



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD CIENCIAS

“POTENCIAL DIFERENCIATIVO DE CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS DEFICIENTES EN
LPP3.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
**R O B E R T O S Á N C H E Z
S Á N C H E Z.**



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

DIRECTOR DE TESIS :
DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado.

1. Datos del alumno.

Apellido paterno. Sánchez
Apellido materno. Sánchez
Nombre. Roberto
Teléfono. 58-40-19-39.
Universidad Nacional Autónoma de México.

2. Datos del Tutor.

Grado. Doctora.
Nombre. Diana María
Apellido paterno. Escalante
Apellido materno. Alcalde

3. Datos del sinodal 1.

Grado. Doctor.
Nombre. Julio Eduardo Roque
Apellido paterno. Morán
Apellido materno. Andrade

4. Datos del sinodal 2.

Grado. Doctor.
Nombre. Luis Felipe
Apellido paterno. Jiménez
Apellido materno. García

5. Datos del sinodal 3.

Grado. Doctora.
Nombre. Hilda María
Apellido paterno. Lomelí
Apellido materno. Buyoli

6. Datos del sinodal 4.

Grado. Maestra en Ciencias.
Nombre. María Guadalupe
Apellido paterno. Ordaz
Apellido materno. Téllez

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a mis padres por el apoyo incondicional que siempre me dieron, por que más que con palabras me inculcaron la disciplina y la responsabilidad con el ejemplo, por que sin su ayuda no hubiera llegado hasta aquí.

Gracias a mis hermanos por que fueron un modelo a seguir, por apoyarme a lo largo de todos mis estudios y por ser la mejor familia que pude haber tenido.

Gracias a todos mis amigos que han estado a lo largo de mi vida acompañándome, a Luis Ángel, Jaquelin, Jazmín, Gloria, Yanet, Yazmín, Daniel, Martín, Juan Carlos. A todos mis amigos de la facultad con los que compartí la maravillosa experiencia de estudiar Biología, entre ellos a Cristian, Viridiana, Nax, Leslie, Paty, Hilda, Miguelon, Inan, Jesy, Jorge, Isac, Raul, Lis, Ale, Andrea, Fabiola, Erica, Karina M., Nidia, Sinúe, Alonso, Liliana, Miguel, Blas, Karina O. y a tantos que llenaría varias paginas para poder agradecer a mis amigos de Ciencias.

Gracias a mis amigos del laboratorio los cuales son como mi segunda familia. A Diana en especial por enseñarme el trabajo que tanto me gusta, de igual manera a Francisco por su paciencia y su tiempo invertido en mi, a Andrea, Giselle, Alex, y Mundo, por que siempre están ahí para escucharme, ayudarme y pasar buenos momentos juntos y hacer del trabajo un ambiente agradable.

Gracias a Nancy por apoyarme para que pudiera realizar este trabajo y mostrarme tantas cosas que ahora forman parte de mi.

Gracias a Viri por estar en este momento conmigo, por su comprensión y cariño.

Gracias a toda esa gente que me ha ayudado para que logrará esta satisfacción tan grande y a toda la gente que me dijo que no podría hacerlo, por que eso me motivaba cada vez más a seguir luchando y demostrar que se puede llegar hasta donde uno deje de luchar por conseguir lo que se propone.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
TÍTULO.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (LPP3).....	8
1.2 El desarrollo del sistema vascular.....	13
1.3 La esfingosina-1-fosfato (S1P).....	16
1.4 El ácido lisofosfatídico (LPA).....	19
1.5 Las células Madre.....	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	24
6. MATERIAL Y METODOS.....	25
6.1 Medios, reactivos y soluciones para cultivo celular.....	25
6.2 Obtención de fibroblastos primarios embrionarios de ratón.....	28
6.3 Prueba de micoplasma (kit de VenorGeM cat. # MP0025).....	29
6.4 Mantenimiento de ES indiferenciadas.....	30
6.5 Diferenciación de células angioblásticas, endoteliales y murales.....	31
6.6 Formación de estructuras tipo capilar en geles tridimensionales de colágena tipo I de cola de rata.....	33
6.7 Inmunocitoquímicas.....	34
6.7.1 Soluciones y reactivos.....	34
6.7.2 Procedimiento para inmunocitoquímicas vs PECAM (CD31) en monocapa.....	36
6.7.3 Procedimiento para inmunocitoquímicas vs SMA y Fik1 en monocapa (Kit de VECTOR cat. PK-7200).....	37
6.7.4 Procedimiento para inmunocitoquímicas de EBs vs PECAM y SMA.....	38
6.7.5 Conteo de células.....	39
6.8 Curvas de crecimiento.....	39
6.9 Conteo de células al hemocitómetro.....	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1 Diferenciación de células angioblásticas (Fik1 positivas).....	41
7.2 Diferenciación de células endoteliales (PECAM positivas).....	47
7.3 Diferenciación de células murales (SMA positivas).....	53

7.4 Curvas de crecimiento.....	59
7.5 Formación de capilares en geles de colágens I.....	62
8. DISCUSIÓN.....	69
9. CONCLUSIONES.....	73
10. PERSPECTIVAS.....	74
11. BIBLIOGRAFÍA.....	76

“POTENCIAL DIFERENCIATIVO DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DEFICIENTES EN LPP3”

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (LPP3).

Las fosfatasas de lípidos fosfatados (LPPs de sus siglas en inglés Lipid Phosphate Phosphatase), son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de regular el balance entre las formas fosforiladas y no fosforiladas de lípidos bioactivos, mediante desfosforilación de lípidos como lo son: ácido fosfatídico (AP), ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida-1-fosfato (C1P) y esfingosina-1-fosfato (S1P) (Kai, *et al.*1997; Roberts, *et al.* 1998) (Fig. 1 y 2). Estos lípidos pueden regular procesos celulares como: la migración celular, la proliferación, la diferenciación celular, la apoptosis, adhesión célula-célula y célula matriz extracelular, la quimiotaxis y la secreción celular (Moolenaar, 1995; Moolenaar, 1999; Panetti, *et al.* 2001). En los mamíferos se han encontrado dos clases de LPPs: las LPP de tipo 1 se requieren para la síntesis de glicerolípidos, se caracterizan por ser citoplásmicas, dependientes de magnesio (Mg^{2+}) y sensible a la inhibición por N-etilmaleimida. Las LPPs de tipo 2 se encuentran unidas a membranas celulares, son independientes de magnesio (Mg^{2+}), insensibles a la inhibición por N-etilmaleimida y se relacionan con la transducción de señales a través de la fosfolipasa D. Las LPPs tipo 2 son glicoproteínas con seis dominios transmembranales, en las cuales su extremo amino (NH_3), y carboxilo ($COOH$) se encuentran direccionados hacia el citoplasma (Sciorra, *et al.* 2002; Waggoner, *et al.* 1999; Sigal, *et al.* 2005) (Fig. 3). En mamíferos se han identificados tres genes que codifican para las LPPs de tipo 2 (*LPP1*, *LPP2* Y *LPP3*) (Sciorra, *et al.* 2002). *LPP3* y *LPP2* se localizan tanto en la membrana plasmática como en las membranas de los organelos intracelulares como retículo endoplásmico y aparato de Golgi, dependiendo del tipo celular. Además su transcripción es estimulada por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF),

Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), colágena tipo I y durante la diferenciación intestinal (Kai, *et al.* 1997; Sciorra, *et al.* 1999; [Wary, et al.](#) 2005).

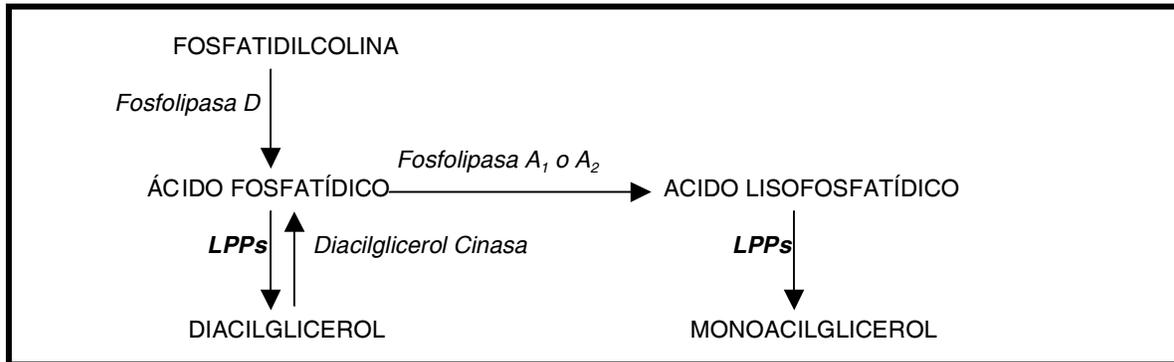


Fig. 1 Metabolismo del ácido fosfatídico y el ácido lisofosfatídico por las LPPs (Modificado de Waggoner *et al.* 1999).

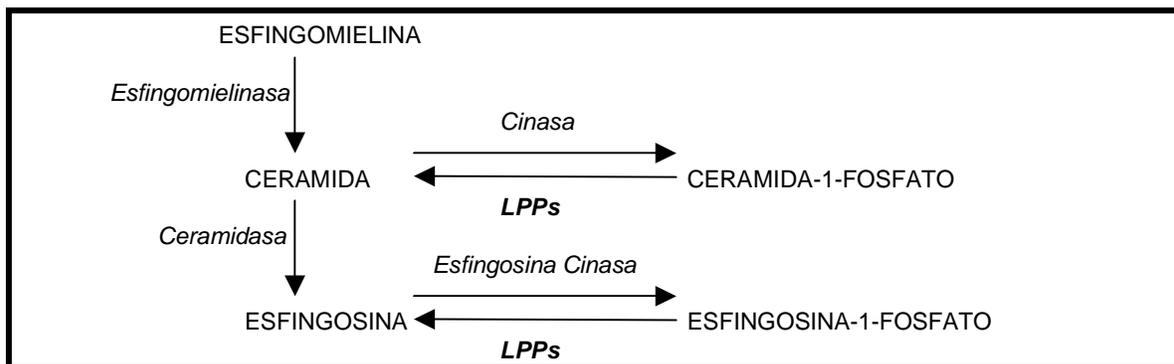


Fig. 2 Metabolismo de ceramida-1-fosfato y esfingosina-1-fosfato por las LPPs (Modificado de Waggoner *et al.* 1999).

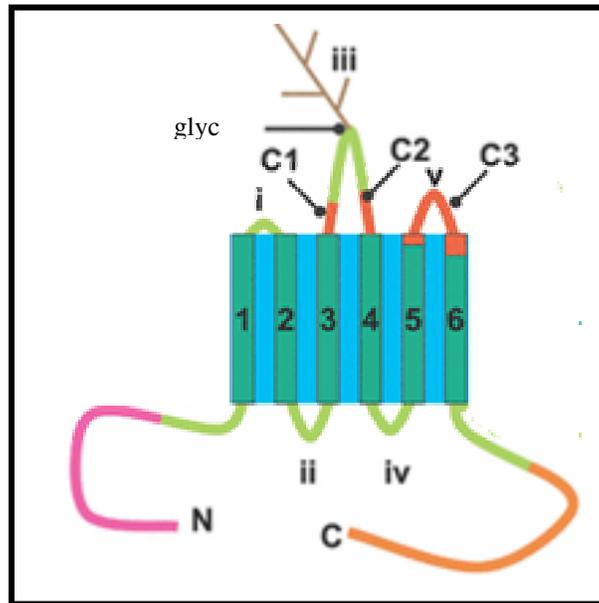


Fig. 3 Topología de las LPPs, donde C1, C2 y C3, son dominios del sitio catalítico, las regiones transmembranales se encuentran numeradas del 1 al 6, N y C representan los extremos amino y carboxilo intracelulares respectivamente, finalmente se muestran los loops como i, ii, iii, iv y v. En el tercer loop se muestra en café un sitio de glicosilación (glyc) (modificado de Sigal *et al.* 2005).

Gran parte de lo que se conoce sobre el papel funcional de LPP3 es gracias al trabajo de la Dra. Escalante-Alcalde quien generó un ratón mutante en esta enzima (Escalante-Alcalde, *et al.* 2003). La mutación del gen *LPP3* en el ratón es letal entre los 8 y 10.5 días de gestación, y su fenotipo muestra principalmente defectos en el desarrollo de la vasculatura extraembrionaria (Fig. 4) del saco vitelino y el alantoides, este último no se extiende hasta unirse al corion para formar la placenta. El plexo capilar primario que se forma en el saco vitelino de estos ratones mutantes es deficiente en la organización de las células endoteliales sin lograr madurar de una forma adecuada y no forma vasos grandes como los del ratón silvestre.

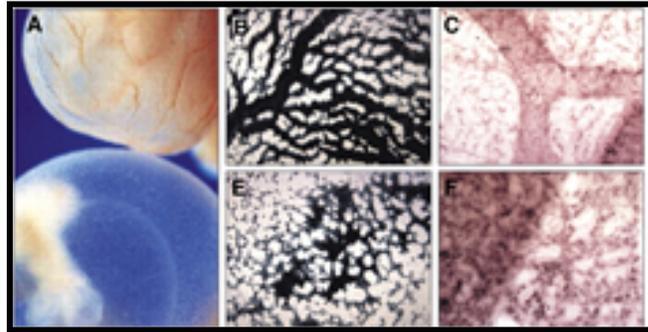


Figura 4. A) Se muestra en la parte de arriba un embrión de ratón de 10.5 días con el saco vitelino muy bien vascularizado, abajo se muestra un embrión mutante de LPP3, el cual no presenta los grandes vasos sanguíneos en su saco vitelino. B-C) Embriones silvestres y E-F) embriones mutantes. B) y E) detección de peroxidasa endógena en sacos vitelinos. En B estructura vascular bien organizada de un embrión silvestre, en E la vascularización de un embrión sin LPP3 es aberrante. C y F) Hibridación *in situ* contra *Flk1* en sacos vitelinos, marcador de células precursoras endoteliales y murales. En C vasos grandes mientras que en F no están presentes (Tomado de Escalante-Alcalde, *et al.* 2003).

Se sabe también que fibroblastos obtenidos de embriones de ratón deficientes en la enzima presentan menor concentración de diacilglicerol, un incremento en ácido fosfatídico y un gran aumento en la concentración de ácido lisofosfatídico extracelular. Estos resultados muestran que LPP3 al estar mutada en su sitio catalítico no desfosforila sus substratos y por consiguiente no regula el adecuado balance de estos lípidos. Este desbalance altera funciones celulares como el ciclo celular (Dector-Vega y Escalante-Alcalde datos no publicados). Es importante señalar que el ratón mutante para LPP2 es viable (Zhang, *et al.* 2000), por lo que la función entre estas enzimas no es redundante y la presencia tanto de LPP1 como de LPP2 no son suficientes para evitar el fenotipo causado por la deficiencia de LPP3. Otro de los fenotipos del ratón mutante es el acortamiento del eje antero-posterior y duplicación de estructuras axiales. Este último fenotipo asemeja mucho el fenotipo caracterizado por la inactivación de axina, proteína que funciona como un regulador negativo de la vía de señalización de factores Wnt (Popperl, *et al.* 1997). Experimentos donde se utilizaron células con expresión ectópica de LPP3 mostraron una disminución de la actividad transcripcional modulada por la vía de señalización de Wnt/ β -

catenina/TCF. Estas células además presentaron una disminución de β -catenina activa. El mecanismo por el cual LPP3 inhibe la señalización de los Wnt podría ser a través de la defosforilación de LPA ya que se ha reportado que este lípido puede inactivar a GSK3 β evitando así la degradación de β -catenina (Malbon, 2005). Sin embargo esta regulación negativa por parte de LPP3 se ha visto que también puede ser independiente de su actividad de fosfatasa. Además de la actividad de fosfatasa de la enzima, se sabe que LPP3 humana (hLPP3) muestra un dominio RGD (arginina-glicina-ác. aspártico) que es reconocido por integrinas $\alpha_5\beta_3$ (Humtsoe, *et al.* 2003). LPP3 de ratón posee la secuencia RGE (arginina-glicina-ác. glutámico) y se ha reportado que también este sitio causa agregación y unión a integrinas aunque a tiempos mucho más largos que la secuencia RGD (Humtsoe, *et al.* 2005).

Se conoce que dos genes homólogos de LPPs en *Drosophila* (*wunen* y *wunen2*) regulan la migración de células germinales durante el desarrollo (Startz-Gaiano, 2001; Zhang, 1997) actuando como factores repelentes que guían a estas células. Esto sugiere la habilidad de estas enzimas para degradar un lípido que sirve de señal de sobrevivencia y repulsión, ya que se sabe que la actividad enzimática es necesaria para repeler a las células germinales. Además, cuando LPP3 es expresada en células somáticas de embriones de *Drosophila*, también cumple la función de repeler a las células germinales, mientras que LPP1 no logra cumplir esta función en este mismo ensayo (Starz-Gaiano, *et al.* 2001; Burnett, *et al.* 2003, Renault, *et al.* 2004).

El ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) son dos de los substratos bioactivos de LPP3, los cuales al ser desfosforilados generan monoacilglicerol y esfingosina respectivamente. El estudio de estos lípidos bioactivos es muy importante, ya que ellos desempeñan papeles muy importantes en el establecimiento del sistema vascular.

Tanto LPA como S1P, son moléculas anfipáticas, las cuales sirven de ligandos para una familia de receptores de superficie celular de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G llamados EDGs (del inglés Endotelial Differentiation Gene). Vía G_i , que es sensible a la proteína pertusis,

activa Ras a través de las subunidades $\beta\gamma$ para estimular la fosforilación de Erk y la activación de PI3K. Por medio de la proteína G_q se activa directamente a la fosfolipasa C, con la subsecuente liberación de Ca^{2+} intracelular. Tanto LPA como S1P activan a Rho por $G_{12/13}$ (Moolenaar, 1999; Panetti, *et al.* 2001). Existen cinco receptores EDGs para S1P en mamíferos y tres receptores para LPA (Tigyi, *et al.* 2000, Chun, *et al.* 2002). Las moléculas blanco río abajo de estos lípidos incluyen: la adenilato ciclasa, Ras, proteína cinasa de activación mitogénica (MAPK), fosfolipasa C (PLC), tirosin cinasa c-Src, las GTPasas pequeñas Rac y Rho, fosfolipasa D, p125FAK, matriptasa y moléculas que regulan la homeostasis del Ca^{2+} (Meyer, *et al.* 1998; Birwood, 2001; Meacci, *et al.* 2002, Spiegel, *et al.* 2003).

1.2 El desarrollo del sistema vascular.

El sistema vascular es el primer órgano que se desarrolla en el embrión. Este sistema cumple la función de proveer nutrientes, O_2 y señales moleculares a las células para así lograr el desarrollo de los tejidos embrionarios. Por esta razón la vasculogénesis y la angiogénesis son dos procesos muy importantes que ocurren en etapas muy tempranas del desarrollo que requieren de diversos mecanismos celulares como lo son: proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular, interacciones celulares y migración, entre otros. Para llevar a cabo lo anterior se necesita de una adecuada señalización de moléculas como: componentes de matriz extracelular, factores de crecimiento, receptores membranales, segundos mensajeros, factores de transcripción, etc. **La vasculogénesis** es el proceso mediante el cual un grupo de células del mesoderma llamadas hemangioblastos, forman un número inicial de canales vasculares llamados plexo capilar primario. Este se caracteriza por ser una red de células en forma de panal de un diámetro uniforme. Estas estructuras pueden observarse a los 8 días de gestación en el ratón. Los hemangioblastos son células progenitoras del linaje hematopoyético y de células angioblásticas. Estas últimas expresan el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y son capaces de originar tanto células

endoteliales como murales, las cuales a su vez forman los vasos sanguíneos (Hiroshi, *et al.* 1997), en el proceso de vasculogénesis se forman los vasos sanguíneos únicamente de células endoteliales, mientras que en la angiogénesis estos vasos son recubiertos por las células murales (Fig. 5). Para que se forme el plexo capilar primario, el VEGF actúa sobre Flk1 en las células hemangioblásticas y células angioblásticas ya que este factor es el principal responsable del inicio de la formación de los vasos sanguíneos, desencadenando una cascada de eventos moleculares y celulares que finaliza en una red vascular madura. Además del VEGF intervienen otro tipo de moléculas como angiopoietina 1 y 2 y sus receptores Tie 1 y 2, los cuales regulan el alargamiento de los endotelios en presencia del VEGF, suprimen la apoptosis en células endoteliales, coordinan la polaridad de la vasculatura y estabilizan los vasos por interacciones intercelulares y con la matriz extracelular (Jain, 2003). Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) rompen la matriz extracelular, exponiendo sitios que permitan el crecimiento de los vasos, como en el caso de la colágena tipo IV, que al ser procesada por estas enzimas se exponen sitios de unión a integrina $\alpha_5\beta_3$, promoviendo el desarrollo vascular y la liberación de factores de crecimiento secuestrados en la matriz extracelular. De igual manera las integrinas forman parte importante al reconocer la matriz extracelular por donde deben de migrar las células endoteliales (Rundhaug, 2005). Otras de las moléculas que son importantes, por consecuencia, son las moléculas de matriz extracelular que son secretadas por las mismas células endoteliales y murales, y sirven de sustrato a las ya mencionadas metaloproteasas. Todas estas moléculas juegan un papel fundamental en la diferenciación de las células vasculares (Yamashita, *et al.* 2000).

