



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO DE LA CONDUCTA PROLIFERATIVA Y DE MUERTE CELULAR EN EMBRIONES Y LÍNEAS CELULARES DEFICIENTES EN LPP3.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ANDREA DECTOR VEGA.



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

DIRECTOR DE TESIS :
DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dector
Vega
Andrea
0445526547227
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Ciencias
Biología
401050323

2. Datos del Tutor.

Doctora
Diana María
Escalante
Alcalde

3. Datos del sinodal 1.

Doctor
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade

4. Datos del sinodal 2.

Doctor
Luis Felipe
Jiménez
García

5. Datos del sinodal 3.

Doctora
María Genoveva
González
Morán

6. Datos del sinodal 4.

Doctor

Jorge Manuel
Vázquez
Ramos

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la conducta proliferativa y de muerte celular en embriones y líneas celulares deficientes en LPP3.

81 p

2006

AGRADECIMIENTOS.

A mis papás y a mis hermanos que gracias a ellos he llegado a ser quien quiero ser. Les agradezco todo lo que me han dado.

A Diana y a Francisco por transmitirme su amor al conocimiento y a la investigación y por todas sus enseñanzas.

A todos mis amigos del laboratorio por todo su apoyo y amistad, gracias Giss, Alex, Mundo, Roberto, Yola, Xóchitl.

A todos mis amigos del taller Fabiola, Nidia, Erika, Karina, Sinué, Roberto.

A todas las personas que me ayudaron, a Héctor que me ayudó tanto con el citómetro.

A todos los sinodales, gracias.

A todos mis amigos que siempre han estado conmigo, en las buenas y en las malas, los aprecio mucho y a Paco por apoyarme e impulsarme a realizar siempre mis metas.

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM CON APOYO DEL CONACYT (39995Q).

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
TÍTULO.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (LPP3).....	2
1.2 Regulación de procesos celulares.....	8
1.3 LPA y ciclo celular.....	11
1.4 Apoptosis.....	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
5.1 Preparación de soluciones, medios y reactivos.....	17
5.2 Curvas de crecimiento.....	21
5.3 Determinación del área que ocupan los MEFs WT vs. LPP3-/-.....	23
5.4 Determinación de la duración del ciclo celular.....	23
5.5 Sincronización de células.....	27
5.6 Detección de apoptosis.....	27
5.7 Inmunohistoquímicas vs. Pcna.....	29
5.8 Tinción de rojo neutro para detectar apoptosis.....	32
5.9 TUNEL in situ para embriones de ratón.....	33
6. RESULTADOS.....	35
I. Diferencias morfológicas entre MEFs WT y LPP3 -/-.....	35
II. Curvas de crecimiento.....	36
III. Detección de apoptosis mediante TUNEL.....	39
IV. Resultados de la determinación de la duración del ciclo celular.....	43
V. Resultados inmunohistoquímica vs. Pcna para detectar proliferación.....	52
VI. Resultados de TUNEL in situ para detectar apoptosis.....	56
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	66
9. PERSPECTIVAS.....	66
10. APÉNDICE.....	68
11. APÉNDICE TABLAS.....	71
12. BIBLIOGRAFÍA.....	76

RESUMEN

La fosfatasa de lípidos fosfatados-3 (LPP3) es una enzima que desfosforila lípidos bioactivos como el ácido lisofosfatídico (LPA), la esfingosina-1-fosfato (S1P), la ceramida-1-fosfato (C1P) y el ácido fosfatídico (PA) y por esto es que está involucrada en la señalización celular. La LPP3 tiene actividades tanto intracelulares como extracelulares y es necesaria su presencia para permitir una embriogénesis exitosa y contribuir a un desarrollo normal en el ratón. Su mutación es letal, impidiendo que los ratones se desarrollen más allá del día 10.5 de gestación.

