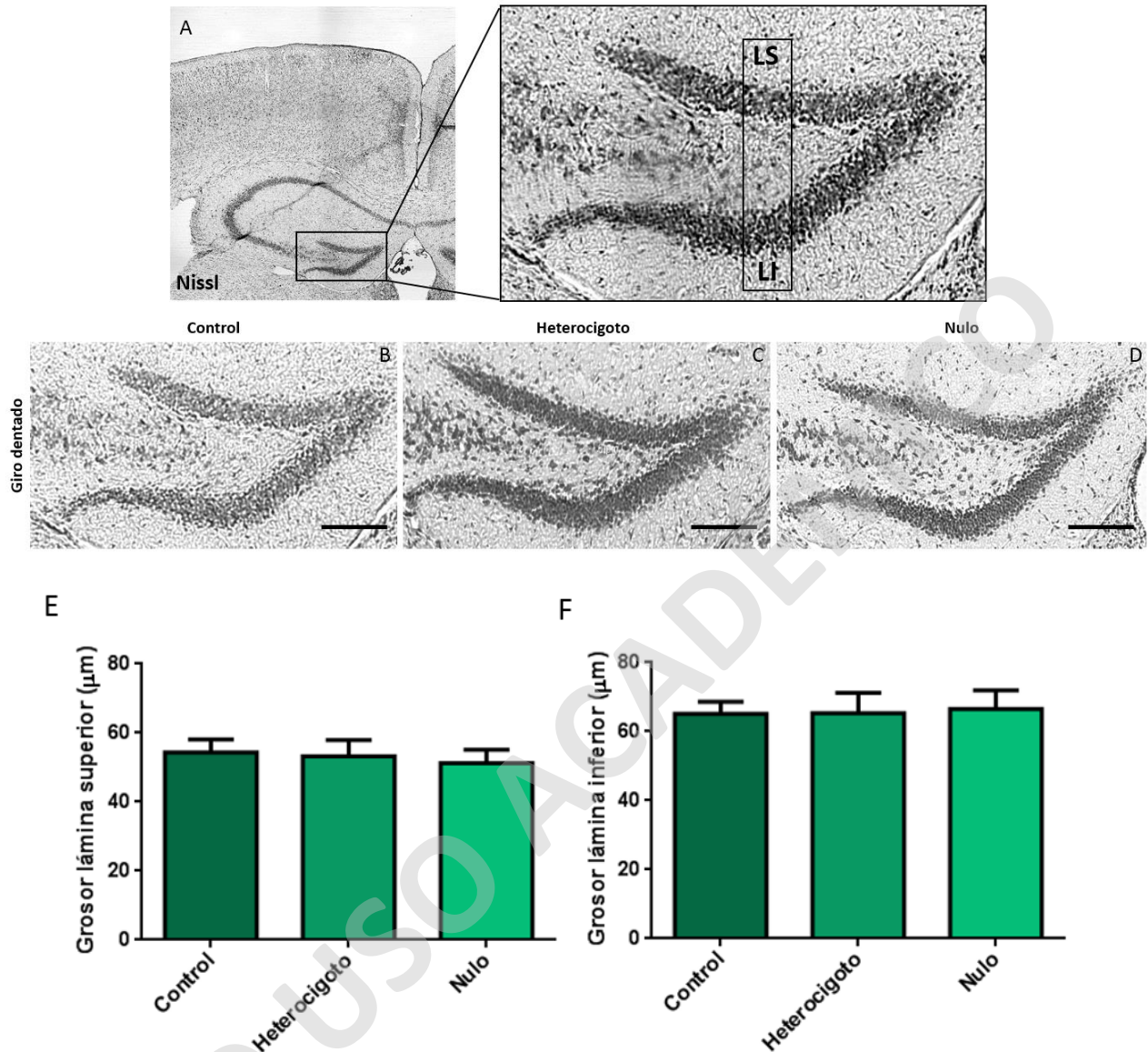


Figura 10. No se presentan cambios morfológicos en la estructura del giro dentado de ratones heterocigotos y nulos para PTPRD. (A) Imagen que visualiza la estructura hipocámpal mediante tinción de Nissl, en la cual se muestra una amplificación de la estructura del giro dentado indicando la lámina superior (LS) e inferior (LI) a medir. (B-D) Imágenes de cortes coronales de 18 µm que representan la estructura de la lámina superior e inferior del giro dentado para cada genotipo. Las imágenes son obtenidas por microscopía de campo claro. Aumento 10X. Escala 100 µm. (E) Medición del grosor de la lámina superior. (F) Medición del grosor de la lámina inferior. Se utilizaron 3 cortes coronales por cada animal control (n=3), heterocigoto (n=3) y nulo (n=3), ($P > 0,05$; ns). Cada barra representa el promedio de medidas de grosor por genotipo \pm el error estándar de la media.