Por su parte **la angiogénesis** ocurre por medio del remodelamiento del plexo capilar primario, una vez que éste ha sido formado, el VEGF y otros factores de crecimiento, actúan sobre los capilares formados causando la pérdida de las uniones celulares y la degradación de la matriz extracelular en ciertos puntos. Así las células endoteliales proliferan y crecen en estos sitios y eventualmente forman nuevos vasos, así es como las venas y arterias se

forman. Dos mecanismos distintos pueden ocurrir en la formación de nuevos vasos sanguíneos: 1. Formación por crecimiento y unión. 2. Formación por división. En el mecanismo de crecimiento y unión, las células endoteliales cambian su forma, haciendo prolongaciones que invaden los espacios cercanos. Así, cada prolongación llegará a interactuar con prolongaciones de otras células endoteliales y formarán un nuevo canal vascular más grande. En cambio, durante el mecanismo de formación de nuevos vasos sanguíneos por división, las células endoteliales se invaginan hacia el lumen de los vasos hasta que el vaso se divide en dos canales vasculares por separado (Rossant, *et al.* 2002). Esta red vascular debe madurar tanto en la estabilización de la pared de los vasos (lo que involucra el recubrimiento de las células murales y el desarrollo de una matriz extracelular apropiada), como en el establecimiento de uniones célula-célula, célula-matriz, polaridad celular y expresión de receptores (Jain, 2003).

Otras moléculas de señalización como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y su receptor beta (PDGFR- β), angiopoietina 1 (Ang1), su receptor Tie2 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) son moléculas importantes que participan en la maduración vascular. El factor de crecimiento transformante-beta es uno de los factores más importantes que señalizan la formación de la matriz extracelular promoviendo el fortalecimiento de los vasos sanguíneos (Gilbert, S. 1997, Hellstrom, M. *et al.* 2001). Los ratones mutantes en la vía de TGF- β /endogлина/SMAD5 mueren entre el estadio 11.5 al 12.5 por defectos en la angiogénesis, mostrando completa ausencia de células murales alrededor de los vasos sanguíneos (Li, *et al.* 1999; Yang, *et al.* 1999) y se ha reportado que TGF- β es un potente inhibidor del crecimiento de células de músculo liso vasculares aisladas de aorta de ratón. Esta inhibición se debe a un arresto en la fase G₀/G₁ del ciclo celular y este efecto es atenuado por el bloqueo del receptor tipo I de TGF- β ó al bloquear la señalización de p38 (Seay, *et al.* 2005). Por su parte PDGF es un factor secretado por las células endoteliales en respuesta a VEGF y participa en la diferenciación de células murales y en su migración alrededor de los endotelios los cuales están

regulados por el receptor β de PDGF, por lo que esta vía es muy importante para la maduración de la vasculatura. Además de las moléculas que se mencionaron anteriormente, para que ocurra la formación de vasos sanguíneos se requiere de la participación de otras moléculas, algunas de las cuales son lípidos bioactivos como el ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina-1-fosfato (S1P). La precisa señalización de estos lípidos, en un tiempo determinado va a permitir que los procesos de vasculogénesis y de angiogénesis puedan llevarse a cabo adecuadamente.

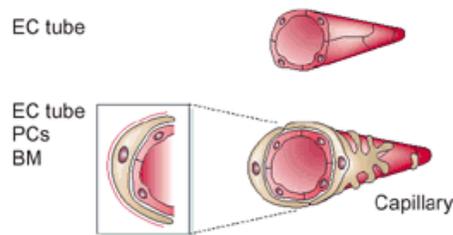


Figura 5. En la parte superior se muestra un capilar formado únicamente por células endoteliales, tal como se presentan en el proceso de vasculogénesis, mientras que en la parte de debajo se muestra un capilar recubierto por células murales y lamina basal, tal como ocurre en el proceso de angiogénesis.

1.3 La esfingosina-1-fosfato (S1P).

Las plaquetas son la principal fuente de S1P en plasma y suero, la concentración de S1P en el plasma sanguíneo es de aproximadamente 200nM y de 500nM en el suero (Yatomi, *et al.* 2001). Los receptores EDG de S1P, son EDG 1, 3, 5, 6 y 8, ahora llamados S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅. La señalización de S1P a través de sus receptores se ha visto que aumenta la formación de lamelipodios, la activación y translocación de integrinas, las extensiones celulares, la migración, proliferación, formación de redes capilares, interacciones celulares homotípicas y heterotípicas e invasión de matrices de colágena y fibrina (Lee, *et al.* 1999; English, *et al.* 2000; Kimura, 2000; Liu, *et al.* 2000; Okamoto, *et al.* 2000b, Paik, *et al.* 2001; Tamama, *et al.* 2002; Bayless, *et al.* 2003).

La localización más clara de los receptores para S1P se ha visto en las células endoteliales, las cuales expresan S1P₁, S1P₂ y S1P₃ (Hla, *et al.* 1990; Allende, *et al.* 2003). S1P₁ y S1P₃ se expresan en células endoteliales como las de vena umbilical humana (HUVEC) en las cuales la S1P inhibe la apoptosis mientras que esfingosina la promueve (Xia, *et al.* 1999; Hisano, *et al.* 1999). Un mecanismo de acción mediante el cual S1P induce la sobrevivencia de las células endoteliales es por la producción de óxido nítrico al estimular un incremento en la actividad de la sintetasa de óxido nítrico (eNOS) (Igarashi, *et al.* 2000). S1P₂ se expresa muy poco en células endoteliales, mientras que S1P₁ es el receptor más abundantemente expresado en la superficie de las células endoteliales. La mutación nula de *S1P₁* en el ratón, es letal de 12.5 a 14.5 días de gestación debido a hemorragias (Liu, *et al.* 2000). Aunque el árbol vascular parece estar intacto, los vasos carecen de células murales, lo que sugiere que estas células requieren de la señalización de este receptor para migrar apropiadamente y recubrir a las células endoteliales. Aún así el receptor S1P₁ no es esencial para la diferenciación, proliferación, migración y formación de tubos endoteliales.

S1P induce la migración endotelial de vasos grandes y pequeños. Esta migración se debe a quimiotaxis más que a quimioquinesis, señalando que las células no endoteliales por lo general no migran al estimularlas con S1P (Panetti, *et al.* 2000; Panetti, *et al.* 2001; Okamoto, *et al.* 2000a). Algunos de los mecanismos por los que S1P media cambios en el citoesqueleto y en migración es la señalización a través de su receptor S1P₁, que provoca el ensamble de la actina cortical por medio de la cinasa de Rho, mientras que S1P₃ dirige la formación de fibras de estrés por medio de la misma cinasa. Además, estas señales mediadas por ambos receptores coordinan las uniones endoteliales célula-célula por VE-caderina, y promueven el reclutamiento de α , β , y γ cateninas en estas uniones estabilizándolas. De esta manera se ha probado que S1P señala la formación de uniones adherentes (Lee, *et al.* 1999). Si se inhibe la vía de Rho por medio de la toxina C3, S1P deja de señalar el ensamble de uniones endoteliales, además cambios en el citoesqueleto ocasionados por S1P,

favorecen el refuerzo de la pared endotelial previniendo la permeabilidad vascular. En otros tipos celulares, S1P₂ bloquea la activación de Rac e inhibe la migración, por lo que podría funcionar como un factor repelente (Tanimoto, *et al.* 2002). En células de músculo liso se ha visto que este receptor se expresa abundantemente y media la proliferación pero no la migración al agregar S1P (Tamama, *et al.* 2001).

Por otro lado la señalización de S1P desencadena la fosforilación en tirosinas del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (Tanimoto, *et al.* 2002) y la señalización de este induce la expresión de S1P₁ en células endoteliales (Igarashi, *et al.* 2003), por medio del cual presumiblemente S1P induce la proliferación de células endoteliales (Kimura, *et al.* 2000; Wang, *et al.* 1999).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas es otro de los principales factores que intervienen en la diferenciación de células murales y se ha observado una interacción entre los receptores de PDGF y S1P₁, los cuales han sido coinmunoprecipitados en vesículas que contienen a Erk fosforilada en células de músculo liso (Waters, 2003). Ambas moléculas incrementan la síntesis de DNA a través de receptores acoplados a la proteína G_i, sin embargo mientras que los dos estimulan la proliferación celular, la migración que induce PDGF en células murales es inhibida por S1P (Bornfeldt, *et al.* 1995; Kluk, *et al.* 2001; Tamama *et al.* 2001). Por otra parte, la activación de Akt por S1P₃ en fibroblastos embrionarios de ratón y en líneas celulares de cáncer de ovario, es bloqueada por la inhibición de receptores de PDGF (Hobson, *et al.* 2001; Badhuin, *et al.* 2003), en cambio la fosforilación de proteínas de la familia de las MAPK en respuesta a PDGF es inhibida al bloquear S1P₁.

También se sabe que la expresión de PDGF-A y PDGF-B se sobre estimula en células vasculares de músculo liso en respuesta a S1P, a través de su receptor 1 y promueve la activación de la vía de Ras/MAPK (Usui, *et al.* 2004). Los datos anteriores nos indican que hay una estrecha relación entre S1P y los factores de crecimiento y que están directamente relacionados con los procesos vasculares, como vasculogénesis y angiogénesis.

Cabe mencionar que S1P reduce la permeabilidad a través de sus receptores 1 y 3 vía G_i , activando Rac y reforzando el citoesqueleto cortical (García, *et al.* 2001). Dentro de los efectos más reconocidos de S1P está su gran habilidad para inducir la proliferación y la sobrevivencia celular en muchos tipos celulares, lo cual depende en gran manera de las enzimas que lo regulan como es la esfingosina cinasa y las LPPs de tipo 2, haciendo de este fosfolípido un interesante factor de regulación de procesos vasculares.

1.4 El Ácido Lisofosfatídico (LPA).

El LPA es un glicerofosfolípido, que puede formarse por diferentes vías, sin embargo su desfosforilación a Monoacilglicerol (MAG) se lleva a cabo por las LPPs de tipo 2 (Fig. 1). Al igual que S1P, su principal fuente son las plaquetas. La concentración de este lípido en el suero es de 1-10 μ M con reportes variables en plasma desde 0-2nM (Pages, *et al.* 2001; Tigyi, 2001). Las primeras evidencias de esta molécula como lípido bioactivo fue su propiedad para inducir agregación de plaquetas y la contracción de células de músculo liso, además de producir cambios en la presión sanguínea (Tokomura, *et al.* 1978; Gerrard, *et al.* 1979; Schumacher, *et al.* 1979). Más recientemente se descubrió que además de las funciones mencionadas, LPA también estimula la proliferación, migración celular, síntesis de DNA y sobrevivencia en una gran variedad de tipos celulares (Moolenaar, H. and Van Corven E. 1990; van Corven E., *et al.* 1992; Jalink, *et al.* 1993; van Leguen F., 2003). Se han descrito cuatro receptores para LPA, los EDG 2, 4 y 7 ahora llamados LPA₁, LPA₂ y LPA₃ respectivamente, y el recientemente descrito GRP 23 que tiene muy poca homología con los EDGs (Fukushima, *et al.* 2001).

LPA es capaz de regular el incremento en la permeabilidad vascular de células endoteliales de cerebro, la formación de fibras de estrés, el incremento en la actividad de Rho, la cinasa de Rho y la formación de focos de adhesión, sin causar cambios aparentes en los puntos de contacto célula-célula (Schule, *et al.* 1997). LPA también disminuye la permeabilidad de células endoteliales de

aorta de bovino, lo que puede atribuirse a la expresión de diferentes receptores para LPA y la regulación de estos por la misma célula o por células vecinas entre otros factores ambientales (Alexander, *et al.* 1998.). Un ejemplo es LPA₁ el cual se expresa abundantemente en células endoteliales humanas y de bovino, mientras que otras células endoteliales como las de aorta humana expresan poco el receptor LPA₂ (Lee, *et al.* 2000; Rizza, *et al.* 1999; Panetti, *et al.* 2000).

LPA también induce la expresión del VEGF e induce la migración endotelial y de células de músculo liso, y a diferencia de S1P, LPA actúa tanto por quimiotaxis como por quimiocinesis (Lee, *et al.* 2000; Panetti, *et al.* 2000). Al igual que S1P, LPA estimula la reorganización de actina y la fosforilación de paxilina en las células endoteliales, y en muchos otros tipos celulares estimula la fosforilación de tirosinas de FAK, paxilina y p130Cas (Panetti, *et al.* 2000; Seufferlein, *et al.* 1994; Chrzanowska-Wodnicka, *et al.* 1994; Yamamura, *et al.* 2000; Wang, *et al.* 1997), promueve la liberación de Ca²⁺ y la proliferación (English, *et al.* 1999; Sun, *et al.* 2003; Hayashi, *et al.* 2001; Boguslawski, *et al.* 2002). Además se ha visto que LPA se encuentra en abundancia en diferentes tipos de cáncer siendo una importante molécula en procesos de metástasis y neovascularización.

1.5 Las células Madre.

Las células madre se definen por presentar tres características importantes: son células capaces de proliferar extensivamente y dar origen a otras células madre idénticas a ellas con las mismas capacidades, es decir pueden renovarse ellas mismas, y logran mantenerse en un estado indiferenciado, además de poder diferenciarse a uno o varios linajes celulares especializados (Ralston, *et al.* 2005; Draper, *et al.* 2003). Las células troncales pluripotentes de la masa celular interna del blastocisto aparecen aproximadamente a los 3.5 días post coito, siendo estas las células troncales más utilizadas en la investigación. Éstas son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares somáticos encontrados en un organismo adulto (Smith, 2001).

Las células madre también pueden estar presentes en tejidos adultos como en el cerebro, las espermatogonias que sólo dan origen a un linaje celular (los espermatozoides) y las células madre hematopoiéticas que son multipotenciales y dan origen a muchos tipos celulares (eritrocitos y todas las células blancas sanguíneas). Las células madre son muy importantes para mantener una homeostasis en el organismo y para la regeneración de los tejidos (Shamblott, 2001).

En los mamíferos se han aislado tres tipos de células madre pluripotentes, estas son: las células de carcinoma embrionario (EC) que son células madre que se extraen de tumores de testículo; células madre embrionarias (ES) son células derivadas de la masa interna del blastocisto y las células germinales embrionarias (EG) que se generan a partir de las células germinales primordiales en embriones post implantación. El potencial de desarrollo las células madre pluripotentes se ha comprobado en tres ensayos independientes: la diferenciación *in vitro* en cajas petri; la diferenciación de teratomas o teratocarcinomas cuando son puestos en ratones histocompatibles o inmunosuprimidos y la diferenciación *in vivo* cuando se introducen en la cavidad del blastocelo de un embrión en la pre-implantación. De esta manera, se ha probado la gran habilidad de las células madre pluripotentes para dar origen a un elevado número de tipos celulares, por lo cual se han utilizado con propósitos de terapia celular e ingeniería de tejidos. (Blau, *et al.* 2001).

En presencia de factores que induzcan su diferenciación, el ambiente de las células madre pluripotentes ha sido manipulado por ensayo y error para generar distintos linajes celulares. Esto se logra mediante el crecimiento de células madre: sobre diferentes tipos de células alimentadoras, por la adición de factores de crecimiento, por el crecimiento en substratos de matriz extracelular, por la diferenciación de cuerpos embrionarios en diferentes medios (Fig 5.) (Donova *et al.* 2001).

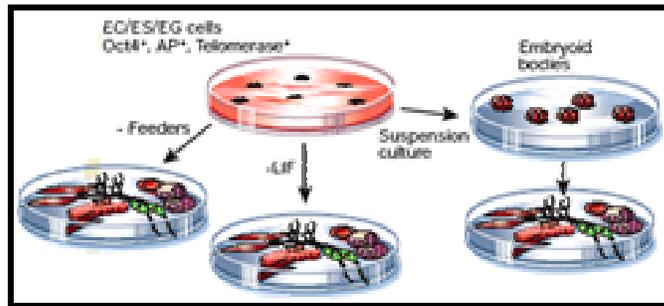


Fig. 6 Potencial de las células madre para originar diferentes tipos celulares al cultivarlas en ausencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF), sobre células alimentadoras o formando cuerpos embrionarios (tomado de Donovan *et al.* 2001).

Actualmente se ha visto que derivados de células madre pueden ser transplantados en modelos animales enfermos o heridos con buenos resultados de recuperación. Por ejemplo, los cardiomiocitos seleccionados de los cultivos de células madre de ratón, pueden tener una forma y función estable en injertos intracardíacos en ratón (Klug, *et al.* 1996). Las células madre derivadas de precursores gliales transplantadas en ratas con deficiencia de mielina, interactúan con las neuronas hospederas para producir mielina en el cerebro y la médula espinal (Brustle, 1999). Los cuerpos embrionarios de células madre de ratón tratados con ácido retinóico, cuando son transplantados en la medula espinal de las ratas nueve días después de haberles provocado una lesión, se diferencian en astrocitos, oligodendrocitos, neuronas y promueven la recuperación motora. (Mc Donald, 1999). De esta manera el uso y estudio de las células madre pluripotentes proporcionan una herramienta útil y grandes esperanzas para que en un futuro la terapia génica y la ingeniería de tejidos ayuden en el desarrollo de tejidos y órganos más complejos para la cura de enfermedades y el transplante de órganos. De igual manera es una herramienta útil para estudiar las funciones de genes que afectan tejidos o procesos tempranos del desarrollo, como es el caso de fenotipos letales embrionarios.

Por su parte existen protocolos que inducen la diferenciación de células troncales hacia células endoteliales y células de músculo, al poner las ES en colágena tipo IV y agregando VEGF y PEDGF respectivamente para cada tipo

celular, siendo esta la manera en que obtuvimos estos tipos celulares en este trabajo.

RESUMEN

La fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (LPP3), es una enzima que su mutación en el ratón afecta la formación de la red vascular siendo letal entre los 8 y 10.5 días de gestación, esta enzima se encarga de defosforilar lípidos bioactivos como lo son el ácido lisofosfatídico y la esfingosina-1-fosfato, los cuales son lípidos capaces de señalar funciones celulares como proliferación y migración, además se ha visto que su regulación afecta los procesos de vasculogénesis y de angiogénesis, por medio de los cuales se forman los vasos sanguíneos. En este trabajo se diferenciaron células madre deficientes y no deficientes en LPP3 hacia el linaje vascular (células endoteliales y murales, principales componentes de los vasos sanguíneos), con la finalidad de estandarizar un protocolo que nos permita analizar los efectos de la mutación en estos tipos celulares, ya que es muy escaso el material de trabajo que se obtiene de los embriones mutantes. Así, se encontró que la falta de la enzima produce deficiencias en el crecimiento de las células diferenciadas, así como una predisposición a diferenciarse a células de músculo liso, además de una baja diferenciación a células endoteliales con respecto a las células silvestres (wt), sin embargo estas células al igual que las silvestres son capaces de formar proyecciones en geles tridimensionales de colágena tipo I.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Ya que la mutación de la enzima LPP3 es letal entre los 8 y 10.5 días de gestación en ratón, y dada la limitación para obtener algunos tejidos mutantes en gran cantidad para su estudio, como lo es el saco vitelino y el alantoides, se plantea utilizar ensayos de diferenciación de células troncales embrionarias (ES) silvestres y mutantes en LPP3 hacia células murales y endoteliales *in vitro* para ayudar a establecer las bases celulares que afectan el desarrollo vascular debido a la deficiencia de LPP3.

3. JUSTIFICACIÓN.

Dado que nuestro interés es conocer el papel que desempeña la enzima LPP3 en el desarrollo embrionario del ratón y en específico conocer su función en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis, este trabajo es importante ya que nos permitirá establecer un sistema para evaluar algunos parámetros en células mutantes (comparandolas con las células silvestres) como: migración celular, proliferación, apoptosis, viabilidad celular, interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, diferenciación, secreción, entre otras características, de tal manera que nos permita revelar de que manera LPP3 participa en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis.