Los niveles de los lípidos bioactivos en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) mutantes para LPP3 están alterados con respecto a los MEFs silvestres. Como consecuencia de esto, algunos procesos celulares como proliferación, apoptosis, migración, angiogénesis, organización del citoesqueleto, supervivencia y ciclo celular pudieran estar modificados. En este trabajo se encontró que existen cambios en proliferación y regulación del ciclo celular en los MEFs mutantes para LPP3, los cuales proliferan más que los silvestres y presentan una desregulación en el control del ciclo celular. También se observó un incremento de apoptosis en embriones mutantes para LPP3. Éstos presentaron un incremento en muerte celular en la región anterior.

Todo esto sugiere que la LPP3 participa en la regulación del ciclo celular y se requiere para la supervivencia de las células en zonas específicas en embriones de ratón.

ABREVIATURAS FRECUENTES

LPP fosfatasa de lípidos fosfatados

PA Ácido fosfatídico

C1P Ceramida-1-fosfato

LPA Ácido lisofosfatídico

S1P Esfingosina-1-fosfato

MEFs Fibroblastos embrionarios de ratón

DG Diacilglicerol

PLD Fosfolipasa C

MAPK Map cinasa

Cdk Cinasa dependiente de ciclinas

WT Silvestre

Pcna antígeno nuclear de proliferación celular

BrdU bromodesoxiuridina

ON toda la noche, “overnight”

ESTUDIO DE LA CONDUCTA PROLIFERATIVA Y DE MUERTE CELULAR EN EMBRIONES Y LÍNEAS CELULARES DEFICIENTES EN LPP3.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 Fosfatasa de lípidos fosfatados 3 (LPP3)

Las fosfatasas de lípidos fosfatados (LPPs) son una familia de glicoproteínas integrales de membrana que catalizan la desfosforilación de un número de lípidos incluyendo al ácido lisofosfatídico (LPA), esfingosina 1-fosfato (S1P), ácido fosfatídico (PA) y ceramida 1-fosfato (C1P) produciendo monoacilglicerol, esfingosina, diacilglicerol (DAG) y ceramida, respectivamente. Estos fosfolípidos tienen efectos complejos en funciones celulares actuando en los receptores de membrana plasmática y en blancos intracelulares (Sciorra & Morris, 2002). De esta manera tienen efectos tanto extracelulares como intracelulares.

Las funciones de las LPPs incluyen: atenuar las acciones de LPA y S1P, modular la liberación de LPA, regular la adhesión celular, regular la captura de lípidos extracelulares y modular los lípidos que actúan como segundos mensajeros (Pyne et al., 2004). Los lípidos juegan múltiples papeles dentro de las células. Muchas veces el mismo lípido puede tener papeles estructurales y regulatorios dentro de la célula, e incluso pueden actuar como mensajeros. Por ejemplo, DAG es un importante precursor para la síntesis biológica de lípidos en el retículo endoplásmico, pero en la membrana plasmática actúa como segundo mensajero activando a PKC (proteína cinasa C) (Siegal et al., 1999). Precisamente, las LPPs pueden atenuar la señalización de PA al producir DAG.

En un inicio a las LPPs se les llamaron fosfatasas de ácido fosfatídico (PAPs), las cuales se clasificaron en 2 grupos en base a su distribución y a sus propiedades catalíticas. La

actividad tipo 1 está asociada con el citoplasma y el retículo endoplásmico, además de que su actividad es inhibida por N-etilmaleimida (NEM) y requiere de Mg^{2+} . En cambio, las PAP del tipo 2 se caracterizan por no requerir cationes bivalentes, así como presentar insensibilidad al agente alquilante NEM (Jamal et al., 1991). De estos estudios se ha inferido que las PAP-1 tienen un papel en la síntesis de lípidos, mientras que PAP-2 tienen un papel importante al modular la señalización de los lípidos fosfatados. Esta familia Pap-2 es la que ahora se conoce como fosfatasas de lípidos fosfatados LPPs (del inglés Lipid Phosphate Phosphatases) (tabla 1).