6. DISCUSIÓN.

El trastorno del espectro autista (TEA) en la actualidad ha tomado una gran connotación social y científica debido a la alta prevalencia de individuos diagnosticados y por el incremento que ha tenido en los últimos años, y que esto en parte se debe a la mejora de los diagnósticos y el incremento de la población en los cuales se basan los estudios estadísticos. El trastorno tiene un fuerte componente genético en donde se presentan mutaciones que pueden ser heredadas de padres a hijos o pueden darse de forma espontánea (de novo) (10, 11). De estas mutaciones que son dadas espontáneamente se reconocen dos tipos: los SNPs y las CNVs, en donde este último tipo representa una mayor frecuencia de deleciones y/o duplicaciones que pueden impedir la función de uno o múltiples genes en los casos más graves del TEA, además de otros trastornos neurológicos (14, 15). Los efectos biológicos causados por estas mutaciones hasta la fecha siguen sin ser comprendidos en gran medida. No obstante, existe una gran cantidad de evidencia que relaciona estos tipos de mutaciones al incorrecto desarrollo de los precursores neurales, afectando el proceso de neurogénesis embrionaria como adulta. Por lo que se sugiere en dichas evidencias que las mutaciones dadas en este tipo de células podrían contribuir a la etiología de trastornos del neurodesarrollo como el TEA (31, 38, 40). En el presente trabajo de tesis, se ha estudiado el efecto de una deleción homocigota y heterocigota del gen que codifica para la proteína receptor tirosina fosfatasa delta (PTPRD) sobre la neurogénesis adulta y de los posibles cambios morfológicos asociados a la cantidad de células que implica las alteraciones del mencionado proceso. Dicho gen ha sido de interés, ya que CNVs en él son asociadas a varios trastornos del neurodesarrollo, y con ellos el TEA (11, 13, 41, 42). Además, porque la ausencia de PTPRD ha sido implicada en la neurogénesis embrionaria al disminuir la proliferación de precursores neurales corticales y aumentar la diferenciación de éstos hacia neuronas recién nacidas (51). Y también porque PTPRD es ampliamente expresada en estructuras en donde ocurre el proceso de neurogénesis adulta, como el giro dentado en el hipocampo de ratones adultos (49, 50). Tomando en cuenta estos antecedentes y proyectando lo que puede ocurrir en la neurogénesis de un individuo adulto al tener una agotada población de precursores neurales, la cual es provocada por una neurogénesis aumentada en etapas embrionarias, propusimos como hipótesis que la neurogénesis hipocampal en ratones adultos sería disminuida. En el presente trabajo, no se contemplaron estudios relacionados a los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso de neurogénesis adulta, sin embargo, con nuestros resultados pudimos evidenciar que la ausencia en la expresión de PTPRD regula el número y diferenciación de precursores neurales, disminuyendo de

esta forma la neurogénesis adulta. Y que aquella disminución de la neurogénesis no es asociada un cambio morfológico basado en el grosor de la estructura del giro dentado.

Cabe mencionar que en nuestros análisis de cuantificación y morfología, consideramos genotipos heterocigotos y nulos a modo de comprender el grado de influencia de la dosis alélica del gen de PTPRD en la neurogénesis adulta, y con ello asociar la influencia de la ausencia de uno o dos alelos sobre el desarrollo trastornos neurológicos como el TEA. En nuestros resultados, los cuales se condicen con los obtenidos en periodos embrionarios (51), observamos que hasta una dosis alélica del gen de PTPRD puede provocar cambios en la cantidad de células precursoras que van a alterar el proceso de neurogénesis adulta. Con esta información no solo es posible sugerir que la expresión de PTPRD es necesaria para el correcto neurodesarrollo a lo largo de la vida de un individuo, sino que también en las dosis alélicas en las cuales el gen se presenta para ser expresado en el sistema nervioso.

Un punto interesante relacionado a nuestro trabajo, fue obtener como resultado una diferencia no significativa en la cantidad de células positivas para Sox2 en el genotipo heterocigoto. Aquel resultado no correspondió con la observación vista en las figuras y a lo esperado en la figura modelo de nuestra hipótesis, en la cual se esperaba tener una cantidad de células precursoras menor que el control y mayor que el genotipo nulo. En base a aquel resultado obtenido e incluyendo los resultados de la cuantificación de neuronas recién nacidas, sugerimos que no es posible evidenciar que exista una neurogénesis reducida en el genotipo heterocigoto. No obstante, como si se obtiene una reducción de células positivas para DCX y que existe una tendencia a ser menor la cantidad de células Sox2+ en el heterocigoto al compararlo con el control, esto quiere decir que si es posible que se presente una disminución en el número de precursores, la cual con solo nuestros resultados no es posible confirmar. Una forma que podría respaldar que la neurogénesis hipocampal es disminuida en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD, y en parte confirmar que la cantidad de precursores neurales disminuye en el genotipo heterocigoto en trabajos posteriores, sería implementando a nuestros resultados enfoques basados en la proliferación y muerte celular de precursores neurales y neuronas recién nacidas. Al evaluar el estado proliferativo de las células, se puede descartar si los precursores están en un proceso de diferenciación celular si se observa una disminución en la proliferación, o si la población de precursores no se está diferenciando si se observa un valor de proliferación no significativo comparando contra el control. En base a ello, podríamos descartar si el

resultado observado en la cantidad de precursores en el genotipo heterocigoto se debe a un nuevo fenómeno, o es debido a un parámetro estadístico relacionado a las muestras cuantificadas. La otra forma de verificar que esta ocurriendo un proceso de neurogénesis adulta disminuida con el fin de respaldar nuestros resultados, es descartar si la disminución en el número de precursores y neuronas recién nacidas es debido a la muerte de estos tipos celulares. Para aquello se pueden utilizar marcadores de expresión asociados a la apoptosis como la proteína caspasa 3 (CC3), junto con los marcadores de cada tipo celular, en donde no se esperarían obtener diferencias significativas entre los genotipos.