4. HIPÓTESIS.

Dado que los ratones mutantes en la enzima tienen células angioblásticas se espera que las células ES silvestres y deficientes en LPP3 puedan ser diferenciadas *in vitro* hacia células murales y endoteliales (detectadas mediante inmunocitoquímicas). Sin embargo puesto que el ratón mutante presenta desorganización del plexo capilar primario, se espera observar cambios en algunos parámetros biológicos (*i.e.* formación de estructuras tipo capilar) en las células mutantes.

5. OBJETIVOS.

- Estandarizar un sistema *in vitro* para el análisis de procesos celulares afectados por la mutación de LPP3 durante el desarrollo vascular, por medio de la diferenciación de células troncales embrionarias (ES) hacia células endoteliales y murales
- Analizar si la mutación afecta la diferenciación de linajes vasculares.
- Elaborar cultivos tridimensionales de colágena tipo I de células LPP3^{-/-} y WT, para observar la capacidad de estas células de formar estructuras tipo capilares que cuenten con células endoteliales y células murales que las recubran.

6. MATERIAL Y METODOS.

6.1 Medios, reactivos y soluciones para cultivo celular.

Medio de mantenimiento D15 para células ES.

- 425mL de DMEM 1X, Gibco (cat. 11960-044).
- 5mL de glutamina 100X, Gibco (cat. 35050-061).
- 500µL de beta-Mercaptoetanol 100mM.
- 2.5 mL de penicilina-estreptomicina 10000 unidades/mL, Gibco (cat. 15140-122).
- 75mL de suero fetal bovino Premium, Wisent Inc. Probado para ES (cat. 080150).
- 5mL de Piruvato 100X, Gibco (cat. 11360-070)
- 5mL de aminoácidos no esenciales 100X, Gibco (cat. 35050-061)

Medios de diferenciación.

- 450mL de alfa MEM 1X líquido, Gibco (cat. 41061-029)
- 500µL de beta-Mercaptoetanol 100mM.
- 50mL de suero fetal bovino, Gibco (cat. 12318-028)
- 5mL de penicilina-estreptomicina 10000 unidades/mL, Gibco (cat. 15140-122).

Medio D10 para fibroblastos.

- 450mL de DMEM 1X, Gibco (cat. 11960-044).
- 5mL de glutamina 100X, Gibco (cat. 35050-061).
- 500µL de beta-Mercaptoetanol 100mM.

- 5mL mL de penicilina-estreptomicina 10000 unidades/mL, Gibco (cat. 15140-122).
- 50mL de suero fetal bovino, Gibco (cat. 12318-028).
- 5mL de pirivato 100X, Gibco (cat. 11360-070).
- 5mL de aminoácidos no esenciales 100X, Gibco (cat. 35050-061).

Medio de congelación para fibroblastos (para 25mL).

- 11.25mL de DMEM 1X, Gibco (cat. 11960-044).
- 11.25mL de suero fetal bovino, Gibco (cat. 12318-028).
- 2.5mL de DMSO, Sigma (cat. D2650)

Medio de congelación para ES (para 50mL).

- 45mL de suero fetal bovino premium, Wisent Inc. (cat. 080150).
- 5mL de DMSO, Sigma (cat. D2650).

Mitomicina C.

- Disolver 2 mg de mitomicina C Roche (cat. 107 409) en 5 ml de PBS 1X Gibco (cat. 10010-023), agregar los 5 ml a 195 ml de D5 (DMEM-SBF5%), concentración final 10 µg/ml, esterilizar por filtración y hacer alícuotas de 10 ml y guardar a -20 C protegido de la luz.
- Para inactivar mitoticamente los fibroblastos, estos se crecieron en una caja de 150mm confluyente y se le agregó 10mL de la solución de mitomicina previamente preparada y se incubaron los fibroblastos por 3 horas a 37°C y 7% de CO₂, después de las cuales se hacen 2 lavados de 5mL de PBS 1X cada uno y se tripsinizaron con 1.5 mL de tripsina-EDTA 1X Sigma (cat. T-4049) por 2 minutos, la reacción se detiene con 10mL de D10 (DMEM-SFB 10%), las células se centrifugan a 1200rpm y se

resuspenden en 24mL de D10, para sembrar 6 cajas de 60mm previamente tratadas con gelatina al 0.1%.

- Para gelatinizar las cajas, se agregan 2mL de gelatina al 0.1% a la caja a manera que esta se cubra totalmente, después de 1 minuto se retira y se deja secar la caja en la campana de flujo vertical.

PBS 1X GIBCO (cat. 10010-023).

Tripsina-EDTA 0.25% (Sigma cat. T-4049).

Factores de crecimiento.

- VEGF₁₆₅ 10µg usar a 50ng/mL, Chemicon (cat. GF025).
- RHPDGF-BB 10µg usar a 10ng/mL, R&D systems (cat. 220-BB).

Alfa-MEM 2X.

- α-MEM en polvo, Gibco (cat. 11900-024), se utilizó un sobre para preparar 500mL para dejar a concentración de 2X. A 390mL de medio se le adicionó:
 - 1mL de beta-Mercaptoetanol 100mM.
 - 100mL de suero fetal bovino, Gibco (cat. 12318-028)
 - 10mL de penicilina-estreptomicina 10000 unidades/mL, Gibco (cat. 15140-122).
- Finalmente se esterilizó por filtración.

Colágenas.

- Colágena tipo IV de placenta humana para recubrir placas de 6 pozos, Sigma-Aldrich (cat. C5533).

- Colágena tipo I de cola de rata para formar geles tridimensionales, esta se preparó de la siguiente manera:
 1. Cortar 10 colas de rata adultas y lavarlas con jabón.
 2. Esterilizarlas por inmersión en etanol al 70% durante 30 minutos.
 3. Cortar la piel y desecharla, recolectar los tendones en la campana de flujo laminar y desinfectarlos en etanol al 70% durante 30 minutos.
 4. Dejar secar los tendones en la campana de flujo laminar y pesarlos.
 5. Usar 5 gramos de tendón por cada litro que se prepare.
 6. Agregar los tendones en una solución de ácido acético absoluto 1:1000 (debe usarse agua estéril) y agitar a 4°C por 48 horas (en adelante la solución siempre debe de mantenerse en frío).
 7. Remover los fragmentos grandes que no se hayan disuelto y centrifugar la colágena en una centrífuga Sorval a 10, 000 rpm por 1 hora a 4°C y recuperar el sobrenadante.
 8. Mantener la colágena en frío para evitar que se polimerice.

6.2 Obtención de fibroblastos primarios embrionarios de ratón.

1. Obtener embriones de ratón de 13 días de gestación.
2. Remover las membranas extraembrionarias, cabeza e intestinos, lavar los embriones 3 veces en PBS1X GIBCO (cat. 10010-023).
3. Una vez que este limpio el resto del embrión (carcasa), un grupo de 5 embriones se disgregan en 3mL de PBS1X al pasarlos a través de una aguja de calibre 18 ó en su defecto por una jeringa de 10mL (deben atravesar una sola vez la aguja).
4. Cultivar los restos disgregados en una caja de 150mL de medio D10 a 37°C y a 5% de CO₂ hasta que lleguen a confluencia.
5. Una vez que las células están en confluencia tripsinizarlas y expandirlas a 3 cajas de 150mm.

- Finalmente congelar 5 viales por cada caja confluyente (aprox. 1×10^6 células/mL).

6.3 Prueba de micoplasma (kit de VenorGeM cat. # MP0025)

Para determinar si los fibroblastos extraídos de embriones de 13 días no estaban contaminados con micoplasma, se realizó su detección por medio del kit de VenorGeM de la siguiente manera:

- Cultivar los fibroblastos hasta confluencia.
- Tomar 100 μ L de medio donde fueron cultivados los fibroblastos.
- Calentar el medio a 95°C por 5 minutos.
- Mezclar los siguientes componentes de PCR para 3 reacciones;

	3 reacciones (μ L)
Agua	107.4
Buffer de reacción 10X	15.0
Mezcla de primer y nucleótidos	15.0
Control interno	6.0
Taq Polimerasa (5U/ μ L)	0.6

- Poner 48 μ L de la mezcla anterior en 3 tubos de PCR.
- Agregar 2 μ L de agua a un tubo que servirá de control negativo.
- Agregar 2 μ L de DNA de micoplasma que servirá como control positivo.
- Agregar 2 μ L del sobrenadante de los fibroblastos previamente calentado.
- Correr un programa de PCR con las siguientes características;

	Programa
1 ciclo	94°C por 2 minutos
	55°C por 2 minutos

	72°C por 2 minutos
34 ciclos	94°C por 30 segundos
	55°C por 1 minuto
	72°C por 1 minuto
1 ciclo	72°C por 4 minutos
	Bajar de 4 a 8°C

10. Analizar los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% y comparar la muestra de fibroblastos contra el control positivo.
11. Una vez realizada la prueba y comprobado que no exista contaminación de micoplasma se pueden utilizar los fibroblastos para cultivar las ES.

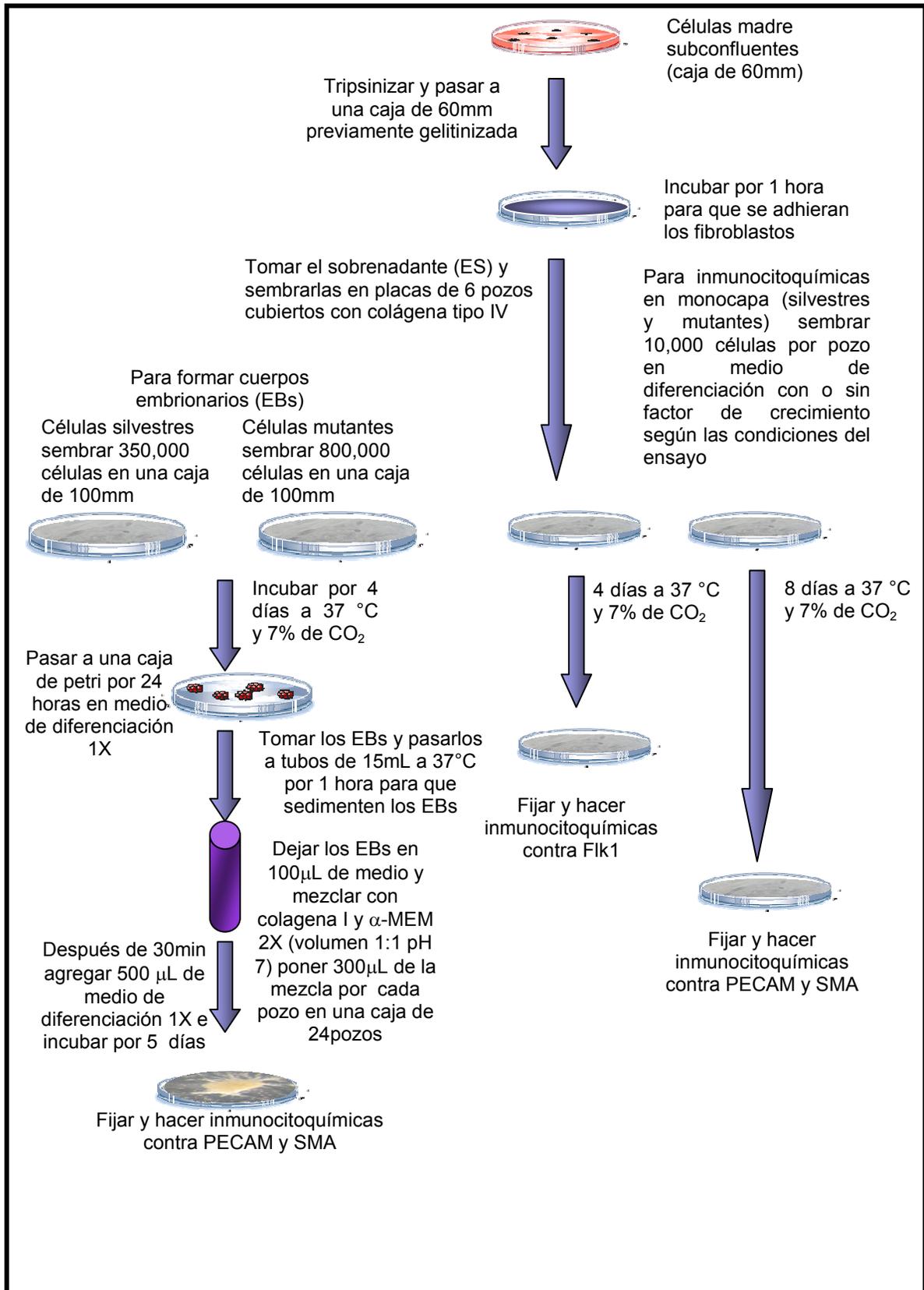
6.4 Mantenimiento de ES indiferenciadas.

- Las células se crecieron en una caja de 60mm con una monocapa de fibroblastos mitóticamente inactivos, para que estos les proporcionarán el Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF), el cual impide su diferenciación. Los fibroblastos deben de recubrir la caja completamente para evitar que existan huecos que puedan inducir la diferenciación de las ES al estar en contacto directo con la caja de cultivo.
- Las células deben de ser pasadas a una nueva caja de fibroblastos, antes de que las colonias lleguen a tocarse entre si, ya que esto también podría inducir su diferenciación (aproximadamente cada tercer día).
- Para pasar las células, primero debe de cambiárseles el medio D15 por lo menos 3 horas antes de tripsinizarlas.
- Una vez transcurrido este tiempo deben hacerse 2 lavados de PBS 1X (Gibco 2mL cada uno), y después agregar 0.5mL de tripsina-EDTA 0.25% (Sigma cat. T-4049) por 6 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender las células en medio D15 (5mL) y sembrar 1/10 de estas células en otra caja con fibroblastos mitóticamente inactivos.

6.5 Diferenciación de células angioblásticas, endoteliales y murales (Fig. 6).

1. Crecer una caja de 60mm con células madre embrionarias (ES) en medio de mantenimiento D15 y en una cama de fibroblastos tratados con mitomicina, hasta obtener una población grande de células madre embrionarias.
2. Disgregar las ES de la siguiente manera: hacer 2 lavados rápidos de 2mL con PBS1X, después agregar 0.5mL por 6 minutos, detener la reacción con 5mL de D15 y resuspender las células contra la base de la caja para separar totalmente las colonias de células.
3. Pasar las células a una caja cubierta con gelatina al 0.1% y dejarlas por una hora para que se adhieran los fibroblastos a la caja.
4. Tomar el sobrenadante que contiene las células madre embrionarias.
5. Sembrar 1×10^4 ES indiferenciadas a cada pozo de una placa de 6 pozos cubiertos con colágena tipo IV (25 μ g/mL) en 3mL de medio de diferenciación.
6. Para cubrir las cajas con colágena IV sólo se agregan 2mL de la solución a las placas de 6 pozos a manera que los recubra completamente por 2 minutos, después de los cuales se retira la colágena y se deja secar el pozo en la campana de flujo vertical.
7. Agregar factores de crecimiento dependiendo de las condiciones del experimento (50ng/mL de VEGF y 10ng/mL de PDGF-BB), para diferenciación a angioblastos y células endoteliales agregar VEGF y para diferenciar células de músculo liso agregar PDGF-BB.
8. Incubar a 7% de CO₂ y 37°C.
9. Las células para inmunocitoquímicas contra Flk1 deben de fijarse al cuarto día de incubación, con cambio de medio el segundo y tercer día.
10. Las células para inmunocitoquímicas contra SMA y PECAM deben de fijarse al octavo día de incubación, con cambio de medio y factores de crecimiento los días 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

Fig. 7 Diagrama de Flujo



6.6 Formación de estructuras tipo capilar en geles tridimensionales de colágena tipo I de cola de rata.

1. Sembrar 350,000 células silvestres en una caja de 100mm previamente tratada con colágena tipo IV 25µg/mL y en medio de diferenciación, en el caso de las células mutantes deben sembrarse 800,000 células en las mismas condiciones de las células silvestres.
2. El medio debe cambiarse los días 1, 2, 3 y al día 4 las células deben tripsinizarse brevemente agregando 1.5mL de tripsina y dando suaves golpes a la caja de modo que se despeguen cúmulos de células (la tripsinización no debe exceder más de 40 segundos) inmediatamente después de que se hayan despegado muchos cúmulos de células, la reacción se detiene con 10mL de medio de diferenciación y estas células son transferidas a una caja de petri de 100mm no tratada para adhesión celular, esto con la intención de formar cuerpos embrionarios (EBs).
3. Estos EBs se dejan incubando a 37°C y 7% de CO₂ por 24 horas en cajas de petri de 100mm.
4. Transferir el medio junto con los agregados a un tubo de 15 mL, con una pipeta de 10mL para evitar disgregar las células. Una vez hecho esto se incuban a 37°C por una hora.
5. Aspirar el sobrenadante hasta dejar 100µL de medio, evitando tomar los cuerpos embrionarios que fueron sedimentados por gravedad.
6. Los siguientes pasos deben hacerse en frío para evitar que se polimerice la colágena tipo I.
7. Mezclar medio de diferenciación 2X frío con colágena tipo I fría en proporción 1:1 (900µL de cada medio y 900µL de colágena), después agregar NaOH 1N hasta dejar la solución a pH 7.0 (9µL) (todo lo anterior en un tubo diferente al que contenga a los EBs)
8. Agregar esta solución a los 100µL de medio con los cuerpos embrionarios, resuspenderlos y poner 300µL de la solución en cada pozo de una caja de 24 pozos (debe hacerse con una pipeta de 2mL para no

- maltratar los EBs y debe ser rápido y tratando de no dejar burbujas en el medio).
9. Incubar los geles a 37°C y 5% de CO₂ por 30 minutos hasta que el gel se polimerice.
 10. Agregar de 500-700µL de medio de diferenciación tibio con o sin VEGF (50ng/mL), cambiar el medio cada segundo día.
 11. Se observará la formación de tubos después de 5-7 días.
 12. Para inmunocitoquímicas fijar con paraformaldehído (Sigma P-6148) al 4% en PBS 1X por 1hr.
 13. Para microscopía electrónica de transmisión fijar con glutaraldehído al 2% en PBS 1X por 2hrs (Fluka Biochemika 49631).

6.7 Inmunocitoquímicas

6.7.1 Soluciones y reactivos.

Se requiere de:

Buffer PBSMT

- 2% de leche descremada.
- 0.5% de Tween-20.
- Diluir en PBS y debe prepararse fresco antes de usarse.

PBS 1X para 1 Litro.

- NaCl 8.0g
- KCl 0.2g
- Na₂HPO₄ 1.44g
- KH₂PO₄ 0.24g
- Ajustar el pH a 7.4, aforar a 1litro y esterilizar por autoclave.

Paraformaldehído al 4%

- 4g de paraformaldehído.
- Disolverlos en 100 mL de PBS1X caliente a 65°C en un frasco de boca chica, para evitar perder líquido por la evaporación.
- Ajustar el pH a 7.4.
- Se hacen alícuotas y se congela a -20°C.

Glutaraldehído al 2% (5mL)

- Agregar 200µL de glutaraldehído al 50% a 4800µL de PBS 1X.

Kit de Diaminobenzidina para peroxidasa (VECTOR laboratories cat. SK-4100):

- Mezclar 5mL de agua destilada con 2 gotas de Buffer y mezclar.
- Agregar 4 gotas de DAB y mezclar.
- Agregar 2 gotas de peróxido de hidrógeno y mezclar.
- Agregar 2 gotas de nickel y mezclar.
- Adicionar la solución a las células a las que se les hizo la inmunohistoquímica por el tiempo necesario para que ocurra la reacción colorida y detener la reacción al quitarle la solución y agregando agua.
- Inmunocitoquímicas en monocapa contra Fik1 y PECAM dar 8 minutos de revelado.
- Inmunocitoquímicas en monocapa contra SMA dar 5 minutos de revelado.
- Inmunocitoquímicas de EBs en geles de colágena tipo I contra SMA y PECAM dar 9 minutos de revelado.

Anticuerpos:

- Anti-Flk1 usar 1: 100 (Chemicon cat. MAB 1667).
- Anti-PECAM (CD31) usar 1:50 (BD Pharmigen cat. 550274).
- Anti-SMA usar 1:200 (Oncogene cat. CP47).
- Anticuerpo secundario anti-rata acoplado a peroxidasa usar 1:100 (Santa Cruz Biotechnology cat. sc-2032).
- Anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa usar 1:100 (Santa Cruz Biotechnology cat. sc-2031).
- Anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a alexa 488 usar 1:100 (Molecular Probes cat. A21200).