Tabla 1

Fosfatasas de ácido fosfatídico y fosfatasas de lípidos fosfatados

Clase	Sustrato	Propiedades catalíticas	Localización subcelular
Tipo 1	PA	dependientes de Mg^{2+} , sensibles a NEM	proteínas de membrana solubles o extrínsecas
Tipo2 LPPs, SPP1, glucoproteínas de 35 kDa	PA, LPA, S1P, C1P, DGPP	independientes de Mg^{2+} , insensibles a NEM	proteínas integrales de membrana, membrana plasmática, caveolas, RE, Golgi

(Modificado de Sciorra & Morris, 2002)

La identificación de las LPPs en membranas celulares dio lugar a la hipótesis de que están involucradas en la señalización celular (Brindley et al., 1996). Esta participación en señalización celular se ha relacionado con un sitio de acción intracelular para desfosforilar PA, el cual es un mediador intracelular formado por la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) catalizada por fosfolipasa D (PLD). El PA generado de esta manera actúa sobre proteínas cinasa, fosfolipasa C, algunas proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto y la vía de Ras, Raf y Map cinasas. Las LPPs pueden entonces atenuar la señalización de PA al producir DAG, el cual puede activar a PKC (Morris et al., 1996).

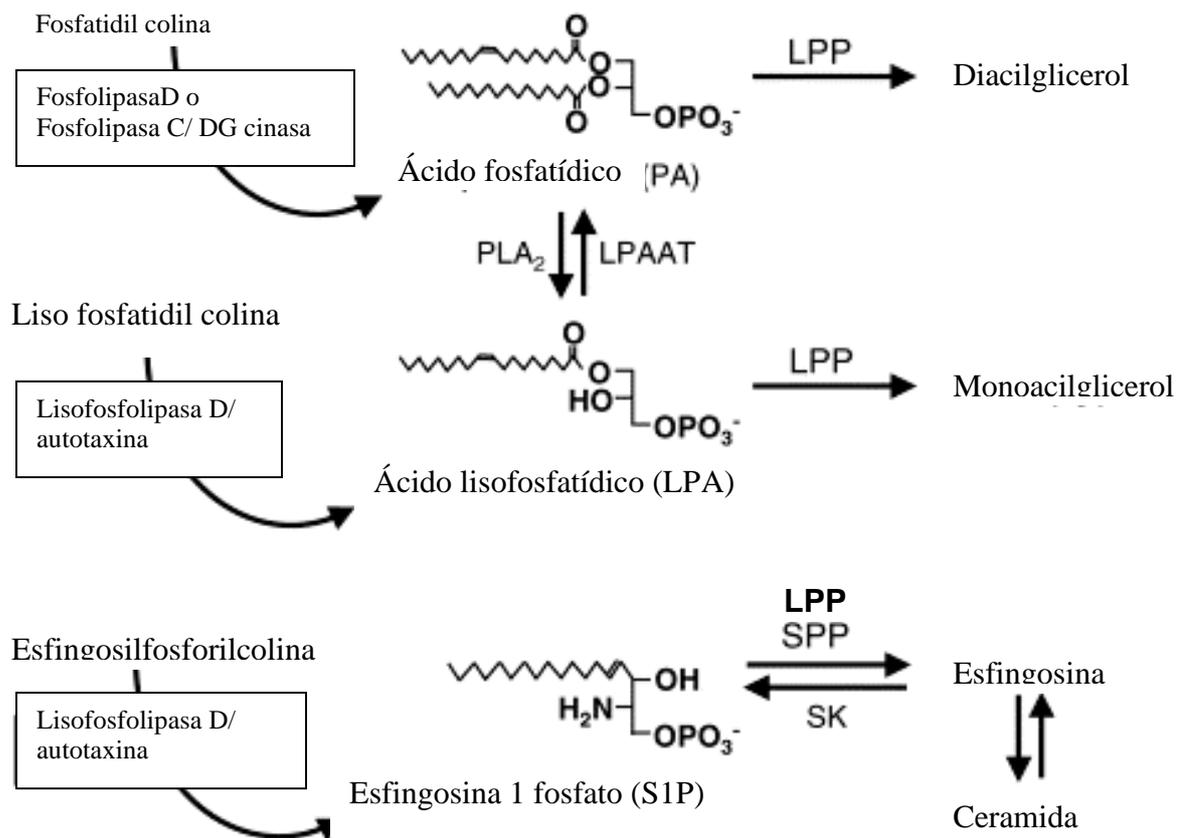


Fig. 1 Desfosforilación de PA, LPA y S1P por LPPs y de S1P por SPP (modificado Pyne et al., 2004).

Las LPPs además pueden actuar como ecto-enzimas ya que regulan la señalización provocada por LPA y S1P exógenos, los cuales pueden secretarse de manera autócrina o parácrina (Brindley et al., 1998).

Por ejemplo, una actividad de ecto-enzima la realiza el producto del gen *wunen*, homólogo de las LPPs en *Drosophila*, las cuales generan señales para dirigir las células germinales hacia el mesodermo (Zhang et al. 1997). Precisamente la participación de las LPPs en señalización está apoyada por las propiedades de otros homólogos.

Se han identificado 3 LPPs en mamíferos y han sido denominadas LPP1, LPP2 y LPP3. Estas tres isoenzimas muestran diferencias marcadas en su actividad biológica y al estudiarlas en un contexto fisiológico (Burnett & Howard, 2003).