A la fecha, diversos estudios se han centrado en estudiar la funcionalidad de las neuronas recién nacidas que se incorporan a la SGZ del giro dentado en el hipocampo, y la gran mayoría de aquellos estudios se generan diversas condiciones en las cuales las neuronas son afectadas. Estos tipos de análisis tienen como objetivo evaluar el como repercuten dichas condiciones en el aprendizaje y la memoria de un individuo (25, 26, 27, 54). Dicho esto, hay un estudio publicado en ratones nulos para PTPRD los cuales determinaron mediante análisis electrofisiológicos, que dicha proteína es necesaria para la modulación de la plasticidad sináptica a largo plazo en el hipocampo. Además, determinaron mediante análisis de comportamiento que los ratones presentaban una reducida capacidad cognitiva al realizar tareas asociadas a la memoria y el aprendizaje (55). Con nuestros resultados en los sugerimos que existe una neurogénesis disminuida, pueden complementar el mencionado antecedente ya que los ratones nulos para PTPRD no sólo podrían tener una reducida capacidad de aprendizaje y memoria dada por la alterada plasticidad sináptica a largo plazo, sino que también, por la reducida cantidad de neuronas recién nacidas que están realizando dicho proceso.

Otro intrigante punto de discusión basado en el resultado del análisis morfológico, fue no obtener diferencias significativas en el grosor de la lámina superior e inferior del giro dentado en los genotipos heterocigoto y nulo contra el control. Aquellos resultados no correspondieron con lo propuesto en nuestro modelo de hipótesis, en donde esperábamos una reducción del grosor en el giro dentado el cual sería causado por una reducida población de precursores y neuronas recién nacidas en la mencionada estructura neurogénica. Si bien evidenciamos que la ausencia de PTPRD al generar una disminuida neurogénesis no afecta la morfología del giro dentado en cerebros adultos, como laboratorio quisimos profundizar los análisis morfológicos haciendo una proyección del como la ausencia de PTPRD en etapas embrionarias podría evidenciar un cambio en el cerebro de ratones

adultos. Para aquello, tomamos en consideración el antecedente que evidencia que la neurogénesis cortical es aumentada en etapas embrionarias y que aquellas neuronas formadas presentan una deslocalización en la corteza cerebral (51). Al evaluar el grosor de la corteza cerebral de ratones adultos tampoco observamos un cambio en dicha estructura presente en ratones heterocigotos y nulos para PTPRD (Figura S1B-D), lo que fue confirmado posteriormente por el análisis de comparación múltiple en donde no se presentaban diferencias significativas (Figura S1E). Además, en otros estudios preliminares realizados por nuestro laboratorio en donde se evaluó el grosor de la corteza cerebral de ratones post-natales, del mismo modo que los resultados morfológicos antes presentados, no se evidenciaba un cambio morfológico en la corteza cerebral. Este conjunto de resultados, nos llevó a sugerir que la expresión de PTPRD a lo largo de la vida de un animal no necesariamente juega un rol en la morfología del cerebro a través del proceso de neurogénesis. Sin embargo, el no observar cambios morfológicos en nuestros resultados abre la posibilidad de interesantes propuestas para confirmar que efectivamente la morfología no es afectada. Esto podría ser evaluando aspectos de los estudios morfológicos como la densidad celular o cambios de volumen en la extensión rostral-caudal del giro dentado. Otro punto de vista relacionado a este último resultado, es que no observar cambios morfológicos también puede deberse a que en el proceso de neurogénesis la cantidad de neuronas que se genera no sea significativa para cambiar la estructura del cerebro. O que también, otros procesos del neurodesarrollo como la gliogénesis, estén generando una suerte de compensación celular en las estructuras neurogénicas. Estos tipos de efectos serían interesantes de evaluar en futuros trabajos con deleciones de PTPRD evaluando otros tipos celulares, ya que existe evidencia que apoya que no solo los procesos de neurogénesis son afectados, como por ejemplo, lo visto en mutaciones del gen FMRP en donde se favorece la diferenciación de los precursores neurales hacia astrocitos (31).

7. CONCLUSIONES.

- (1) De acuerdo con el objetivo planteado de determinar posibles alteraciones en la cantidad de precursores neurales adultos en la SGZ del giro dentado, en donde se esperaba obtener una disminución en la cantidad de células Sox2+. Nuestros resultados sugieren que existe una reducción en la cantidad de precursores neurales presentes en la SGZ del giro dentado en ratones nulos para PTPRD, lo que fue acorde con lo esperado. Sin embargo, no se puede asegurar que dicha disminución en la cantidad de células sea significativa en ratones con genotipo heterocigoto.
- (2) De acuerdo con el objetivo propuesto para determinar posibles cambios en la cantidad de neuronas recién nacidas en la SGZ del giro dentado, en donde se esperaba obtener una reducción en la cantidad de células DCX+. Nuestros resultados sugieren que existe una disminución en la cantidad de neuronas recién nacidas en la SGZ del giro dentado en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD, lo que es correspondiente con lo esperado.
- (3) De acuerdo con el objetivo propuesto para determinar posibles cambios morfológicos en la estructura del giro dentado producto de una neurogénesis disminuida, en donde se esperaba encontrar una reducción en el grosor de la lámina superior e inferior del giro dentado. Nuestros resultados sugieren que la neurogénesis disminuida por la ausencia de PTPRD no afecta la morfología del giro dentado en ratones nulos y heterocigotos para PTPRD, lo que no es conforme a lo esperado.