6.7.2 Procedimiento para inmunocitoquímicas vs PECAM (CD31) en monocapa:

1. Lavar las células en monocapa 3 veces con PBS1X.
2. Fijar las células con paraformaldéhidio al 4% a 4°C por 15 minutos.
3. Lavar 3 veces con PBS1X para quitar el paraformaldéhidio (lavados rápidos).
4. Bloquear la actividad de peroxidasa endógena con 0.5% de H₂O₂ en PBS 1X por 30 minutos.
5. Bloquear con PBSMT fresco por 1 hora.
6. Incubar las muestras toda la noche con dilución 1:50 de anticuerpo contra PECAM en PBSMT a 4°C, la dilución se hizo en 200µL de PBSMT y los pozos fueron cubiertos con parafilm para que la solución se extendiera sobre toda la superficie del pozo.
7. Lavar 6 veces con PBSMT por 30 minutos cada uno.
8. Agregar el anticuerpo 2^o contra rata acoplado a peroxidasa en una concentración 1:100, de igual manera la dilución se hizo en 200µL de PBSMT.
9. Hacer 3 lavados de 30 minutos cada uno en PBSMT.

10. Lavar 3 veces con PBS1X, por 5 minutos cada uno.
11. Se procede a realizar una reacción colorida con 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) y Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

6.7.3 Procedimiento para inmunocitoquímicas vs SMA y Flk1 en monocapa (Kit de VECTOR cat. PK-7200).

1. Lavar las células en monocapa 3 veces con PBS1X
2. Fijar las células con paraformaldéhidio al 4% a 4°C por 15 minutos.
3. Lavar 3 veces con PBS1X para quitar el paraformaldéhidio (lavados rápidos).
4. Para bloquear la actividad de peroxidasa endógena, poner 0.3% de H₂O₂ y 0.3% de suero normal de caballo (NHS) en PBS 1X por 5 minutos.
5. Lavar con PBS 1X por 5 minutos en agitación.
6. Incubar las células por 20 minutos con NHS.
7. Decantar el exceso de suero de las cajas.
8. Incubar las cajas por 1 hora con el anticuerpo primario diluido en NHS.
9. Lavar con PBS 1X por 5 minutos.
10. Incubar las células con el anticuerpo universal biotinilado secundario (reconoce a ratón y a conejo) diluido en NHS por 1 hora.
11. Lavar en PBS 1X por 5 minutos.
12. Incubar por 30 minutos con la solución R.T.U. (contiene avidina-estreptavidina-peroxidasa, para amplificar la reacción al unirse a la biotina).
13. Lavar con PBS 1X por 5 minutos.
14. Se procede a realizar una reacción colorida con 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) y Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Kit de Vector SK-4100).

6.7.4 Procedimiento para inmunocitoquímicas de EBs vs PECAM y SMA.

1. Lavar los geles de colágena tipo I, 3 veces con PBS1X.
2. Fijar las células con paraformaldehído al 4% a 4°C por 1 hora.
3. Lavar 3 veces con PBS1X para quitar el paraformaldehído (lavados rápidos).
4. Separar los geles de los pozos parando una espátula delgada alrededor de las paredes del pozo (debe de hacerse de manera cuidadosa para evitar romper los geles).
5. Transferir los geles a una solución con 0.5% de H₂O₂ en PBS 1X en un tubo Falcon de 15mL y dejarlos agitando suavemente por 1 hora, para inactivar la peroxidasa endógena.
6. Bloquear los EBs con PBSMT por 1 hora en agitación y a 4°C.
7. Incubar las EBs con su anticuerpo primario correspondiente, diluido en PBSMT durante toda la noche a 4°C.
8. Hacer 6 lavados de una hora cada uno con 8mL de PBSMT en agitación y a 4°C .
9. Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PBSMT durante 2 horas a 4°C.
10. Hacer un lavado más de PBSMT durante toda la noche a 4°C.
11. Lavar 3 veces con PBS 1X (10mL) de 30 minutos cada uno.
12. Se procede a realizar una reacción colorida con 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) y Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Kit de Vector SK-4100).

6.7.5 Conteo de células.

1. Se tomaron fotografías tratando de cubrir toda la superficie de la caja a un aumento de 20X, se tomaron fotos de campo claro y contraste de fases en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200.
2. Las fotografías fueron numeradas y elegidas por múltiplos de 3 y se procedió a contar las células positivas para cada anticuerpo.
3. En las células WT se contaron aproximadamente de 9 a 11 campos, procurando contar más de 1500 células por pozo. Dado que no había gran número de células LPP3-/- se contaron la mayor cantidad de campos posibles (alrededor de 40).
4. Se obtuvo el porcentaje de células positivas para cada caja y cada anticuerpo marcado (Flk1, PECAM o SMA).
5. Se graficaron los porcentajes en una hoja de cálculo de Excel y se obtuvo la desviación estandar tras haber hecho 3 experimentos para cada condición.
6. Por último se realizó una prueba de T en una hoja de cálculo de Excel para verificar si es que existían diferencias significativas entre las células silvestres y mutantes. Se uso una probabilidad de 95% de confianza y 4 grados de libertad.

6.8 Curvas de crecimiento.

1. Para hacer las curvas de crecimiento, se sembraron 10,000 células (ya fueran WT o mutantes), en cajas de 35 mm, previamente cubiertas con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágena tipo IV, sin adición de factores de crecimiento y con 3mL de medio de diferenciación 1X.
2. Las cajas fueron puestas por triplicado para los días 1, 3, 5 y 7.

3. Cada día se sacaron las cajas correspondientes, fueron tripsinizadas y contadas al hemocitómetro.
4. Finalmente se sacó el promedio y la desviación estándar de las tres cajas para cada día y se graficaron en una hoja de cálculo de Excel.

6.9 Conteo de células al hemocitómetro.

1. Tomar 20 microlitros de la suspensión de células y llenar el hemocitómetro por ambos lados.
2. Contar los cuatro cuadrantes de las esquinas en ambos lados del hemocitómetro.
3. Para cada lado, dividir el número total de células entre 4.
4. multiplicar por 10,000.
5. multiplicar por los mL en que se tengan resuspendidas las células para obtener el número de células que se tienen en un volumen de medio.
6. Sacar un promedio de los resultados de ambos lados del hemocitómetro.
7. Hacer una conversión para saber el volumen en que se encuentra el número de células que se necesitan sembrar.

7. RESULTADOS.

7.1 Diferenciación de células angioblásticas (Flk1 positivas).

Con el fin de evaluar la capacidad de las células madre silvestres como mutantes, para diferenciarse hacia el linaje angioblástico, capaz de dar origen tanto a células endoteliales como a células de músculo liso se cultivaron las células madre en cajas cubiertas con colágena tipo IV y en medio de diferenciación 1X durante cuatro días. Además en algunas cajas se agregó VEGF, el cual se ha reportado que aumenta la población de células angioblásticas (Yamashita, J., *et al.* 2000). Después de los 4 días las células se fijaron y se realizaron inmunocitoquímicas contra el receptor Flk1 marcador de células angiogénicas. Finalmente se tomaron fotografías y se contaron diferentes campos para obtener el porcentaje de células positivas para este marcador de células angioblásticas. A continuación se presentan fotografías representativas de los campos analizados, a la izquierda siempre se muestra el contraste de fases y a la derecha el campo claro (Fig. 7-11). Nótese que las células silvestres forman colonias más grandes y definidas de células Flk1 comparado con las células LPP3-/- las cuales forman colonias (parches) más pequeños e irregulares. También se muestran las tablas con el porcentaje de células positivas y negativas para Flk1 en tres experimentos bajo las mismas condiciones, donde además se muestra el número total de células contadas por cada experimento (Tablas 1-5).

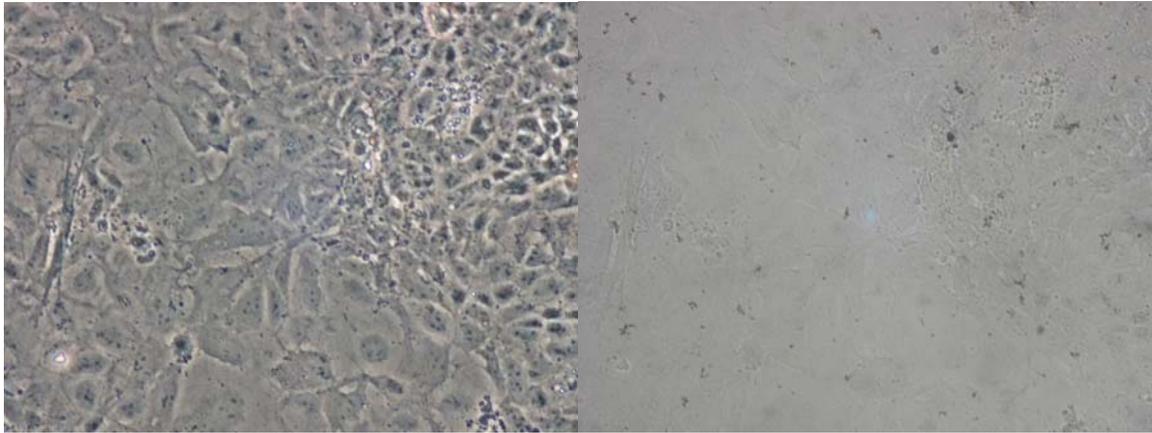


Fig. 8 Control negativo de inmunocitoquímicas contra Flk1. Fotografías representativas de control negativo (únicamente con el anticuerpo secundario) que sirvió como referencia para las inmunocitoquímicas contra Flk1 (aumento 20X).

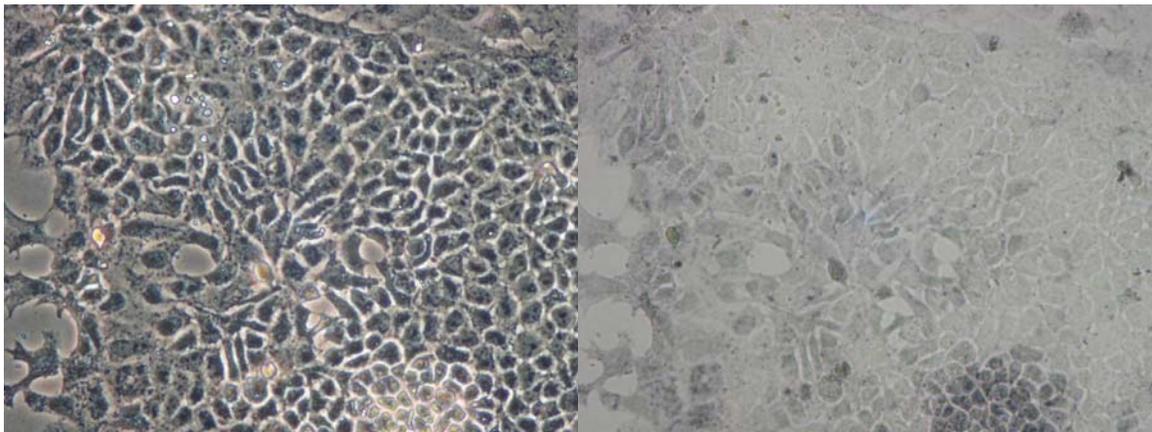


Fig. 9 Células Flk1+ silvestres tratadas con VEGF. Las células positivas para Flk1 pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro (aumento 20X). Nótese que las células positivas para Flk1 se localizan preferentemente en colonias.

WT	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
c/VEGF	56.7	43.3	1553
	48.2	51.8	1501
	59.6	40.4	1810
Promedio	54.8	45.1	1621.3
Desv. est.	5.9	5.9	-

Tabla 1. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra Flk1, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales se adicionó VEGF, en células silvestres.

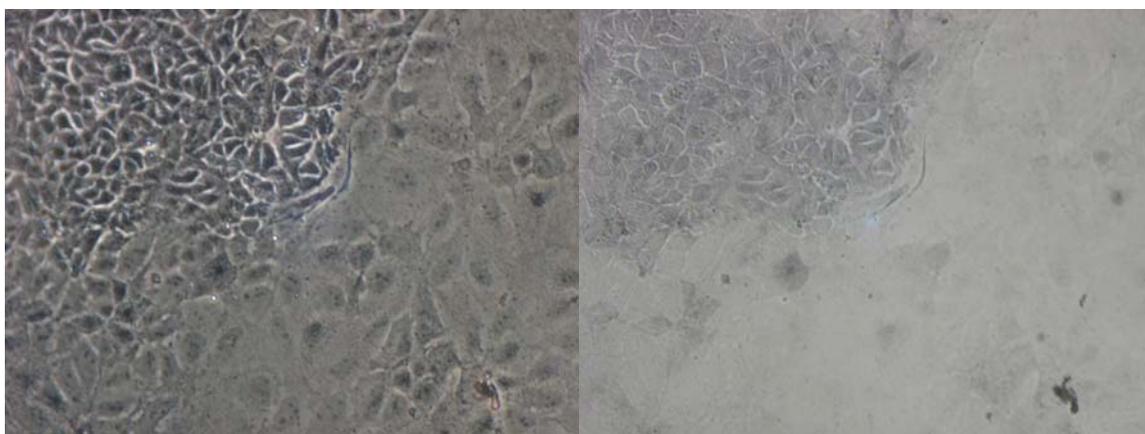


Fig. 10 Células Flk1+ silvestres sin VEGF. Las células positivas para Flk1 pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro (aumento 20X). Se puede observar nuevamente que las células Flk1 positivas se encuentran en una masa compacta de células y mucho menor número están extendidas comparadas con las mutantes.

WT	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
s/VEGF	62.1	37.9	1724
	65.3	34.7	1681
	54.3	45.7	2045
Promedio	60.5	39.4	1816
Desv est	5.6	5.6	-

Tabla 2. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra Flk1, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales no se adicionó VEGF, en células silvestres.

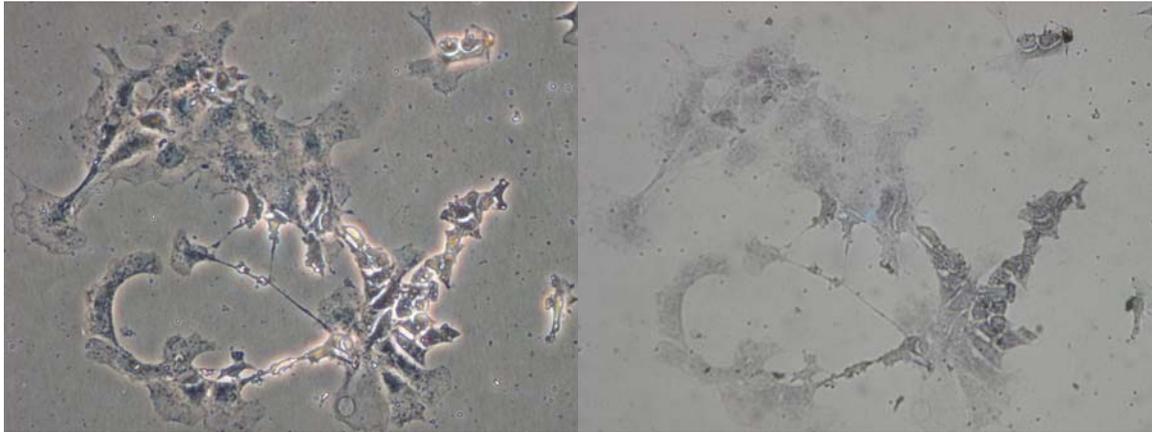


Fig. 11 Células Flk1+ mutantes tratadas con VEGF. Las células positivas para Flk1 pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro. Nótese que al no existir un alto número de células, las colonias son más pequeñas e irregulares.

LPP3-/-	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
c/VEGF	27.9	72.1	415
	31	69	1652
	43.4	56.6	1433
Promedio	34.1	65.9	1166.6
Desv. est.	8.2	8.2	-

Tabla 3. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra Flk1, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales se adicionó VEGF, en células mutantes.

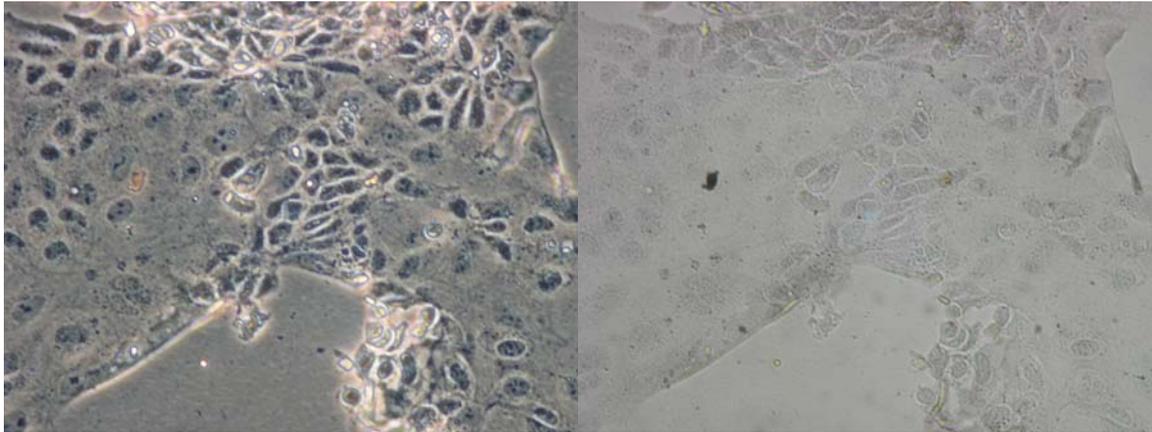


Fig. 12 Células Flk1+ mutantes sin VEGF. Las células positivas para Flk1 pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro. Nótese que las células positivas se encuentran en colonias, aunque estas no son tan grandes como las silvestres.

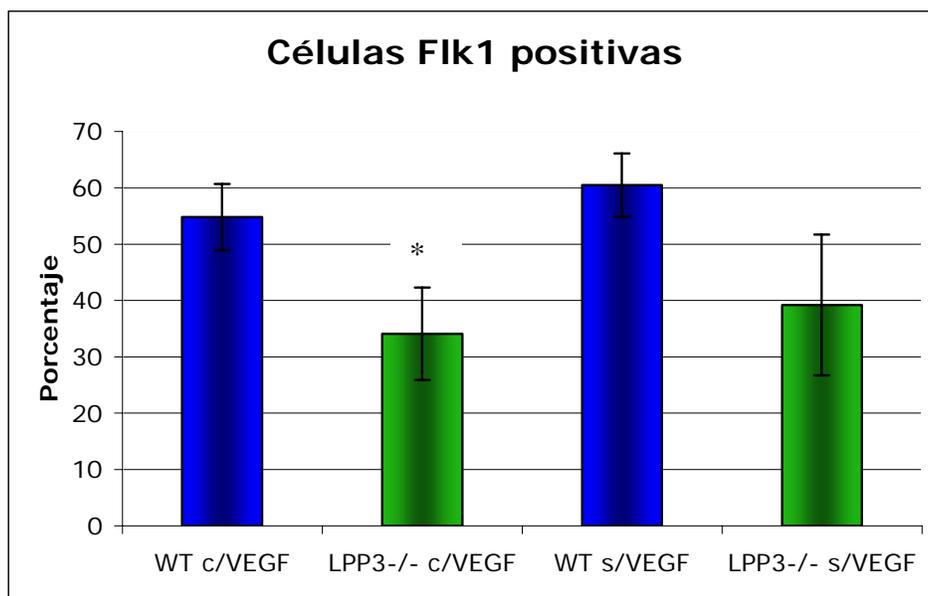
LPP3-/-	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
s/VEGF	52.8	47.2	784
	27.9	72.1	1115
	37.1	62.9	1363
Promedio	39.3	60.7	1087.3
Desv. est.	12.6	12.6	-

Tabla 4. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra Flk1, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales no se adicionó VEGF, en células mutantes.

	WT c/VEGF	LPP3-/- c/VEGF	WT s/VEGF	LPP3-/- s/VEGF
Promedio	54.8%	34.1%	60.5%	39.2%
Desv est	5.9	8.2	5.6	12.5

Tabla 5. Promedio y la desviación estándar de los promedios de cada una de las condiciones (con VEGF o sin VEGF) en las inmunocitoquímicas contra Flk1 tanto en células silvestres como mutantes.

En la grafica 1 se resumen los datos mostrados anteriormente, donde se muestra que tanto las células silvestres como las células LPP3-/- son capaces de dar origen a células angioblásticas Flk1+. En las células silvestres se observó un mayor porcentaje de células Flk1+ que en las células mutantes para la condición con VEGF ($p=0.023$). Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa del porcentaje de células Flk1+ entre ambos genotipos sin agregar VEGF ($p=0.055$) aunque se observa una tendencia a un menor número de células Flk1+ en células mutantes. Tampoco se encontraron diferencias entre células silvestres con o sin VEGF ($p=0.29$) ni en las células mutantes con o sin VEGF ($p=0.58$).