Las LPPs tienen 6 dominios transmembranales y se encuentran en membrana plasmática. LPP1 y LPP3 se han encontrado también en las caveolas, que son dominios

de la membrana resistentes a detergentes, lo cual puede indicar que es una manera de compartimentalizar a la LPP3 con los receptores de LPA o S1P o con enzimas señalizadoras de lípidos, como la fosfolipasa D que también se encuentran en caveolas (Long et al., 2005). LPP3 se ha encontrado además en organelos intracelulares como lo son el retículo endoplásmico y el Aparato de Golgi, pudiendo variar esta localización dependiendo del tipo celular (Sciorra & Morris, 1999). Se ha observado también que la localización diferencial subcelular de LPP3 en fibroblastos sugiere que la enzima puede realizar distintas funciones en diferentes compartimentos subcelulares (Sciorra & Morris, 2002).

Los sustratos de LPP3 incluyen al LPA, S1P, C1P y PA, teniendo más afinidad por PA y LPA (Kai et al., 1996). LPP3 puede desfosforilar SIP y LPA extracelulares, limitando su disponibilidad en sus receptores acoplados a proteínas G y reduciendo, de esta manera, sus efectos biológicos que incluyen proliferación/ supervivencia, apoptosis, diferenciación y migración.

LPP3 está orientada con los extremos amino (N-) y carboxilo (C-) del mismo lado de la membrana en la cara citoplasmática. El segundo y tercer loop extramembranal contienen tres dominios de residuos de aminoácidos, los cuales se encuentran altamente conservados en las LPPs, que definen su sitio activo (Fig.2). Además LPP3 tiene un sitio conservado de glucosilación (el cual implica que esta región tiene acceso al lumen del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi) (Zhang et al., 2000). Se ha demostrado también que LPP3 se localiza en el área basolateral de las membranas plasmáticas en células polarizadas MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Jia et al., 2003). Otras particularidades de LPP3 son que la LPP3 humana está involucrada en interacciones célula-célula a través de su secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), la cual está localizada en el

segundo loop extracelular (Humtsoe et al., 2003). Esta función parece ser independiente de su actividad catalítica.