En conclusión, con nuestros resultados pudimos evidenciar que la ausencia en la expresión de PTPRD regula el número y diferenciación de precursores neurales, disminuyendo de esta forma la neurogénesis hipocampal adulta de ratones nulos para PTPRD. Sin embargo, aquella disminución de la neurogénesis no es asociada un cambio morfológico basado en el grosor de la estructura del giro dentado (Figura 11).

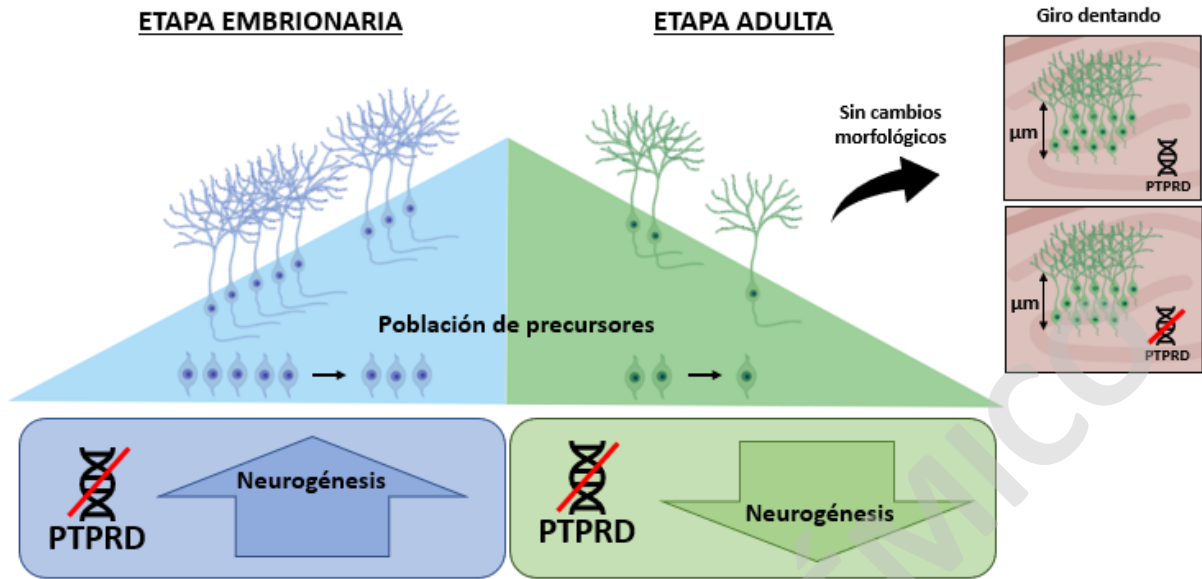


Figura 11. La neurogénesis hipocámpal adulta es disminuida en ratones nulos para PTPRD sin generar cambios morfológicos en la estructura del giro dentado. La presente figura plantea un modelo final del presente trabajo basado en los resultados obtenidos.

SOLO USO ACADÉMICO

8. PROYECCIONES.

El proceso de neurogénesis adulta que se mantiene a lo largo de la vida de un mamífero ha generado un particular interés no solo por el hecho de que derriba el dogma de que la neurogénesis es exclusiva de periodos embrionarios, sino que también plantea perspectivas sobre la plasticidad del sistema nervioso adulto y sus funciones. Como aún es desconocida la etiología de trastornos neurológicos como el TEA y la funcionalidad de las nuevas neuronas integradas, la presente proyección tiene por objetivo proponer en términos generales, posibles aplicaciones que complementen futuras terapias génicas para el tratamiento de mutaciones relacionadas a la pérdida de la función de un gen. Es importante tener en cuenta que existen diversos tipos mutaciones que se asocian a trastornos neurológicos como el TEA, y que estas mismas presentan diferentes frecuencias que son definidas en base a cuantos casos se ha visto que altera la función de un gen (12, 14, 15). Considerando solo este contexto, es complejo suponer que la causa de trastornos neurológicos sea exclusiva de un gen en particular, por lo que es de esperar que las futuras terapias génicas estén enfocadas en la corrección de múltiples genes. Sin embargo, todavía falta conocimiento de cómo la pérdida de la función de un gen o su posible restauración tiene un efecto a nivel biológico, y más aún sobre los efectos de genes en conjunto.

Dicho esto, se podría postular como futura proyección un enfoque terapéutico en donde se restaure a niveles normales la cantidad de neuronas en individuos adultos que presentan deleciones homocigotas o heterocigotas del gen de PTPRD, y con ello obtener una mejora en determinados procesos cognitivos. Esto se podría realizar mediante una terapia génica en donde se introduzcan secuencias nucleotídicas que porten el gen de PTPRD y que tengan la capacidad de expresar la proteína que se encuentra ausente en precursores neurales, por ejemplo, a través de vectores como virus adeno-asociados o nanopartículas (55, 56). De esta forma, se esperaría obtener una mejora en la función de los precursores neurales aumentando su capacidad de proliferación y diferenciación, y con ello el aumento en la cantidad de neuronas. Sin embargo, para que aquello pueda llegar a ser una realidad aplicable en seres humanos, aun se debe profundizar en términos de investigación el cómo generar la restauración de la cantidad de neuronas y comprobar que tipo de efectos puede causar en modelos animales.