Gráfica 1. Porcentaje de células Flk1+, en genotipos mutante y silvestre, en condiciones con VEGF y sin VEGF. La condición mutante muestra un menor porcentaje de células Flk1+.

7.2 Diferenciación de células endoteliales (PECAM positivas)

Con el fin de evaluar la capacidad de las células madre silvestres como mutantes, para diferenciarse hacia células endoteliales las cuales forman parte de los vasos sanguíneos se cultivaron las células madre en cajas cubiertas con colágena tipo IV y en medio de diferenciación 1X durante ocho días. Además en algunas cajas se agregó VEGF, el cual se ha reportado que aumenta la población de células endoteliales (Yamashita, J., *et al.* 2000). Después de los 8 días las células se fijaron y se realizaron inmunocitoquímicas contra el PECAM marcador de células endoteliales. Finalmente se tomaron fotografías y se contaron diferentes campos para obtener el porcentaje de células positivas para este marcador de células endoteliales, cabe mencionar que únicamente se contaron células PECAM positivas que pudieran ser identificadas como células individuales, ya que estas crecen formando colonias. A continuación se presentan fotografías representativas de las inmunocitoquímicas, a la izquierda siempre se encuentra el contraste de fases y a la derecha el campo claro (Fig. 12-16). En las tablas 6-10 se muestra el porcentaje de células positivas y negativas para PECAM en tres experimentos bajo las mismas condiciones. Se observa que las células LPP3/- mostraron un menor número de colonias con respecto a las silvestres.

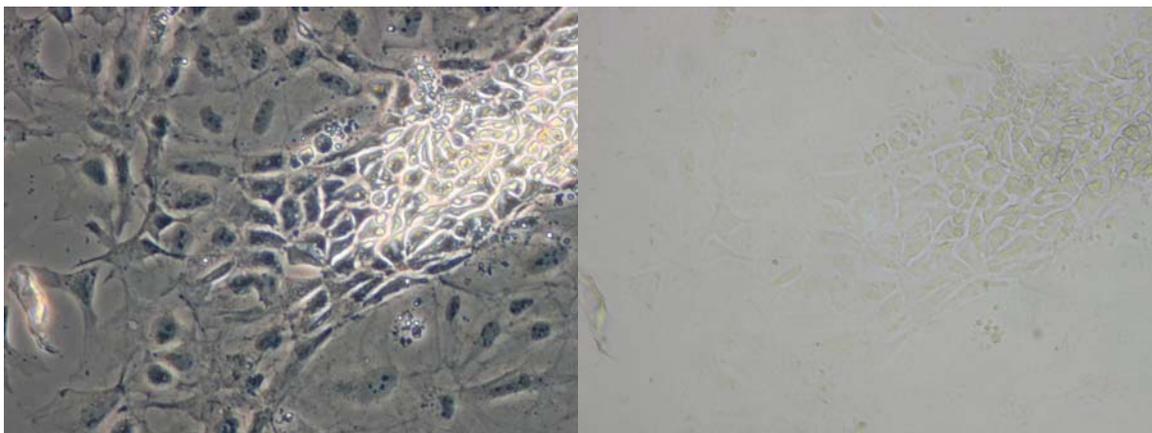


Fig. 13 Control negativo de inmunocitoquímicas contra PECAM. Del lado izquierdo se muestra el contraste de fases y del lado derecho el campo claro del control negativo (únicamente con el anticuerpo secundario) que sirvió como referencia para las inmunocitoquímicas contra PECAM (aumento 20X).

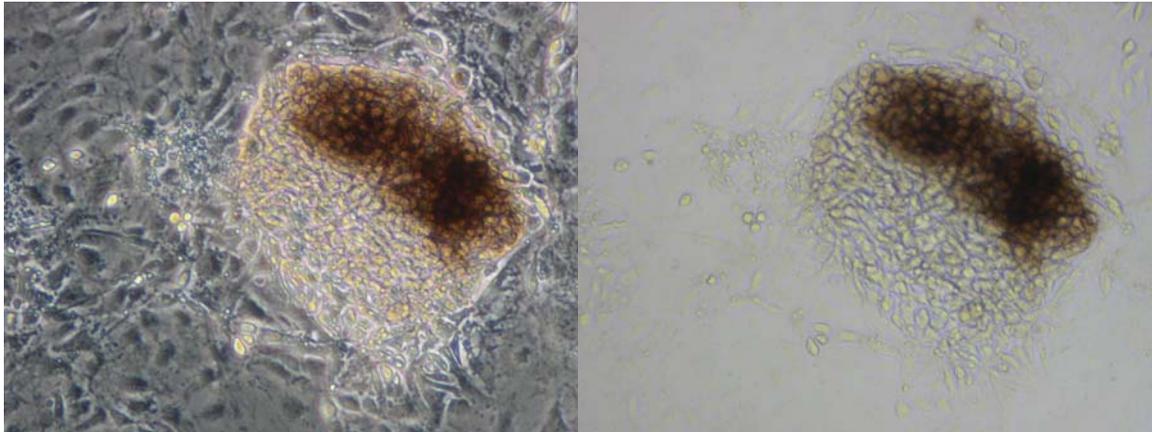


Fig. 14 Células PECAM+ silvestres tratadas con VEGF. Las células positivas para PECAM pueden observarse teñidas en café en el campo claro (aumento 20X).

WT	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
c/VEGF	34.3	65.7	2767
	40.7	59.3	2512
	23.5	76.5	2481
Promedio	32.8	67.1	2586.6
Desv. est.	8.6	8.6	-

Tabla 6. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra PECAM, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales se adicionó VEGF, en células silvestres.

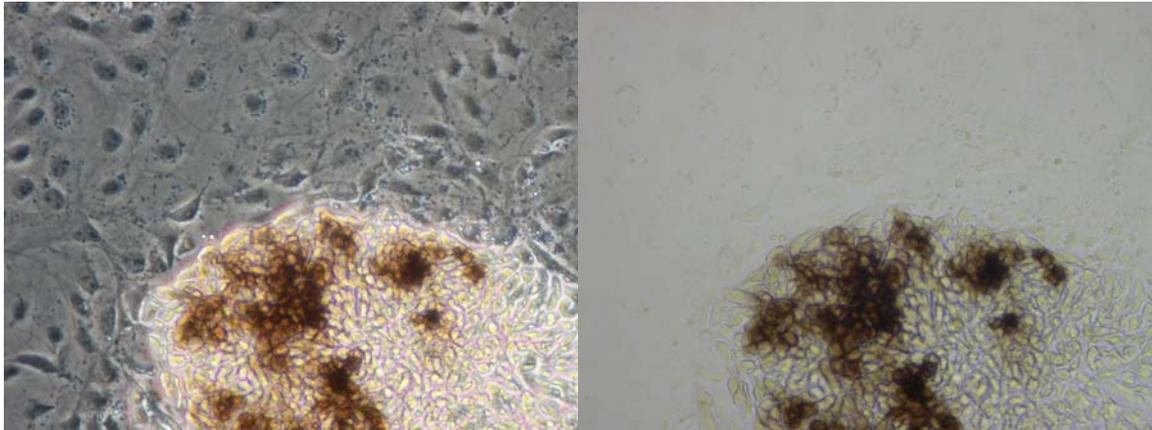


Fig. 15 Células PECAM+ silvestres sin VEGF. Las células positivas para PECAM pueden observarse teñidas en café en el campo claro (aumento 20X).

WT	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
s/VEGF	26.5	73.5	2972
	12.3	87.7	3615
	18.8	81.2	1625
Promedio	19.2	80.8	2737
Desv. est.	7.1	7.1	-

Tabla 7. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra PECAM, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales no se adicionó VEGF, en células silvestres.

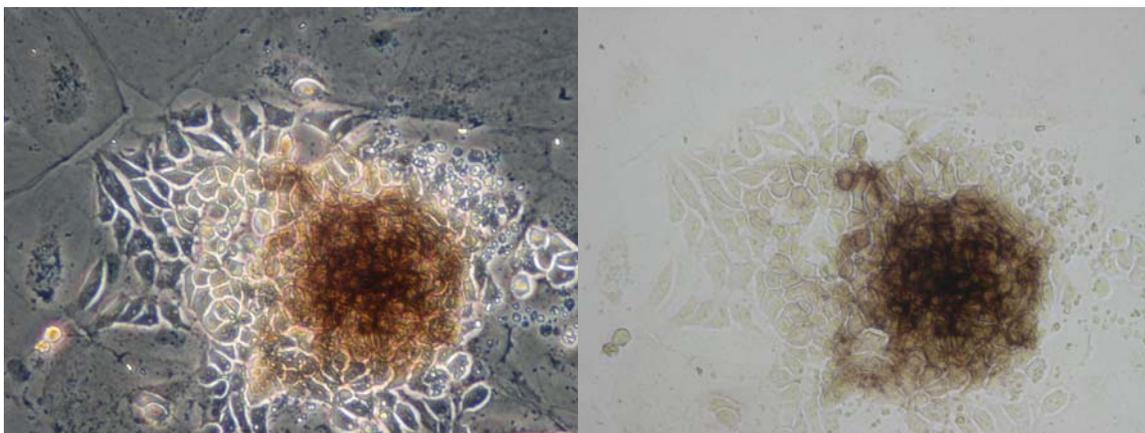


Fig. 16 Células PECAM+ mutantes tratadas con VEGF. Las células positivas para PECAM pueden observarse teñidas en café en el campo claro (aumento 20X).

LPP3-/-	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas(#)
c/VEGF	19.8	80.2	2699
	11.3	88.7	1074
	14	86	2268
Promedio	15	84.9	2013.6
Desv. est.	4.3	4.3	-

Tabla 8. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra PECAM, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales se adicionó VEGF, en células mutantes.

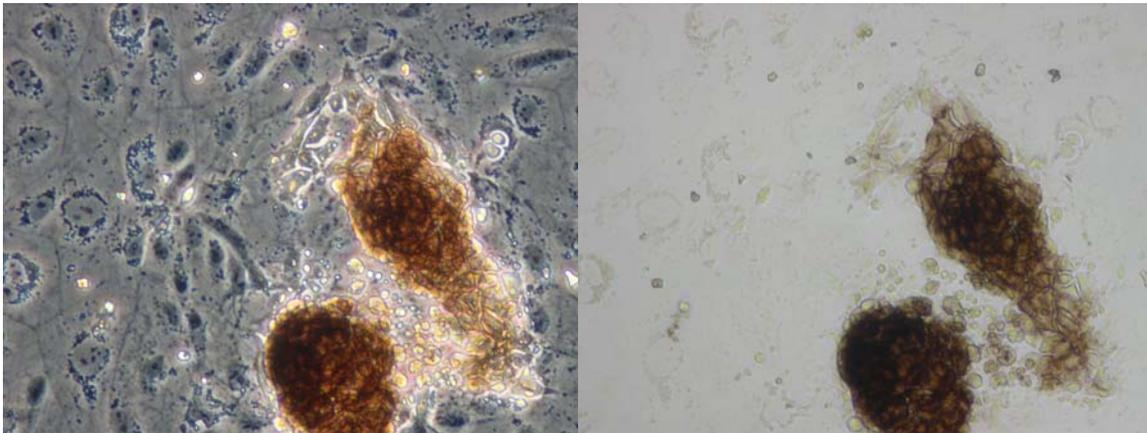


Fig. 17 Células PECAM+ mutantes sin VEGF. Las células positivas para Flk1 pueden observarse teñidas en café el campo claro (aumento 20X).

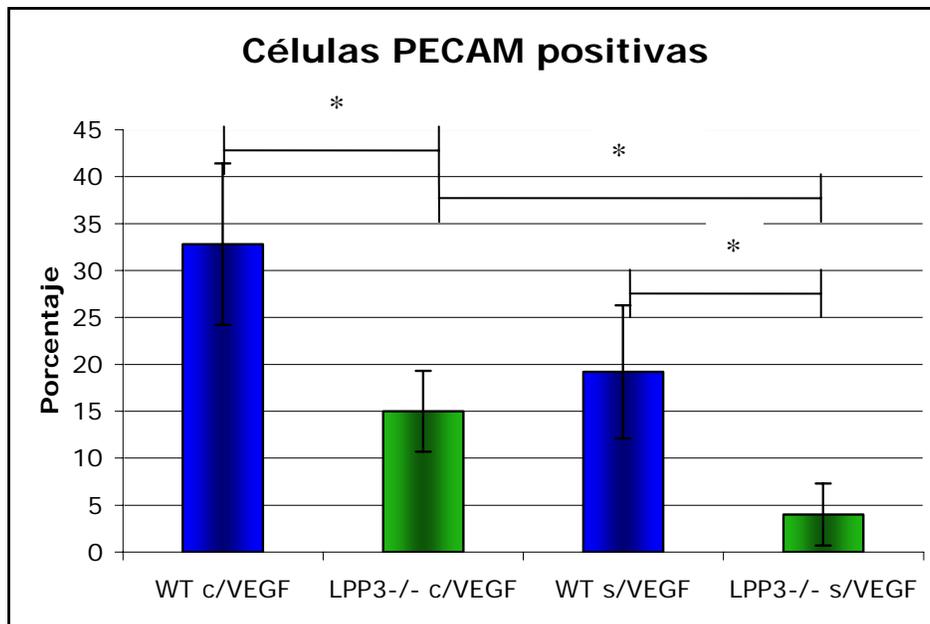
LPP3-/-	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
s/VEGF	7.5	92.5	1628
	3.7	96.3	1005
	0.8	99.2	856
Promedio	4	96	1163
Desv. est.	3.3	3.3	-

Tabla 9. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra PECAM, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales no se adicionó VEGF, en células mutantes.

	WT c/VEGF	LPP3-/- c/VEGF	WT s/VEGF	LPP3-/- s/VEGF
Promedio	32.8%	15%	19.2%	4%
Desv.est.	8.6	4.3	7.1	3.3

Tabla 10. Promedio y la desviación estándar de los promedios de cada una de las condiciones (con VEGF o sin VEGF) en las inmunocitoquímicas contra PECAM tanto en células silvestres como mutantes.

En la grafica 2 se resumen los datos mostrados anteriormente, en donde tras haber realizado una prueba de T observamos que las células silvestres muestran un mayor porcentaje de células PECAM+ comparadas con las células LPP3-/- tanto con VEGF ($p=0.03$) como sin VEGF ($p=0.028$), también observamos que no existe una diferencia significativa entre las células silvestres tratadas con VEGF y las no tratadas ($p=1$), sin embargo en las células mutantes si existe una diferencia significativa entre las células tratadas con VEGF con respecto a las no tratadas ($p=0.025$).



Gráfica 2. Porcentaje de células PECAM+, entre los genotipos silvestre y mutante, agregando o sin agregar VEGF. Las células mutantes diferencian a endotelios en menor proporción que las silvestres y responden menos al VEGF.

7.3 Diferenciación de células murales (SMA positivas).

Con el fin de evaluar la capacidad de las células madre silvestres como mutantes para diferenciarse hacia células de músculo liso, las cuales forman parte de los vasos sanguíneos, se cultivaron las células madre en cajas cubiertas con colágena tipo IV y en medio de diferenciación 1X durante ocho días, además en algunas cajas se agregó PDGF el cual se ha reportado que aumenta la población de células murales (Yamashita, *et al.* 2000). Después de los 8 días las células se fijaron y se realizaron inmunocitoquímicas contra actina de músculo liso (SMA) marcador de células murales ó miofibroblásticas. Finalmente se tomaron fotografías y se contaron diferentes campos para obtener el porcentaje de células positivas para este marcador de células murales. A continuación se presentan fotografías representativas de las inmunocitoquímicas, el contraste de fases siempre se encuentra a la izquierda y el campo claro a la derecha (Fig. 17-21), las tablas que muestran el porcentaje de células positivas y negativas para SMA en tres experimentos bajo las mismas condiciones, además se muestra el número total de células contadas por cada experimento (tablas 11-15). Nótese que las células de genotipo silvestre son más pequeñas en comparación con las células mutantes las cuales se extienden más en la superficie del plato de cultivo.

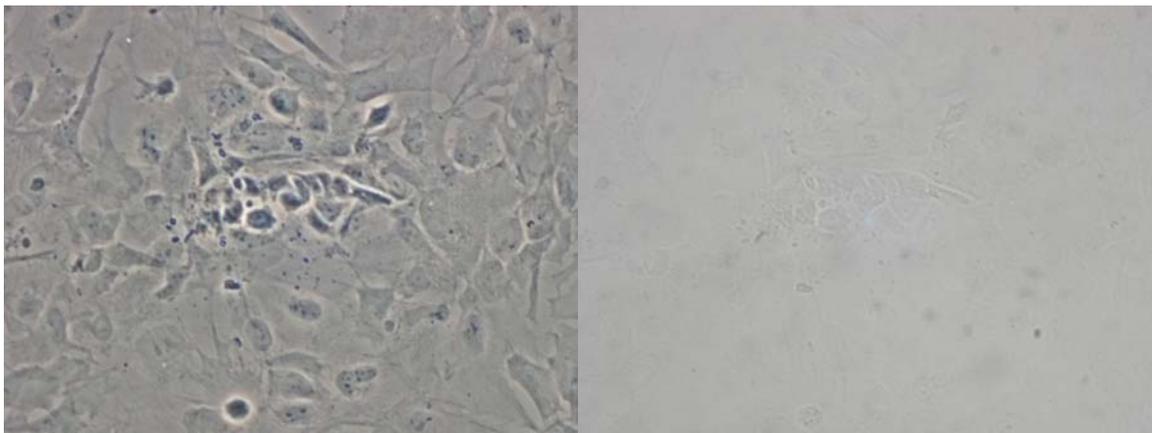


Fig. 18 Control negativo de las inmunocitoquímicas contra SMA. Del lado izquierdo se muestra el contraste de fases y del lado derecho el campo claro del control negativo (únicamente con el anticuerpo secundario) que sirvió como referencia para las inmunocitoquímicas contra SMA (aumento 20X).

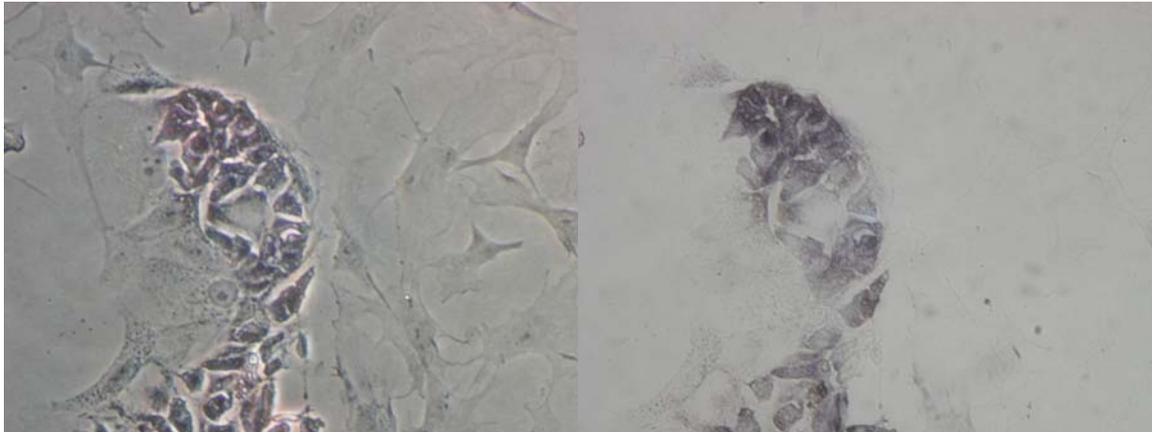


Fig. 19 Células SMA+ silvestres tratadas con PDGF. Las células positivas para SMA pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro (aumento 20X).

WT	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
c/PDGF	50.1	49.9	1910
	21.1	78.9	1198
	22.9	77.1	1333
Promedio	31.3	68.6	1480.3
Desv. est.	16.2	16.2	-

Tabla 11. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra SMA, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales se adicionó PDGF, en células silvestres.