Las LPPs contienen algunos sitios de fosforilación que pudieran estar controlando sus actividades (Waggoner et.al, 1999). Una regulación a largo plazo de la actividad de LPP3 ha mostrado que el mRNA para LPP3 se incrementa alrededor de tres veces después de tratar a células HeLa con EGF (factor de crecimiento endotelial) (Kai et al., 1997). También se sabe que la expresión de Dri42 (el homólogo de LPP3 en rata) en la mucosa intestinal de la rata aumenta durante la diferenciación epitelial (Barilá et al., 1996). Todo esto indica que existe una regulación diferencial de LPP3.

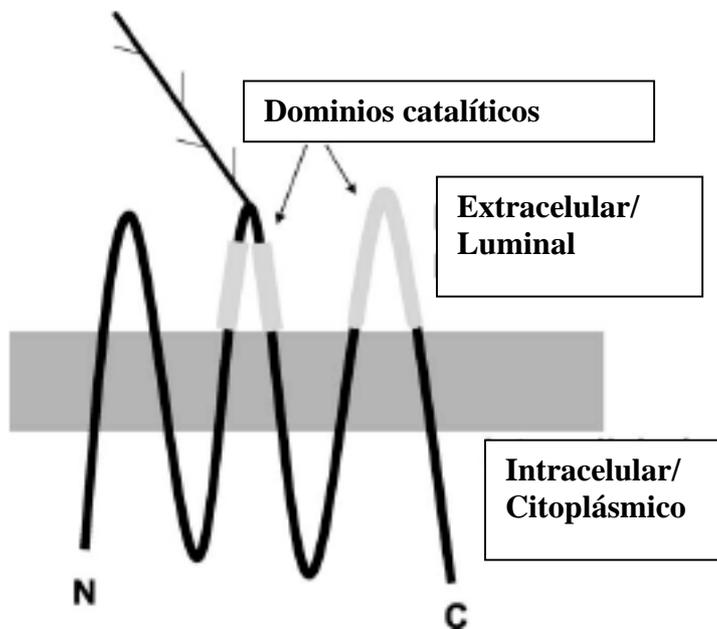
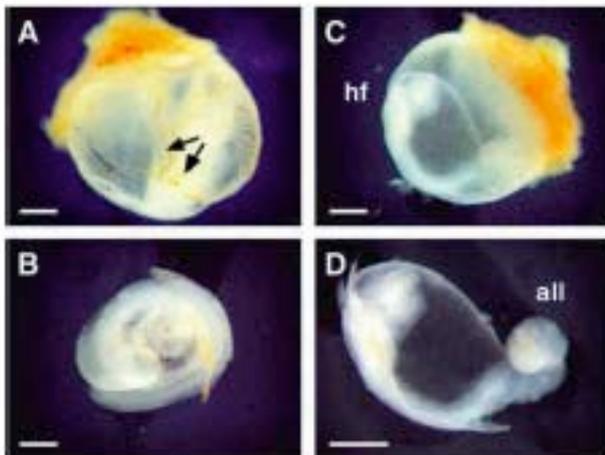


Fig.2 Topología y secuencias primarias de LPP3 (Sciorra & Morris, 2002).

Durante el desarrollo embrionario LPP3 muestra un patrón de expresión dinámico y altamente específico en algunos tejidos en comparación con LPP1 y LPP2. La pérdida de expresión de LPP2 no tiene efectos identificables en el desarrollo del ratón, supervivencia o fertilidad (Zhang et al., 2000). En cambio, la deficiencia de LPP3 es letal en etapas embrionarias (esto se logró mediante una inactivación dirigida del gen) y provoca que los embriones no se desarrollen más allá de los 8.5 a 10.5 días de gestación