Si esta proyección se concretara y tuviera los efectos esperados, el siguiente punto de discusión sería cómo hacer que esta metodología de terapia génica con vectores sea más eficiente y acorde con las

necesidades que se requieren en un campo clínico. Por ejemplo, que los vectores sean administrados de formas no invasivas en un paciente, que no generen efectos secundarios, que las dosis con que son suministrados sean eficaces o que permitan portar no solo la secuencia de PTPRD, sino que también de otros genes mutados. Para esto podemos ocupar un enfoque biotecnológico basado en la modificación de los vectores con el fin de obtener un mejor tratamiento. Una opción viable sería utilizar nanopartículas de sílice que pueden ser administradas por vía intravenosa (56) y que han sido descritas con la capacidad de expresar EGFP in vivo (57), las cuales tengan adosadas en su superficie el material genético para aumentar en este caso, la expresión de PTPRD bajo promotores específicos de precursores, y que además se le agreguen moléculas que le permitan traspasar la barrera hematoencefálica en mayor cantidad para llegar al sistema nervioso central como, por ejemplo, las regiones de interacción de lactoferrina que han sido descritas en otros estudios para mejorar la entrada de nanopartículas al sistema nervioso (58, 56). Una segunda opción, sería diseñar nanopartículas con múltiples secuencias de genes adosadas en su superficie con el fin de expresar varios genes de forma simultánea y con ello resolver casos en donde se presente más de un gen alterado, esto último sería posible ya que se han descrito que estos tipos de vectores pueden movilizar plásmidos, hasta el momento con un tamaño de 4737bp, lo que abre posibilidades de nuevos diseños de éstos para su utilización (56). Todos estos tipos de aplicaciones que son planteadas de forma general, en un futuro podrían ser alternativas para mejoras en los tratamientos de trastornos neurológicos como de otras patologías, no obstante, y como fue mencionado anteriormente se requiere de un mayor conocimiento a nivel biológico de los fenómenos a los cuales se quiere tratar.

9. REFERENCIAS.

1. Liu X, Shimada T, Otowa T, Wu Y, Kawamura Y, Tochigi M et al. Genome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder in the East Asian Populations. *Autism Research*. 2015;9(3):340-349.
2. American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Data and Statistics | Autism Spectrum Disorder (ASD) | NCBDDD | CDC*. [online] Available at: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html> [Accessed 21 Jan. 2019].
4. Baio J, Wiggins L, Christensen D, Maenner M, Daniels J, Warren Z et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*. 2018;67(6):1-23.
5. Hallmayer J. Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *Archives of General Psychiatry*. 2011;68(11):1095.
6. Rosenberg R, Law J, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann W, Law P. Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2009;163(10):907.
7. Taniai H, Nishiyama T, Miyachi T, Imaeda M, Sumi S. Genetic influences on the broad spectrum of autism: Study of proband-ascertained twins. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2008;147B(6):844-849.
8. Ozonoff S, Young G, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L et al. Recurrence Risk for Autism Spectrum Disorders: A Baby Siblings Research Consortium Study. *PEDIATRICS*. 2011;.
9. Sumi S, Taniai H, Miyachi T, Tanemura M. Sibling risk of pervasive developmental disorder estimated by means of an epidemiologic survey in Nagoya, Japan. *Journal of Human Genetics*. 2006;51(6):518-522.
10. Weiss L. Autism genetics: emerging data from genome-wide copy-number and single nucleotide polymorphism scans. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2009;9(8):795-803.
11. Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee Y, Leotta A, Kendall J et al. Rare De Novo and Transmitted Copy-Number Variation in Autistic Spectrum Disorders. *Neuron*. 2011;70(5):886-897.

12. Alonso-Gonzalez A, Rodriguez-Fontenla C, Carracedo A. De novo Mutations (DNMs) in Autism Spectrum Disorder (ASD): Pathway and Network Analysis. *Frontiers in Genetics*. 2018;9.
13. Ronemus M, Lossifov I, Levy D, Wigler M. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(2):133-141.
14. Marshall C, Noor A, Vincent J, Lionel A, Feuk L, Skaug J et al. Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(2):477-488.
15. Pinto D, Pagnamenta A, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010;466(7304):368-372.
16. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L et al. Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 2014;94(5):677-694.
17. Sanders S, He X, Willsey A, Ercan-Sencicek A, Samocha K, Cicek A et al. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*. 2015;87(6):1215-1233.
18. Zeng L, Zhang P, Shi L, Yamamoto V, Lu W, Wang K. Functional Impacts of NRXN1 Knockdown on Neurodevelopment in Stem Cell Models. *PLoS ONE*. 2013;8(3): e59685.
19. Kathuria A, Nowosiad P, Jagasia R, Aigner S, Taylor R, Andreae L et al. Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Molecular Psychiatry*. 2017;23(3):735-746.
20. Gage F. Mammalian Neural Stem Cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-1438.
21. Kalyani A, Hobson K, Rao M. Neuroepithelial Stem Cells from the Embryonic Spinal Cord: Isolation, Characterization, and Clonal Analysis. *Developmental Biology*. 1997;186(2):202-223.
22. Vaccarino F. Stem Cells in Neurodevelopment and Plasticity. *Neuropsychopharmacology*. 2001;25(6):805-815.
23. Ming G, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*. 2011;70(4):687-702.