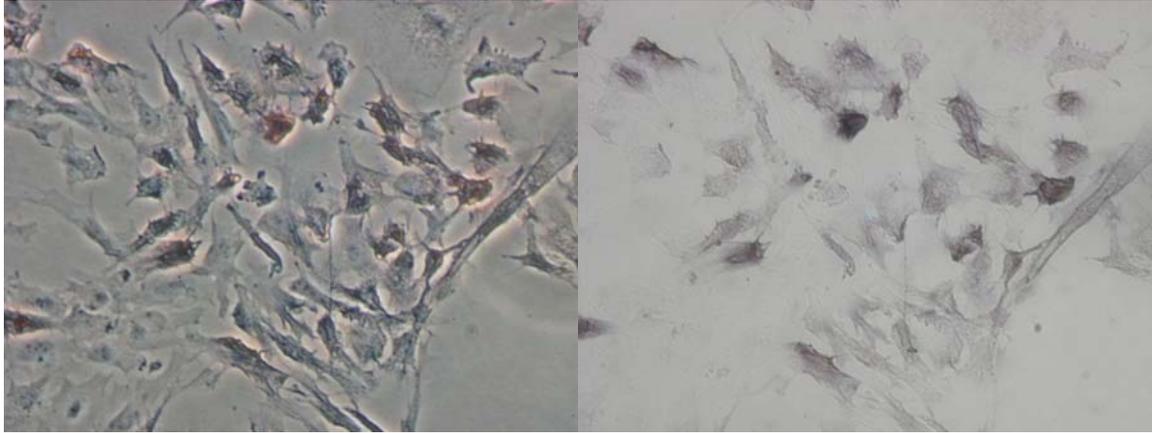


Fig. 20 Células SMA+ silvestres sin PDGF. Las células positivas para SMA pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro (aumento 20X).

WT	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
s/PDGF	54.2	45.8	1265
	32.4	67.6	1518
	17.7	82.3	1268
Promedio	34.7	65.2	1350.3
Desv. est.	18.3	18.3	-

Tabla 12. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra SMA, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales no se adicionó PDGF, en células silvestres.

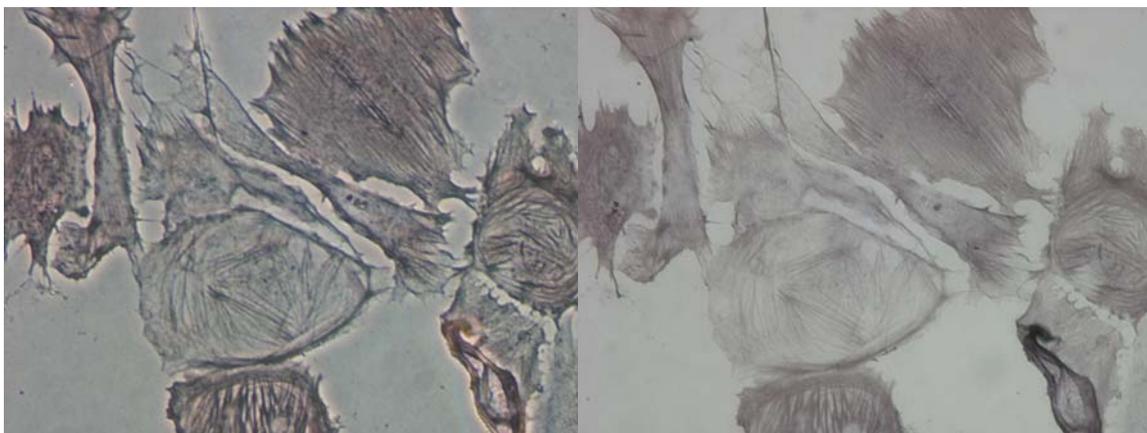


Fig. 21 Células SMA+ mutantes tratadas con PDGF. Las células positivas para SMA pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro (aumento 20X).

LPP3-/-	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
c/PDGF	97	3	412
	92.6	7.4	734
	99.3	0.7	429
Promedio	96.3	3.7	525
Desv. est.	2.7	2.7	-

Tabla 13. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra SMA, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales se adicionó PDGF, en células mutantes. Nótese que se contó un número menor de células comparado con las silvestres.

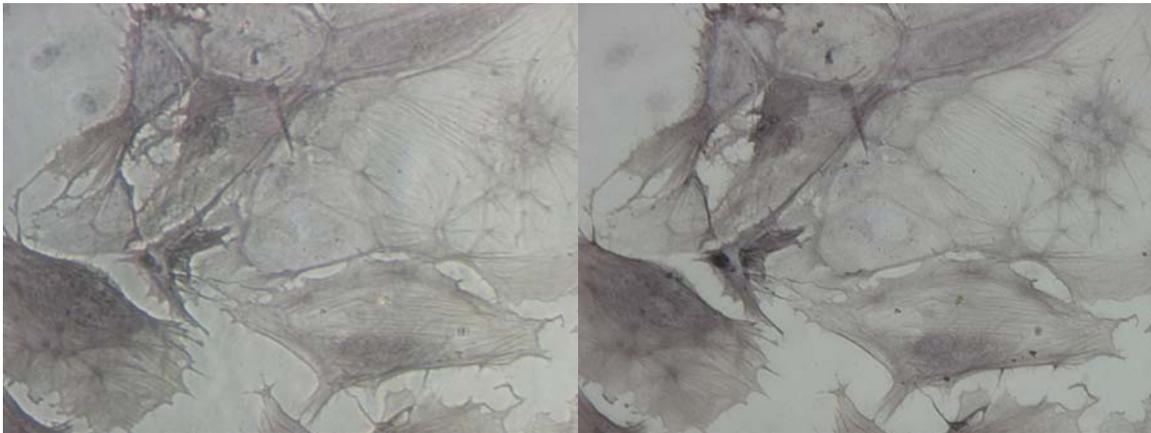


Fig. 22 Células SMA+ mutantes sin PDGF. Las células positivas para SMA pueden observarse teñidas en azul-negro en el campo claro (aumento 20X).

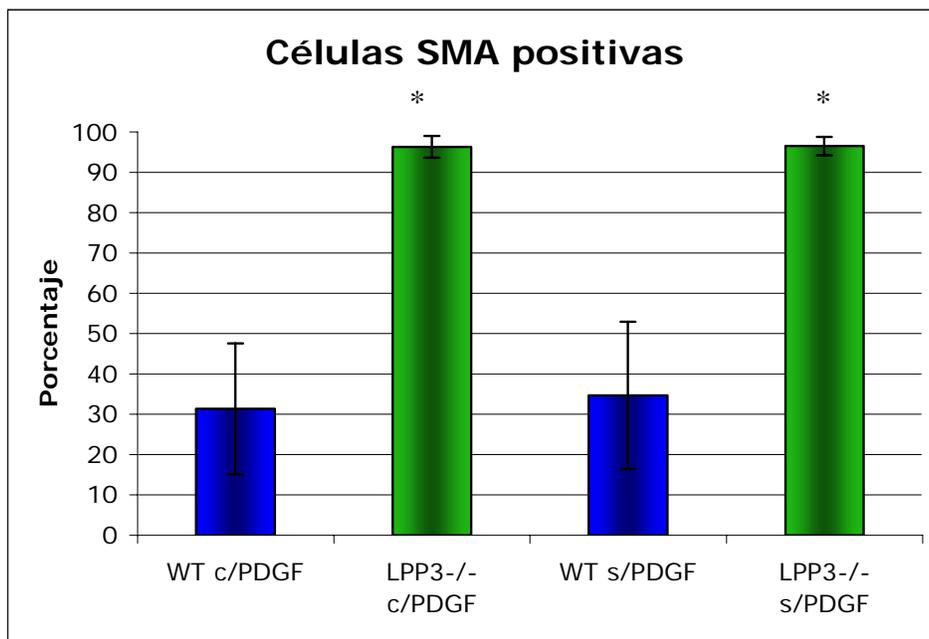
LPP3-/-	Positivas (%)	Negativas (%)	Total de células contadas (#)
s/PDGF	98.4	1.6	199
	93.9	6.1	361
	97.3	2.7	306
Promedio	96.5	3.4	288.6
Desv. est.	2.3	2.3	-

Tabla 14. Promedio y la desviación estándar de los porcentajes de cada una de las 3 inmunocitoquímicas contra SMA, además del total de células contadas para cada experimento en los cuales no se adicionó PDGF, en células mutantes. Aquí también se contaron menos células en comparación con la condición silvestre.

	WT c/PDGF	LPP3 ^{-/-} c/PDGF	WT s/PDGF	LPP3 ^{-/-} s/PDGF
Promedio	31.3	96.3	34.7	96.5
Desv est	16.2	2.7	18.3	2.3

Tabla 15. Promedio y la desviación estándar de los promedios de cada una de las condiciones (con PDGF o sin PDGF) en las inmunocitoquímicas contra SMA tanto en células silvestres como mutantes.

En la grafica 3 se resumen los datos mostrados anteriormente, donde tras haber realizado una prueba de T observamos que las células mutantes presentan un mayor porcentaje de células positivas para SMA con respecto a las células silvestres, tanto en condiciones con PDGF ($p=0.01$) como sin el ($p=0.02$). Además, las células silvestres tratadas y no tratadas con el factor de crecimiento no presentan diferencias significativas entre ellas ($p=0.8$) al igual que las mutantes ($p=0.9$).



Gráfica 3. Porcentaje de células SMA+ entre los genotipos silvestre y mutante, agregando o sin agregar PDGF. Las células mutantes se diferencian mucho más a células de músculo liso con respecto a las células silvestres.

7.5 Curvas de crecimiento.

Con la finalidad de analizar si existían diferencias en cuanto al crecimiento de las células silvestres y mutantes, con respecto al tiempo de incubación dado que aparentemente las células LPP3-/- tenían una menor cantidad de células en los experimentos anteriores se sembraron 10,000 células en cajas de 35mm, cubiertas con colágena tipo IV y en medio de diferenciación 1X, las células se incubaron a 37°C y 7% de CO₂ . Estas cajas fueron sacadas a diferentes días y contadas al hemocitómetro. Por último se sacaron los promedios de las tres repeticiones realizadas y su desviación estándar. A continuación se muestran las tablas (16 y 17), de los datos registrados para cada día de los experimentos realizados y sus gráficas correspondientes. Como se puede observar, mientras que las células silvestres presentan un crecimiento característico de células en división (grafica 4), las células mutantes mantienen su población a lo largo del tiempo (grafica 5) cuando éstas se crecen bajo las condiciones experimentales ya descritas, lo que nos indica que la falta de la enzima tiene un efecto importante en la regulación de la proliferación celular o bien de la supervivencia celular.

Células silvestres.

Se observó un crecimiento exponencial característico de células en división.

	Día 0	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
Caja 1	10000	11000	88500	394000	725000
	10000	20000	80250	392000	675000
Caja 2	10000	18500	67500	376000	635000
	10000	18500	107250	380000	552500
Caja 3	10000	12000	72000	368000	597500
	10000	10500	77250	316000	572500
Promedio	10000	15083.3	82125	371000	626250
Desviacion est	0	3972.9	13010.2	26172.5	59664.8

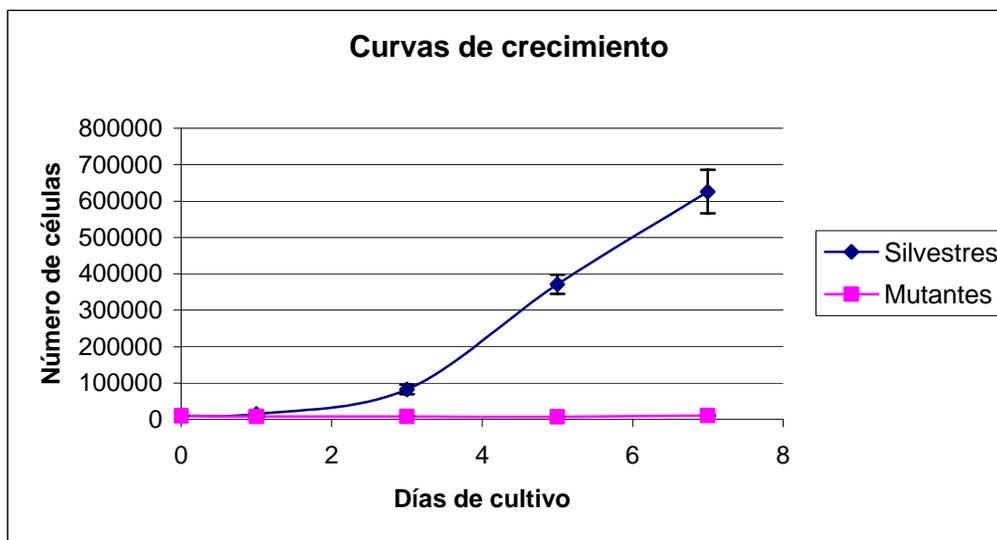
Tabla 16. Número de células silvestres contadas al hemocitómetro en diferentes días en tres experimentos a los cuales se les contó 2 veces el número de células por cada caja. Se obtuvo el promedio y la desviación estándar para cada día.

Células LPP3-/-

Se presentan los datos obtenidos del conteo de células mutantes en LPP3, para los diferentes días en que se siguió el crecimiento de las células.

	Día 0	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
Caja 1	10000	5750	7000	6750	8500
	10000	9500	7500	7250	9500
Caja 2	10000	9500	10000	5250	9000
	10000	8250	9250	7800	8000
Caja 3	10000	6750	6250	8750	13000
	10000	6250	8750	6750	14000
Promedio	10000	7666.6	8125	7091.6	10333.3
Desv est	0	1504.6	1312.9	1072.5	2303.4

Tabla 17. Número de células mutantes contadas al hemocitómetro en diferentes días en tres experimentos a los cuales se les contó 2 veces el número de células por cada caja, se les calculó el promedio y la desviación estándar para cada día.



Grafica 4. En esta gráfica se observa un crecimiento exponencial por parte de las células silvestres, mientras que las células mutantes muestran defectos en su crecimiento.

7.4 Formación de capilares en geles de colágena I.

Para determinar si las células endoteliales y murales eran capaces de formar capilares positivos para PECAM y SMA (endotelios y células de músculo liso respectivamente), se diferenciaron células silvestres y mutantes hacia angioblastos (Flk1+) durante 4 días en cajas cubiertas de colágena tipo IV en medio de diferenciación 1X (se sembraron 350,000 células silvestres y 800,000 células mutantes, debido a que las células LPP3-/- no aumentaban su número celular una vez puestas a diferenciar). Después se formaron cuerpos embrionarios (EBs) mediante la tripsinización rápida de estas células y colocándolas en una caja petri en medio de diferenciación 1X durante 24 horas. A continuación se transfirieron los cuerpos embrionarios a una solución de colágena I y medio alfa-MEM 2X (volumen 1:1 pH 7.0) por 5 días en medio de diferenciación 1X. Por último se fijaron los geles con paraformaldéhidio al 4% y se realizaron inmunocitoquímicas contra PECAM y SMA. Se muestran algunas fotos de las inmunocitoquímicas realizadas en los EBs tanto mutantes como silvestres (Fig. 22-27). Obsérvese que en ambos genotipos existen prolongaciones que salen de los cuerpos embrionarios, estas estructuras tienen apariencia de capilares y en algunas fotos se observan espacios los cuales pudieran estar ocupados por células endoteliales.

Imunocitoquímicas contra actina de músculo liso (SMA)

En ambos genotipos se logró observar la formación de estructuras tipo capilar con ramificaciones, como ocurre en la angiogénesis, estas estructuras fueron positivas para actina de músculo liso, sin identificarse grandes diferencias en su estructura entre silvestres y mutantes.

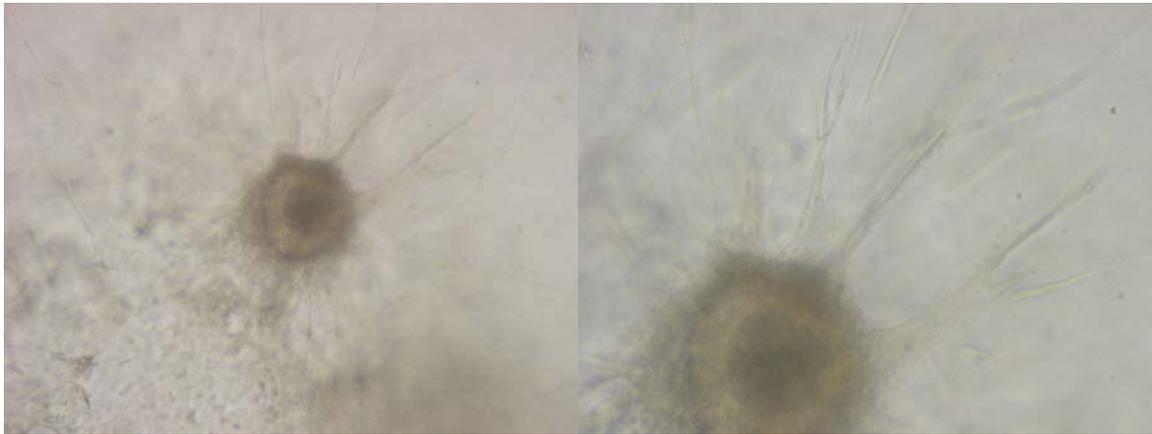


Fig. 23 Control negativo de inmunocitoquímicas contra SMA. Fotos tomadas en campo claro de controles negativos (únicamente con el anticuerpo secundario) de inmunocitoquímicas contra SMA, a la izquierda foto tomada a 10X y a la derecha una foto tomada a 20X.

Células silvestres

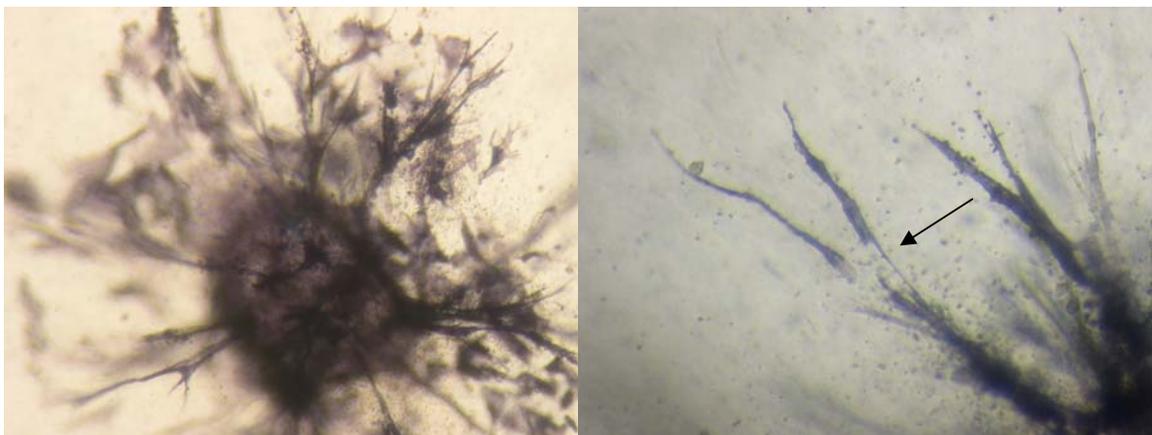


Fig. 24 Proyecciones SMA+ silvestres. Campo claro de inmunocitoquímicas contra SMA en células silvestres, a la izquierda foto tomada a 10X y a la derecha una foto tomada a 20X, en ambas fotos se observan estructuras parecidas a capilares positivos para SMA, en la foto de la derecha la flecha indica una discontinuidad en las células positivas a SMA y debajo de ellas otras células que no son murales las cuales podrían ser células endoteliales.

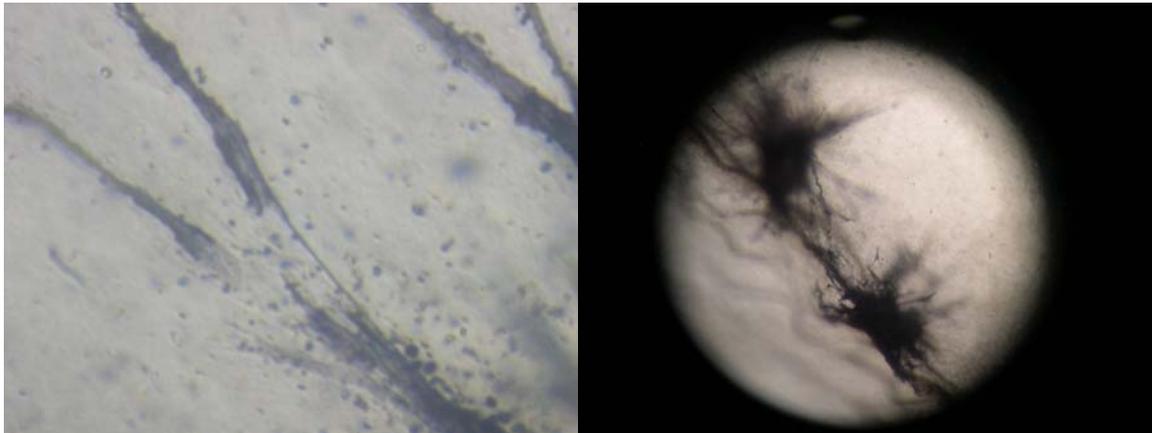


Fig. 25 Proyecciones SMA+ silvestres. La foto de la izquierda es el mismo campo de la foto 23 sólo que en un aumento de 40X en donde se puede apreciar mejor la célula que pasa por debajo de las células murales. A la derecha una foto 10X en donde se observan 2 cuerpos embrionarios que se unen a través de estructuras tipo capilar positivas para SMA en células silvestres.