24. Fonseca E, Mançanares A, Ambrósio C, Miglino M. Review point on neural stem cells and neurogenic areas of the central nervous system. *Open Journal of Animal Sciences*. 2013;03(03):242-247.
25. Lazarov O, Hollands C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Progress in Neurobiology*. 2016;138-140:1-18.
26. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*. 2008;11(10):1153-1161.
27. Zhao C. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(1):3-11.
28. Duan X, Kang E, Liu C, Ming G, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*. 2008;18(1):108-115.
29. Jin K. Neurogenesis in the aging brain. *Clinical Interventions in Aging*. 2008; Volume 2:605-610.
30. Bassell G, Warren S. Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. *Neuron*. 2008;60(2):201-214.
31. Luo Y, Shan G, Guo W, Smrt R, Johnson E, Li X et al. Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Proliferation and Differentiation of Adult Neural Stem/Progenitor Cells. *PLoS Genetics*. 2010;6(4): e1000898.
32. Smrt R, Eaves-Egenes J, Barkho B, Santistevan N, Zhao C, Aimone J et al. Mecp2 deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiology of Disease*. 2007;27(1):77-89.
33. Fiala J, Spacek J, Harris K. Dendritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders?. *Brain Research Reviews*. 2002;39(1):29-54.
34. Belichenko N, Belichenko P, Li H, Mobley W, Francke U. Comparative study of brain morphology in Mecp2 mutant mouse models of Rett syndrome. *The Journal of Comparative Neurology*. 2008;508(1):184-195.

35. Blackwood D, Fordyce A, Walker M, St. Clair D, Porteous D, Muir W. Schizophrenia and Affective Disorders—Cosegregation with a Translocation at Chromosome 1q42 That Directly Disrupts Brain-Expressed Genes: Clinical and P300 Findings in a Family. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;69(2):428-433.
36. Mao Y, Ge X, Frank C, Madison J, Koehler A, Doud M et al. Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3 β / β -Catenin Signaling. *Cell*. 2009;136(6):1017-1031.
37. Lee F, Fadel M, Preston-Maher K, Cordes S, Clapcote S, Price D et al. Disc1 Point Mutations in Mice Affect Development of the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(9):3197-3206.
38. Chandran J, Kazanis I, Clapcote S, Ogawa F, Millar J, Porteous D et al. Disc1 Variation Leads to Specific Alterations in Adult Neurogenesis. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e108088.
39. Zhang A, Li C, Chen J. Characterization of transcriptional regulatory domains of ankyrin repeat cofactor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;358(4):1034-1040.
40. Gallagher D, Voronova A, Zander M, Cancino G, Bramall A, Krause M et al. Ankrd11 Is a Chromatin Regulator Involved in Autism that Is Essential for Neural Development. *Developmental Cell*. 2015;32(1):31-42.
41. Schormair B, Kemlink D, Roeske D, Eckstein G, Xiong L, Lichtner P et al. PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) is associated with restless legs syndrome. *Nature Genetics*. 2008;40(8):946-948.
42. Gazzellone M, Zarrei M, Burton C, Walker S, Uddin M, Shaheen S et al. Uncovering obsessive-compulsive disorder risk genes in a pediatric cohort by high-resolution analysis of copy number variation. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 2016;8(1).
43. Choucair N, Mignon-Ravix C, Cacciagli P, Abou Ghoch J, Fawaz A, Mégarbané A et al. Evidence that homozygous PTPRD gene microdeletion causes trigonocephaly, hearing loss, and intellectual disability. *Molecular Cytogenetics*. 2015;8(1).

44. Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y et al. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP δ trans-synaptic interaction. *Nature Neuroscience*. 2012;15(3):389-398.
45. Uetani N. Mammalian Motoneuron Axon Targeting Requires Receptor Protein Tyrosine Phosphatases sigma and delta. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(22):5872-5880.
46. Yamagata, A., Yoshida, T., Sato, Y., Goto-Ito, S., Uemura, T., Maeda, A., Shiroshima, T., Iwasawa-Okamoto, S., Mori, H., Mishina, M. and Fukai, S. (2015). Mechanisms of splicing-dependent trans-synaptic adhesion by PTP δ -IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation. *Nature Communications*, 6(1).
47. Hendriks W, Elson A, Harroch S, Pulido R, Stoker A, den Hertog J. Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS Journal*. 2012;280(2):708-730.
48. Chagnon M, Uetani N, Tremblay M. Functional significance of the LAR receptor protein tyrosine phosphatase family in development and diseases. *Biochemistry and Cell Biology*. 2004;82(6):664-675.
49. Shishikura M, Nakamura F, Yamashita N, Uetani N, Iwakura Y, Goshima Y. Expression of receptor protein tyrosine phosphatase δ , PTP δ , in mouse central nervous system. *Brain Research*. 2016; 1642:244-254.
50. Mouse.brain-map.org. (2019). *Gene Detail: Allen Brain Atlas: Mouse Brain*. [online] Available at: <http://mouse.brain-map.org/gene/show/19029> [Accessed 21 Jan. 2019].
51. Hideaki Tomita, Francisca Cornejo, Begoña Aranda, Cameron L. Woodard, Constanza C. Rioseco, Benjamin G. Neel, Alejanda Alvarez, David R. Kaplan, Freda D. Miller, and Gonzalo I. Cancino. The protein tyrosine phosphatase receptor delta, PTPRD, regulates developmental neurogenesis. (En revisión) :1–54.
52. Cancino G, Fatt M, Miller F, Kaplan D. Conditional ablation of p63 indicates that it is essential for embryonic development of the central nervous system. *Cell Cycle*. 2015;14(20):3270-3281.
53. Paxinos, G. and Franklin, K. (2013). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam: Elsevier/AP.

54. Deng W, Saxe M, Gallina I, Gage F. Adult-Born Hippocampal Dentate Granule Cells Undergoing Maturation Modulate Learning and Memory in the Brain. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(43):13532-13542.
55. Pignataro, D., Sucunza, D., Vanrell, L., Lopez-Franco, E., Dopeso-Reyes, I., Vales, A., Hommel, M., Rico, A., Lanciego, J. and Gonzalez-Aseguinolaza, G. (2017). Adeno-Associated Viral Vectors Serotype 8 for Cell-Specific Delivery of Therapeutic Genes in the Central Nervous System. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11.
56. Huang, R., Qu, Y., Ke, W., Zhu, J., Pei, Y. and Jiang, C. (2007). Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *The FASEB Journal*, 21(4), pp.1117-1125.
57. Bharali, D., Klejbor, I., Stachowiak, E., Dutta, P., Roy, I., Kaur, N., Bergey, E., Prasad, P. and Stachowiak, M. (2005). Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), pp.11539-11544.
58. Song, Y., Du, D., Li, L., Xu, J., Dutta, P. and Lin, Y. (2017). In Vitro Study of Receptor-Mediated Silica Nanoparticles Delivery across Blood–Brain Barrier. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(24), pp.20410-20416.

10. MATERIAL SUPLEMENTARIO.

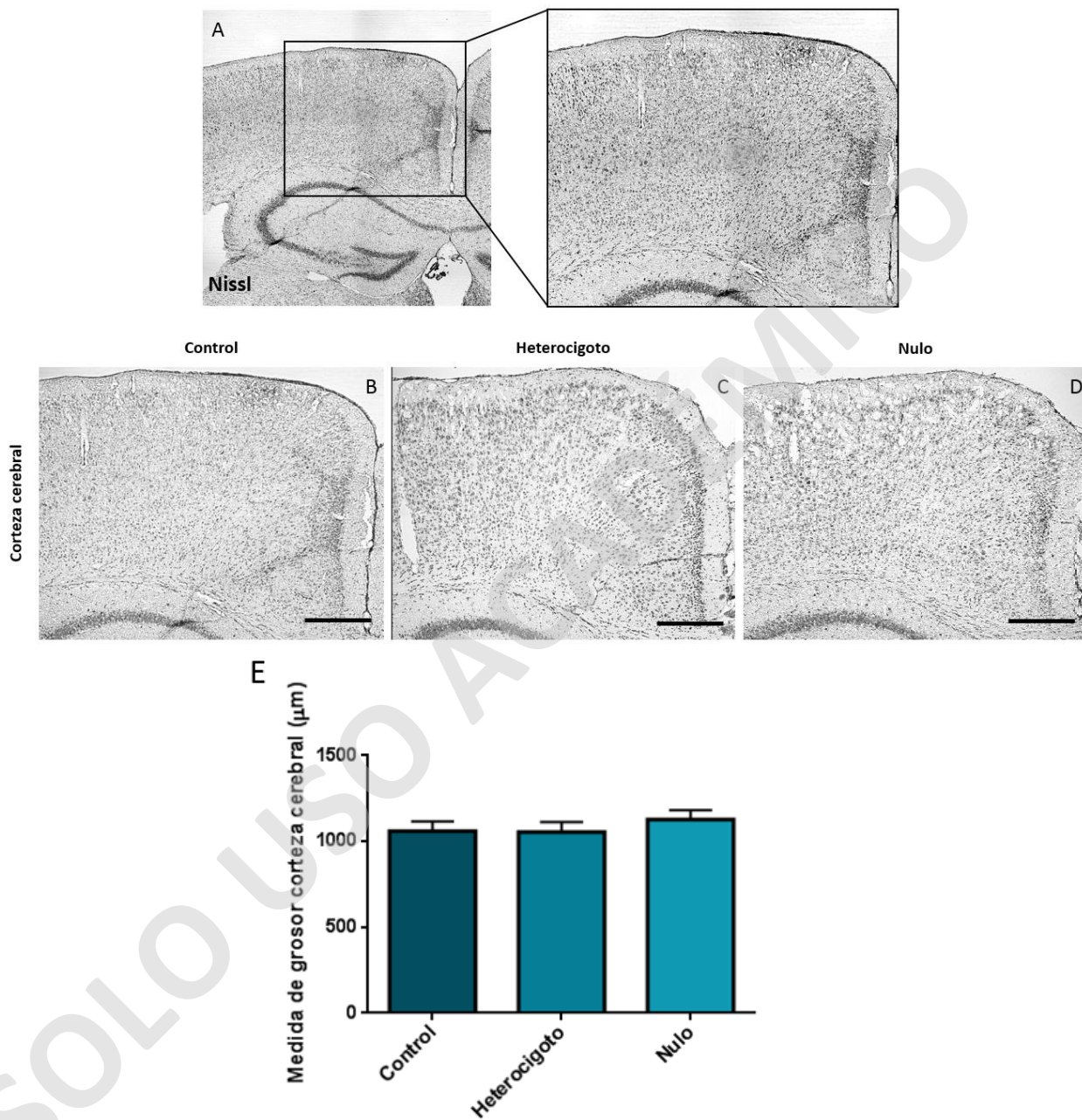


Figura suplementaria 1. No se presentan cambios morfológicos en la estructura de la corteza cerebral de ratones heterocigotos y nulos para PTPRD. (A) Imagen que representa la zona de la corteza cerebral a medir. (B-D) Imágenes de cortes coronales de 18 μm que representan la estructura de la corteza cerebral izquierda para cada genotipo. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de campo claro. Aumento 10X. Escala 100 μm . (E) Medición del grosor de la corteza cerebral. Se utilizaron 3 cortes coronales por cada animal control (n=3), heterocigoto (n=3) y nulo (n=3) con edad de 3 meses, ($P > 0,05$; ns). Cada barra representa el promedio de medidas de grosor por genotipo \pm el error estándar de la media.

Para la medición del grosor de la corteza cerebral, se fotografió una imagen completa del corte coronal utilizando el software Las X. Esta imagen fue procesada en el programa Photoshop CS6 junto con una imagen del corte coronal del atlas de cerebro de ratón. Al contraponer la imagen del atlas y la del tejido a evaluar, se trazó una línea sobre la sección ubicada entre la corteza motora secundaria y corteza disgranular retrosplenial, desde el comienzo del cuerpo calloso (ver Figura S2). Luego utilizando la herramienta de regla del programa Photoshop, se realizó la medición de la línea trazada y se obtuvo la altura de la corteza correspondiente al tejido en unidades de píxel que luego fueron transformadas a micrones. De esta forma fue posible estandarizar el lugar de medición en todos los cortes de cerebro.

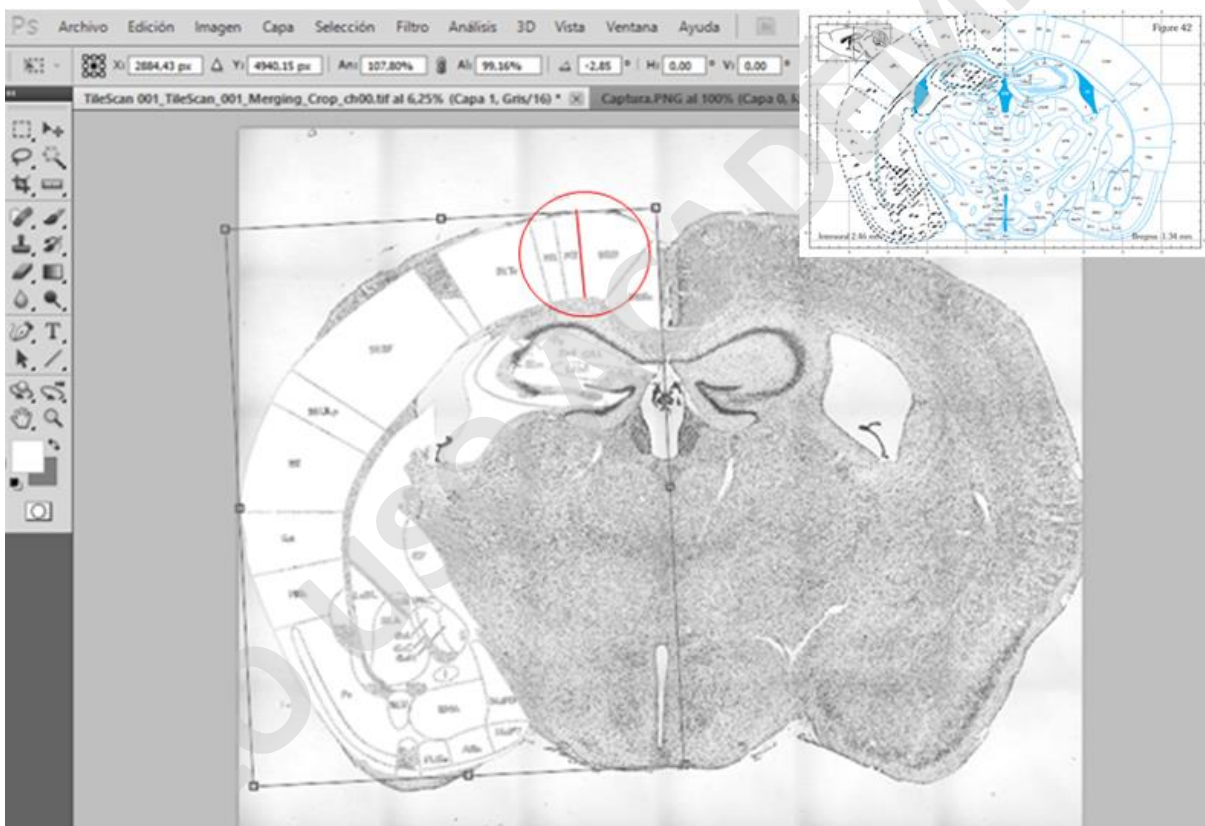


Figura suplementaria 2. Forma de medición del grosor en corteza cerebral. La presente figura demuestra el trazado de la línea utilizada de para la medición del grosor de la corteza utilizando como plantilla una figura referencia del Atlas de cerebro de ratón sobre las fotos obtenidas de los cortes coronales de 18 μm .