Células mutantes.

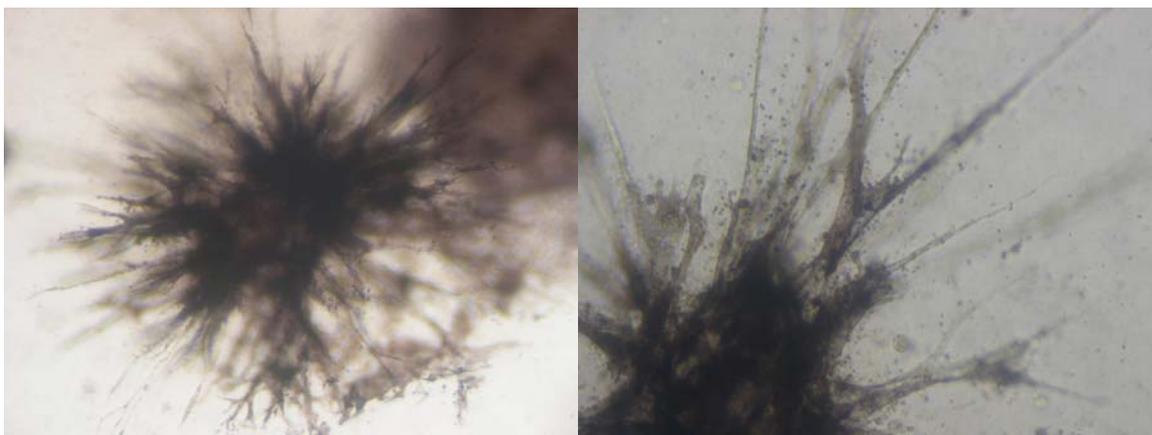


Fig. 26 Proyecciones SMA+ mutantes. Cuerpos embrionarios deficientes en LPP3, a la izquierda se observa que las células también son capaces de formar estructuras capilares positivas para actina de músculo liso (10X), la foto de la derecha a 20X, muestra con más detalle la extensión de estas estructuras.

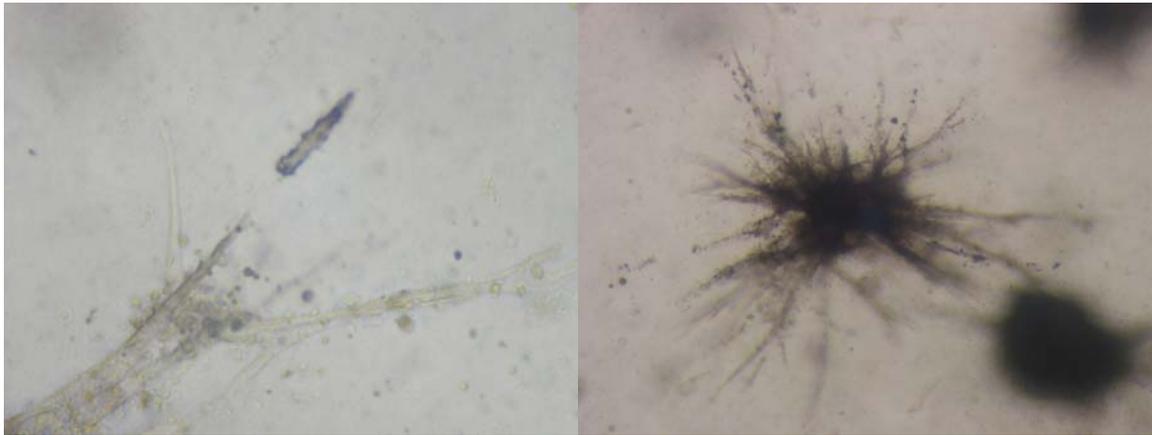


Fig. 27 Proyecciones SMA+ mutantes. Cuerpos embrionarios deficientes en LPP3, a la izquierda se observa una discontinuidad entre las células murales (40X), a la derecha (10X) se observa la interacción de 2 cuerpos embrionarios a través de sus "capilares" formados .

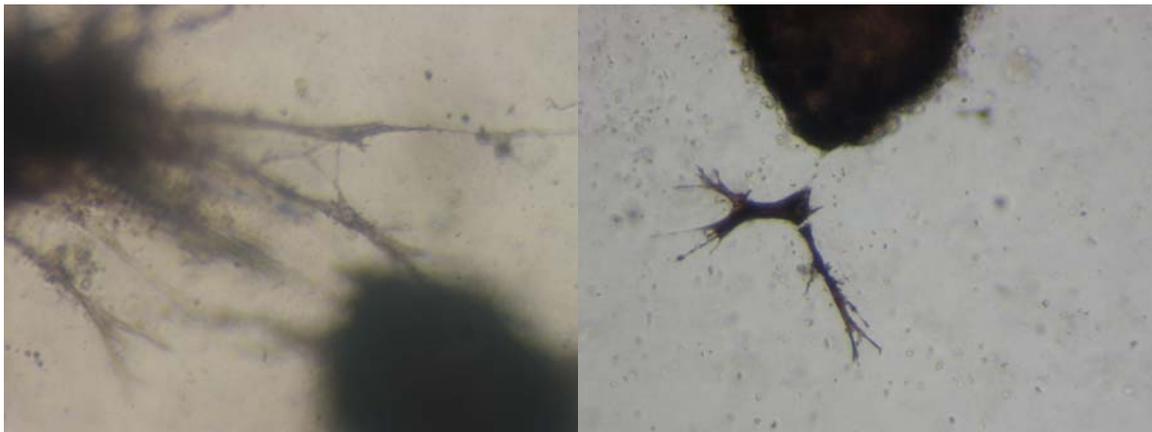


Fig. 28 Proyecciones SMA+ mutantes. Cuerpos embrionarios deficientes en LPP3, a la izquierda se observa la interacción de 2 cuerpos embrionarios a través de sus capilares formados (20X), a la derecha se observa una discontinuidad entre las células murales en donde podrían estar células endoteliales (10X).

Inmunocitoquímicas contra la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (PECAM).

En estas inmunocitoquímicas se observaron células positivas para PECAM (endotelios) tanto en el genotipo mutante como en el silvestre. Sin embargo, esta reacción colorida no fue tan clara como en el caso de las inmunocitoquímicas contra SMA. Las células PECAM + se observan más en el centro de los EBs (Fig. 28-31). Ya que el número de extensiones celulares PECAM positivas no es similar al mostrado con las tinciones para SMA, es probable que gran número de estas estructuras no corresponda a células endoteliales.

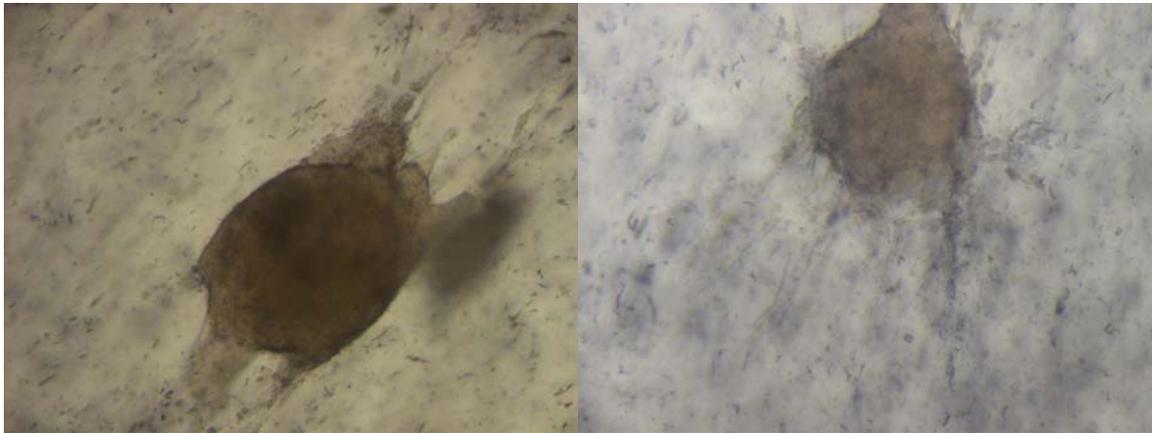


Fig. 29 Controles negativos para las inmunocitoquímicas contra PECAM. Controles negativos (únicamente con el anticuerpo secundario) con los cuales se compararon las inmunocitoquímicas contra PECAM en los cuerpos embrionarios. Ambas fotos son a 10X.

Células silvestres.

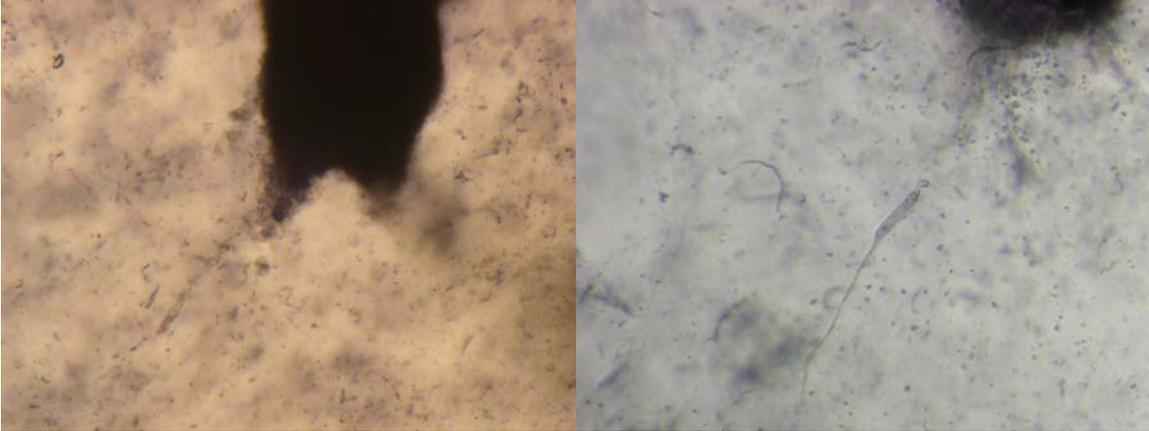


Fig. 30 Proyecciones PECAM+ silvestres. Inmunocitoquímicas contra PECAM en cuerpos embrionarios silvestres. A la izquierda foto a 10X donde se observan células PECAM positivas alrededor del cuerpo embrionario, sin embargo, la tinción no es tan clara en la célula tipo capilar, de igual manera la foto de la derecha a 10X también se muestra una célula endotelial positivas a la periferia del cuerpo embrionario sin embargo son pocas las ramificaciones alrededor del cuerpo.

Células LPP3-/-.

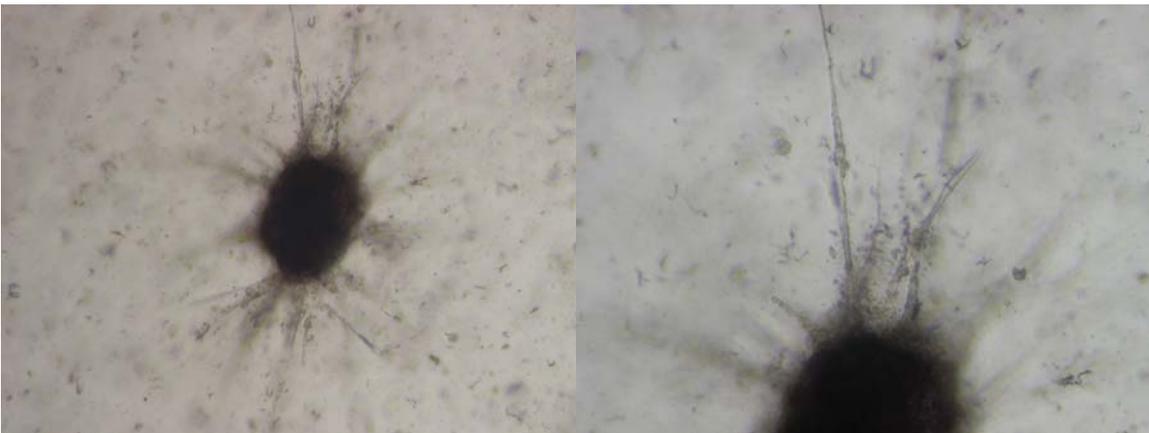


Fig. 31 Proyecciones PECAM+ mutantes. Cuerpos embrionarios deficientes en LPP3, a la izquierda se muestra una foto a 10X, en donde se observa claramente la presencia de células endoteliales en los cuerpos embrionarios, en los capilares se observa una ligera tinción sin

embargo en el interior de los EBs es aún más fuerte, a la derecha una foto a 20X en donde se puede notar con más detalle lo mencionado anteriormente.



Fig. 32 Proyecciones PECAM+ mutantes. Extensiones tipo capilar positiva para PECAM en cuerpos embrionarios deficientes en LPP3 (10X).

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se estandarizó un sistema de diferenciación *in vitro* por medio del cual se pudieron analizar algunos efectos de la mutación de LPP3 en el desarrollo vascular. Se observaron los efectos de la mutación de esta enzima en las células endoteliales y murales.

En primera instancia se diferenciaron ES silvestres hacia el linaje vascular y posteriormente se aplicó este sistema en ES LPP3^{-/-} y se comparó el comportamiento entre células silvestres y mutantes. La primera población celular que se analizó fue la de las células angioblásticas, ya que ésta nos indica si están presentes o no las células progenitoras del linaje vascular. En este ensayo se observó que tanto las células mutantes como silvestres son capaces de dar origen a células Flk1⁺, lo cual correlaciona con lo observado en los embriones deficientes en LPP3 que también presentan este tipo de células. Sin embargo se encontró que las ES LPP3^{-/-} presentan *in vitro* un menor porcentaje de células angioblásticas diferenciadas con respecto a las células silvestres en condiciones con VEGF.

En este sentido la primera diferencia observada al realizar los experimentos anteriores, fue que las células mutantes parecían no aumentar su población, por lo que se procedió a realizar curvas de crecimiento que confirmaron estas observaciones (Grafica 4). Este resultado puede ser consecuencia de dos posibles mecanismos distintos. Uno de ellos es que las células mutantes tengan una proliferación normal, sin embargo tengan una tasa de mortalidad igual a la tasa de división. La otra posibilidad, es que las células no estén proliferando y las mismas células sembradas en un principio sean las que se mantengan a lo largo del tiempo. Para distinguir cual de los procesos anteriores se está llevando a cabo en estas células se necesitaría realizar ensayos de proliferación a través de marcadores moleculares de división celular como lo es Ki67, PCNA, o ensayos de incorporación de 5-bromodeuxiuridina (BrdU). Para detectar muerte celular se podrían hacer ensayos de TUNEL o tinción con rojo neutro. De esta manera se determinará el proceso celular que

está interviniendo para que la población de células mutantes se mantenga y no aumente, o si es que ambos procesos están involucrados.

Por otro lado, aunque estadísticamente no existieron diferencias significativas en las células endoteliales silvestres diferenciadas con o sin VEGF, las células tratadas con el factor de crecimiento muestran una tendencia a desarrollar un mayor porcentaje de células endoteliales con respecto a las no tratadas. Por su parte las células LPP3^{-/-} si respondieron estadísticamente al VEGF, sin embargo la proporción de células que se diferenció fue mucho menor comparada con las silvestres. Esto sugiere que las células mutantes son poco susceptibles a esta diferenciación a endotelios.

Tanto la falta de proliferación como la poca diferenciación a células Flk1⁺ y endoteliales en el genotipo mutante, también podría deberse a deficiencias en la señalización de la vía de VEGF, ya que se sabe que tanto S1P como LPA inducen tanto la fosforilación de los receptores para VEGF, así como la expresión de este factor de crecimiento ([Tanimoto, et al. 2002](#); [Yabu, et al. 2005](#); [Sako, et al. 2006](#); [So, et al. 2005](#); [Hu, et al. 2001](#)). De esta manera, lo que podría estar sucediendo en las células mutantes es que exista un continuo estímulo de la vía de VEGF por parte de S1P y LPA, resultando en una desensibilización de esta misma vía, y ocasionando una disminución en la proliferación de las células vasculares así como una disminución en la diferenciación de células Flk1⁺ y endoteliales.

Otro probable mecanismo por el cual esta vía de VEGF pudiera estar afectada, es por la internalización de sus receptores, ya que se ha descrito que la formación de ácido fosfatídico y PIP₂ promueven la unión del complejo AP2 a la membrana citoplasmática ([West, et al. 1997](#); [Jones, et al. 1998](#)), este complejo a su vez se une a clatrin, lo que provoca la endocitosis de muchas proteínas de membrana ([Nesterov, et al. 1999](#)). En el caso de las células mutantes en LPP3, se elevarían los niveles de AP, lo cual estimularía este proceso de endocitosis por medio del cual ocurriría la internalización de receptores involucrados en los procesos vasculares como lo son: los receptores para VEGF, los EDGs, Tie 1/2, entre otros receptores que modulen la

vasculogénesis y la angiogénesis, ocasionando de igual manera una deficiente diferenciación a células Flk1+ y endoteliales, así como la inhibición del estímulo de proliferación en estas células.

La tercera diferencia notable fue que las ES LPP3^{-/-} diferenciadas *in vitro* por 8 días tanto en presencia como en ausencia de PDGF-BB, eran casi en su totalidad positivas para actina de músculo liso, lo que nos indica que la deficiencia de LPP3 puede favorecer la diferenciación de este tipo celular bajo estas condiciones experimentales

Como se mencionó en la introducción, S1P, a través de su receptor 1, estimula la producción de PDGF-A y PDGF-B en células de músculo liso (Usui, *et al.* 2004). El PDGF a su vez estaría sobre estimulando la diferenciación de células murales, ya que al no encontrarse LPP3 no podría defosforilar a S1P, por lo que aumentaría su señalización en este tipo celular. Es probable también que este estímulo de diferenciación a su vez estuviera inhibiendo la proliferación celular ya que también se ha reportado que la señalización de PDGF estimula la expresión de TGF- β , en células de músculo liso a través de MAPK/ERK (Nishishita, *et al.* 2004). En este sentido se ha reportado que TGF- β ejerce un efecto antiproliferativo debido a un arresto en las fases G₀/G₁ del ciclo celular a través de p38 en células de músculo liso sin causar apoptosis en ellas (Seay, *et al.* 2005). Esto correlaciona con la aparente deficiencia de proliferación o aumento de muerte sugerida por las curvas de crecimiento. Cabe mencionar que no se observaron células con morfología apoptótica en los cultivos de células mutantes; por lo que pensamos que las ES LPP3^{-/-} presentan reducción en su tasa de proliferación (respuesta a VEGF reducida) aunado a un incremento en la susceptibilidad a diferenciarse a células murales.

Datos preliminares que apoyan que existe una mayor susceptibilidad de las células LPP3^{-/-} a diferenciarse en células murales, provino de experimentos en donde se cuantificó el número de células SMA+ en condiciones de diferenciación con VEGF (el cual favorece la diferenciación de endotelios). En estos se encontró 1.48 veces mayor proporción de células mutantes SMA+ que en las silvestres (datos no mostrados).

A pesar de los datos anteriores el VEGF logra que las células mutantes expresen y mantengan el receptor Flk1, las cuales darán origen a las células endoteliales, mientras que cuando no existe este factor de crecimiento, el marcador Flk1 se pierde y se origina una mayor proporción de células murales (Yamashita, *et al.* 2000).

Uno de los resultados no esperados, es que las células mutantes fueron capaces de formar estructuras parecidas a capilares en cultivos tridimensionales de colágena tipo I. Las imágenes del microscopio óptico no nos revelaron mucha información acerca de la organización de estas estructuras que a simple vista parecen normales.

Este resultado fue inesperado ya que los embriones mutantes en LPP3, son incapaces de formar redes de capilares extendidas, como por ejemplo en el alantoides. Las estructuras tipo capilar formadas en este trabajo mostraron células SMA y PECAM positivas, aunque de estas últimas en mucho menor proporción, en ambos genotipos.

Una posible explicación es que las extensiones celulares provenientes de los EB's incluidos en colágena tipo I, no sean en su totalidad vasos capilares formados por células endoteliales y murales, ya que para este trabajo se partió de poblaciones celulares heterogéneas y no únicamente de células Flk1+. Esto tendría como consecuencia el crecimiento de estructuras formadas por otros tipos celulares. Adicionalmente es probable que se requiera de un mayor tiempo de cultivo de los EB's para permitir la formación de vasos capilares como se ha reportado en otros protocolos en donde se requiere de hasta 11 días para la formación de estas estructuras (Feraud, *et al.* 2001).

Todos los resultados anteriores nos aproximan a la mejor comprensión de cómo es que la enzima LPP3 se ve involucrada en la diferenciación de células vasculares y en el proceso de vasculogénesis y angiogénesis, este trabajo permitió montar un sistema para comenzar a disectar las posibles rutas moleculares por las cuales LPP3 causa las alteraciones celulares observadas.

9. CONCLUSIONES.

- Se logró estandarizar un sistema *in vitro* para el análisis de los efectos de la mutación de LPP3, en donde se lograron diferenciar células angioblásticas (Flk1+), células endoteliales (PECAM+) y células murales (SMA+) tanto de las células silvestres como de mutantes en LPP3.
- Se encontró un menor porcentaje de células angioblásticas y endoteliales en los cultivos de células deficientes en LPP3 con respecto a las células silvestres. Las células mutantes en esta enzima, mostraron una predisposición mayor a diferenciarse a células SMA+ que las células silvestres.
- Las células mutantes de LPP3 tienen defectos de crecimiento a lo largo del tiempo, mientras que las células silvestres crecen exponencialmente.
- Las células mutantes y silvestres formaron estructuras parecidas a capilares, positivas para SMA y en menor manera a PECAM, las estructuras tridimensionales no presentan grandes diferencias a simple vista en comparación con las células silvestres.

10. PERSPECTIVAS.

Como se mencionó anteriormente este trabajo es sólo una parte de un proyecto en el que se desea analizar la participación de la enzima LPP3 en los procesos vasculares. En adelante se espera realizar los ensayos de proliferación y muerte celular para determinar exactamente como es que la ausencia de LPP3 afecta el crecimiento de las células. También sería importante analizar la expresión de S1P₁ en células de músculo liso, para ver si existe una mayor expresión de este receptor en células mutantes los cuales señalicen más en demanda de una gran cantidad de ligando presente. Inmunocitoquímicas contra receptores de S1P nos proporcionarían información acerca de la internalización y desensibilización de estos receptores por exceso de señal. Otra molécula importante de analizar sería el RNAm del PDGF, el cual se espera sea más abundante en células mutantes con respecto a células silvestres. El análisis del RNAm de TGF- β y de la fosforilación de p38 serán dos datos que nos serán de gran ayuda para entender si es que por medio de estos mecanismos propuestos es que observamos una mayor diferenciación de células de músculo liso.

Aparte de estos mecanismos propuestos, se espera que el análisis de la expresión de los receptores (por RT-PCR y western blot) tanto de S1P como LPA nos den información sobre la señalización de estas moléculas que se sabe están involucradas en diferentes procesos celulares como proliferación y migración. Sería importante determinar si es que este último proceso celular esta aumentado o disminuido en las células mutantes, ya que también es un posible mecanismo por el cual se vean alterados los procesos de vasculogénesis y de angiogénesis, esto podría observarse mediante ensayos de migración en "transwell". De la misma manera en que se analizará la expresión de receptores para S1P y LPA, también sería útil determinar si es que las vías de señalización tanto de PDGF como VEGF se encuentran alteradas en las células mutantes. Para determinar si existe endocitosis de los receptores podría electroporarse en estas células proteínas de fusión de los receptores y proteínas fluorescentes

como la GFP, y así ver la dinámica de internalización de las células mutantes con respecto a las silvestres. Además para analizar la desensibilización de la vía de VEGF, pueden hacerse ensayos de estimulación con VEGF y observar la activación de sus receptores por medio de “western blot” contra las formas fosforiladas activas de Flk1 principalmente.

Ensayos de doble inmunofluorescencia contra PECAM y SMA en las proyecciones tipo capilar nos dirán si es que ambos tipos celulares están presentes y si es que las células murales recubren correctamente o no a las endoteliales. Por su parte los análisis de microscopia electrónica nos darán información sobre la organización de estos capilares “aparentemente” bien formados. Esto nos podría llevar a estudiar las uniones celulares en caso de ver diferencias entre los genotipos celulares. También, experimentos en donde se dejen incubar más tiempo estos cuerpos embrionarios nos darían la posibilidad de ver mayor número de proyecciones PECAM+.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Alexander, J., Patton, W., Christman, B., Cuiper, L., Haselton, F. (1998). Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **274**, 115-122.

Allende, M., Yamashita, T., Prio, R. (2003). G-protein-coupled receptor S1P₁ acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood.* **102**, 3665-3667.

Badhuin, L. Jiang, Y., Zaslavsky, A., Ishii, I., Chun, J., Xu, Y. (2003). S1P₃-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *FASEB J.* **18**, 341-343.

Bayless, K., Davis, G. (2003). Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 903-913.

Birwood, C., Saba, J., Dickson, R., Cunningham, K. (2001). Calcium Influx and Signaling in Yeast Stimulated by Intracellular Sphingosine 1-Phosphate Accumulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 11712-11718.

Blau, H., Brazelton, T., Weimann, J. (2001). The evolving concept of a stem cell: Entity or function?. *Cell.* **105**, 829-841.

Boguslawski, G., Grogg, J., Welch, Z., Ciechanowicz, S., Silvia, D., Kovala, A., McGlynn P., Brindley, D., Rhoades, R., English, D. (2002). Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Sphingosine 1-Phosphate and Related Lipids: Potential Role in the Angiogenic Response. *Exp. Cell. Res.* **274**, 264-274.

Bornfeldt, K., Graves, L., Raines, E., Igarashy, Y., Wayman, G., Yamamura, S., Yatomi, S., Sidhu, J., Krebs, E., Hakomori, S. (1995). Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J. Cell. Biol.* **130**, 193-206.

Brustle, O. (1999). Embryonic Stem Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. *Science.* **285**, 754-756.

Burnett, C., Howard, K. (2003). Fly and mammalian lipid phosphate phosphatase isoforms differ in activity both in vitro and in vivo. *EMBO Rep.* **4**, 793-799.

Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K. (1994). Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation. *J. Cell. Sci.* **107**, 3643-3654.

Chun, J., Goetzl, E., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K., Moolenaar, W. Pyne, S., Tigyi, G. (2002). International union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **54**, 265-269.

Donovan, P., Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.* **414**, 92-97.

Draper, J., Fox, V. (2003). [Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal](#). *Archives of Medical Research.* **34**, 558-564.

English, D., Kovala, A., Welch, Z., Harvey, K., Siddiqui, R., Brindley, D., Garcia, G. (1999). Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine-1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer permeability by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **8**, 627-634.

English, D., Welch, Z., Kovala, A., Harvey, K., Volpert, O., Brindley, D., Garcia, J. (2000). Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.* **14**, 2255-2265.

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

Feraud, O., Cao, Y., Vittet, D. (2001). Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies Development in Collagen Gels Recapitulates Sprouting Angiogenesis. *Laboratory Invest.* **81**, 1669-1681.

Fukushima, N., Chun, J. (2001). The LPA receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **64**, 21-32.

García, J., Liu, F., Verin, A., Birukova, A., Dechert, M., Gerthoffer, J., Bamberg, J., English, D. (2001). Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.* **108**, 689-701.

Gerrard, J., Kindom, S., Peterson, J., Krantz, K., Withe, J. (1979). Lysophosphatidic acids. Influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux. *Am. J. Pathol.* **96**, 423-438.

Gilbert, S.F. (1997). *Developmental Biology*. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H., Sobue, K. (2001). Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Unsaturated Lysophosphatidic Acids. *Cir. Res.* **89**, 251-258.

Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Woulburg, H., Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **153**, 543-553.

Hiroshi, K., Nobuyuki, T., Satomi, N., Kunihiro, T., Hiroaki, K., Takahiro, K., Werner, R., Kita, T., Shin-Ichi, N. (1997). Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Develop. Growth Differ.* **39**, 729-740.

Hisano, N., Yatomi, Y., Satoh, K., Akimoto, S., Mitsumata, M., Fujino, M., Ozaki, Y. (1999). Induction and suppression of endothelial apoptosis by sphingolipids: A possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood.* **93**, 4293-4299.

Hla, T., Maciag, T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein- coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **265**, 9308-9313.

Hobson, J., Rosendfelt, H., Barak, L., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M., Milstien, S., Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science.* **291**, 1800-1803.

Hu, Y., Tee, M., Goetzl, E., Auersperg, N., Mills, G., Ferrara, N., Jaffe, R. (2001). Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* **93**, 762-8.

Humtsoe, J., Bowling, R., Feng, S., Wary, K. (2005). Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* **335**, 906-919.

Humtsoe, J., Feng, S., Thakker, G., Yang, J., Hong, J., Wary, K. (2003). Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *EMBO J.* **22**, 1539-1554.

Igarashi, J., Erwin, P., Dantas, A., Chen, H., Michel, T. (2003). VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 10664-10669.

Igarashi, J., Michel, T. (2000). Agonist-modulated Targeting of the EDG-1 Receptor to Plasmalemmal Caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**, 32363-32370.

Jain R. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine.* **9**: 6, 685-693.

Jalink, K., Moolenaar, W., van Duijn, B. (1993). Lysophosphatidic Acid is a Chemoattractant for Dictyostelium discoideum Amoebae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1857-1861.

Jones, A., Wessling-Resnick, M. (1998). Inhibition of in Vitro Endosomal Vesicle Fusion Activity by Aminoglycoside Antibiotics. *J. Biol. Chem.* **273**, 25301-25309.

Kai, M., Wada, I., Imai, S., Shakane, F., Kanoh, H. (1997). Cloning and Characterization of Two Human Isozymes of Mg²⁺-independent Phosphatidic Acid Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**, 24572-24578.

Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., Okajima, F. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem. J.* **348**, 71-76.

Klug, M., Soonpa, M., Koh, G., Field, L. (1996). Genetically Selected Cardiomyocytes from Differentiating Embryonic Stem Cells Form Stable Intracardiac Grafts. *J. Clin. Invest.* **98**, 216-224.

Klug, M., Hla, T. (2001). Role of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor EDG-1 in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *Circ. Res.* **89**, 496-502.

Lee, H., Goetzl, E., An, S. (2000). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Cell Physiol.* **278**, C612-C618.

Lee, M., Thangada, S., Claffey, K., Ancellin, N., Liu, C., Kluk, M., Volpi, M., Sha`afi, R., Hla, T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by Sphingosine-1-Phosphate. *Cell*. **99**, 301-312.

Li, D., Sorensen, L., Brooke, B., Urness, L., Davis, E., Taylor, D., Boak, B., Wendel, D. (1999). Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin. *Science*. **284**, 1534-1537.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C., Hobson J., Rosenfeldt, H., Nava, V., Chae, S., Lee, M., Liu, C., Hla, T., Spiegel, S., Proia, R. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* **106**, 951-961.

Malbon, C. (2005). β -Catenin, Cancer, and G Proteins: Not Just for Frizzleds Anymore. *Sci STKE*. **292**, pe35.

Mc. Donald, J. (1999). Embryonic Stem Cells Heal Injured Spinal Cord. *Nature Med.* **5**, 1410-1412.
Meacci, E., Cencetti, F., Formigli, L., Squecco, R., Donati, C., Tiribilli, B., Quercioli, F., Zecchi, S., Francini, F., Bruni, P. (2002). Sphingosine 1-phosphate evokes calcium signals in C₂C₁₂ myoblasts via Edg3 and Edg5 receptors. *Biochem. J.* **362**, 349-357.

Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alamany, R., Laser, K., Neumann E., Zhang C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K., van Copen, C. (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺-signalling by G-protein-coupled receptors. *EMBO J.* **17**, 2830-2837.

Moolenaar, H. (1995). Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *J. Biol. Chem.* **270**, 12949-12952.

Moolenaar, H. (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp. Cell Res.* **253**, 230-238.

Moolenaar, H., van Corven E. (1990). Growth factor-like action of lysophosphatidic acid: mitogenic signalling mediated by G proteins. *Ciba Found Symp.* **150**, 99-106.

Nesterov, A., Carter, R., Sorkina, T., Gill, G., Sorkin, A. (1999). Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant μ 2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J.* **18**, 2489-2499.

Nishishita, T., Lin, P. (2004). Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF- β gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction. *Journal of cellular Biochemistry.* **91**, 584-593.

Okamoto, H., Yakuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H., Takuwa, Y. (2000a). Inhibitory Regulation of Rac Activation, Membrane Ruffling, and Cell Migration by the G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor EDG5 but Not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell Biol.* **20**, 9247-9261.

Okamoto, H., Yatomi, Y., Ohmiri, T., Satoh, K., Matsumoto, Y., Ozaki, Y. (2000b). Sphingosine 1-phosphate stimulates G(i)- and Rho-mediated vascular endothelial cell spreading and migration. *Thromb. Res.* **99**, 259-265.

Pages, C., Simon, M., Valet, P., Saulnier-Blache, J. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* **64**, 1-10.

Paik, J., Chae, S., Lee, M., Thangada, S., Hla, T. (2001). Sphingosine 1-Phosphate-induced Endothelial Cell Migration Requires the Expression of EDG-1 and EDG-3 Receptors and Rho-dependent Activation of alpha vbeta 3- and beta 1-containing Integrins. *J. Biol. Chem.* **276**, 11830-11837.

Panetti, T., Magnusson, M., Peyruchaud, O., Zhang, Q., Cooke, M., Sakai, T., Mosher, D. (2001). Modulation of cell interactions with extracellular matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* **64**, 93-106.

Panetti, T., Nowlen, J., Mosher, D. (2000). Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1013-1019.

Popperl, H., Schmid, C., Wilson, V., Hume, C., Dodd, J., Krumlauf, R., Bedington, R. (1997). Misexpression of Cwnt8C in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development.* **124**, 2997-3005.

Ralston, A., Rossant, J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin. Genet.* **68**, 106-112.

Renault, A., Sigal, Y., Morris, A., Lehmann, R. (2004). Soma-Germ Line Competition for Lipid Phosphate Uptake Regulates Germ Cell Migration and Survival. *Science.* **305**, 1963-1966.

Rizza, C., Leitinger, N., Yue, J., Fischer, D., Wang, D., Shih, P., Lee, H., Tigyi, G, Berliner, J. (1999). Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial / leukocyte interaction. *Lab. Invest.* **79**, 1227-1235.

Roberts, R., Sciorra, V., Morris, A. (1998). Human Type 2 Phosphatidic Acid Phosphohydrolases. *J. Biol. Chem.* **273**, 22059-22067.

Rossant, J., Tam, P. (2002) Mouse Development, Patterning, Morphogenesis and Organogenesis. First Edition. Academic Press. Hardcover.

Rundhaug, J. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.* **9**; 2, 267-285.

[Sako, A., Kitayama, J., Shida, D., Suzuki, R., Sakai, T., Ohta, H., Nagawa, H.](#) (2006). Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) by mesothelial cells and quantification of host-derived VEGF in malignant ascites. *J Surg Res.* **130**, 94-101.

Sciorra, V., Morris, A. (1999). Sequential Actions of Phospholipase D and Phosphatidic Acid Phosphohydrolase 2b Generate Diglyceride in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3863-3876.

Sciorra, V., Morris, A. (2002). Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1582**, 45-51.

Schulze, C., Smales, C., Rubin, L., Staddon, J. (1997). Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J. Neurochem.* **68**, 991-1000.

Schumacher, K., Classen, H., Spath, M. (1979). Platelet aggregation evoked *in vitro* and *in vivo* by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb. Hemost.* **42**, 631-640.

Seay, U., Sedding, D., Krick, S., Hecker, M., Seeger, W., Eickelberg, O. (2005). TGF- β -dependent Growth Inhibition in Primary Vascular Smooth Muscle Cells is p38-dependent. *JPET* #91249.

[Seufferlein T, Rozenfurt E.](#) (1994). Sphingosine induces p125FAK and paxillin tyrosine phosphorylation, actin stress fiber formation, and focal contact assembly in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem.* **4**, 27610-7.

Shamblott, M. J. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **98**, 113-118.

Sigal, J., McDermott, M., Morris, A. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem. J.* **387**, 281-293.

Smith, A., (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 435–462.

So, J., Wang, F., Navari, J., Schreher, J., Fishman, D. (2005). LPA-induced epithelial ovarian cancer (EOC) in vitro invasion and migration are mediated by VEGF receptor-2 (VEGF-R2). *Gynecol Oncol.* **97**, 870-878.

Spiegel, S. and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 397-407.

Startz-Gaiano, M., Cho, N., Forbes, A., Lehmann, R. (2001). Spatially restricted activity of a Drosophila lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development.* **128**, 983-991.

Sun, B., Nishihira, J., Suzuki, M., Fukushima, N., Ishibashi, T., Kondo, M., Sato, Y., Todo, S. (2003). Induction of macrophage migration inhibitory factor by lysophosphatidic acid: Relevance to tumor growth and angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.* **12**, 633-641.

Tamama, K., Okajima, F. (2002). Sphingosine 1-phosphate signaling in atherosclerosis and vascular biology. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 489-495.

Tamama, K., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Kanda, T., Ohta, H., Ui, M., Kobayashi, I., Okajima, F. (2001). Extracellular mechanism through the Edg family of receptors might be responsible for sphingosine-1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **353**, 139-146.

Tanimoto, T., Jin, Z., Berk, B. (2002). Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J. Biol. Chem.* **277**, 42997-43001.

Tigyi G. (2001). Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycerophospholipids. *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* **64**, 47-62

Tigyi, G., Fischer, D., Baker, D., Wang, D., Yue, J., Nusser, N., Virag, T., Zsiros, V., Liliom, K., Miller, D., Parrill, A., (2000). Pharmacological characterization of phospholipid growth factor receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **905**, 34-53.

Tokomura, A., Fukusawa, K., Tsukatani, H. (1978). Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids* **13**, 572-574.

Usui S., Sugimoto N., Takuwa N., Sakagami S., Takata S., Kaneko S., Takuwa Y. (2004). Blood lipid mediator sphingosine 1-phosphate potently stimulates platelet-derived growth factor-A and -B chain expression through S1P1-Gi-Ras-MAPK-dependent induction of Kruppel-like factor 5. *J. Biol. Chem.* **279**,12300-12311.

Van Corven, E., Van Rijswijk, A., Jalink K., Van der Bend, R., Van Blitterswijk W., Moolenaar W. (1992). Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J.* **281**, 163-169.

Van Leewen, F., Giepmans, B., Van Meeteren, L., Moolenaar W. (2003). Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1209-1212.

Waggoner, D., Xu, J., Singh, I., Jasinska, R., Zhang, Q., Brindley, D. (1999). Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 299–316.

Wang, F., Nobes, C., Hall, A., Spiegel, S. (1997). Sphingosine 1-phosphate stimulates Rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* **324**, 481-488.

Wang, F., Van Brocklin, J., Hobson, S., Zukowska, Z., Milstien, S., Spiegel, S.(1999). Sphingosine 1-Phosphate Stimulates Cell Migration through a Gi-coupled Cell Surface Receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 35343-35350.

[Wary, K.](#), [Humtsoe, O.](#) (2005). Anti-lipid phosphate phosphohydrolase-3 (LPP3) antibody inhibits bFGF- and VEGF-induced capillary morphogenesis of endothelial cells. *Cell Commun Signal.* **2**, 9-19.

Waters, C., Sambhi, B., Kong, K., Thompson, D., Pistón, S., Pyne S. (2003). Sphingosine 1-Phosphate and Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Act via PDGFbeta Receptor-Sphingosine 1-Phosphate Receptor Complexes in Airway Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 6282-6290.

West., M., Bright., N., Robinson, M. (1997). The Role of ADP-ribosylation Factor and Phospholipase D in Adaptor Recruitment. *J. Cell Biol.* **138**, 1239-1254.

Xia, P., Wang, L., Gamble, J., Vadas, M. (1999). Activation of Sphingosine Kinase by Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Apoptosis in Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 34499-34505.

[Yabu, T., Tomimoto, H., Taguchi, Y., Yamaoka, S., Igarashi, Y., Okazaki, T.](#) (2005). Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood.* **106**, 125-34.

Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T., Igarashi, Y. (2001). Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* **64**, 107-122.

Yamamura, S., Hakomori, S., Wada, A., Igarashi, Y. (2000). Sphingosine-1-phosphate Inhibits Haptotactic Motility by Overproduction of Focal Adhesion Sites in B16 Melanoma Cells through EDG-Induced Activation of Rho. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **905**, 301-307.

Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., Nishikawa, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature.* **2** (408), 92-96.

Yang, X., Castilla, L., Xu, X., Li, C., Gotay, J., Weinstein, M., Liu, P., Deng, C. (1999). Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development* **126**, 1571-1580.

Zhang, N., Sundberg, J., Gridley, T. (2000). Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis.* **27**,137-40.

Zhang, W., Zhang, J., Purcell, K., Cheng, Y. Howard, K. (1997). The Drosophila protein wunen repels migrating germ cells. *Nature.* **385**, 64-67.