(Escalante-Alcalde et al., 2003). Al analizar el papel de LPP3 en el desarrollo se demostró que la enzima es esencial para el desarrollo de la vasculatura del alantoides, del saco vitelino y de la placenta. Los embriones no pueden establecer la conexión entre el corion y el alantoides, por lo cual no se forma correctamente la placenta. En cuanto a la vascularización del saco vitelino, las células endoteliales no forman un plexo vascular correctamente organizado. Además estos embriones presentan un retraso general en el desarrollo (Fig. 3). En algunos casos se presentó otro fenotipo sumado al descrito arriba que constó de defectos en la formación de los ejes embrionarios, como lo son un eje antero-posterior acortado, truncación anterior, desarrollo embrionario fuera del saco vitelino, así como la duplicación de estructuras axiales incluyendo a la notocorda. Estos resultados revelaron que la enzima está participando de alguna manera en la regulación de la vía de señalización de los Wnt. Además LPP3 regula la activación de β -catenina mediante una función independiente a su actividad de fosfatasa (Escalante-Alcalde et al., 2003).

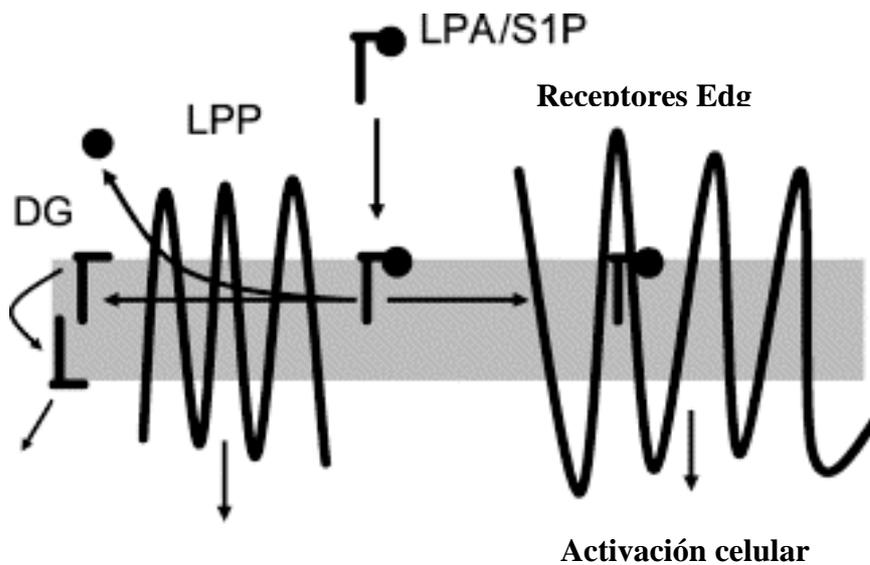


(Escalante-Alcalde et. al., 2003)

Fig.3 (A,B) E9.5 silvestres, (C,D) E9.5 LPP3 $-/-$. Los embriones LPP3 $-/-$ son más pequeños y presentan un retraso en el desarrollo, el alantoides (all) también presenta un desarrollo anormal y presentan una vascularización deficiente en el saco vitelino.

1.2 Regulación de Procesos celulares

Al analizar los niveles de los fosfolípidos en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), los mutantes para LPP3 presentaron una reducción en los niveles de DAG y un aumento en los niveles de PA intracelulares, así como un aumento del LPA extracelular (Escalante-Alcalde et al., 2003). Esto significa que el metabolismo normal de los lisofosfolípidos está alterado, ya que la relación de lípidos bioactivos fosforilados a desfosforilados se modificó. Esto es muy relevante ya que estos lípidos al participar en la regulación de la proliferación celular, apoptosis, migración, angiogénesis, organización del citoesqueleto, supervivencia y ciclo celular permiten una embriogénesis exitosa y contribuyen a un desarrollo normal en los animales y un desbalance en los niveles de éstos puede ocasionar los defectos observados. S1P y LPA regulan todos estos procesos a través de sus receptores, los cuales están acoplados a proteínas G y que pertenecen a la familia de los Edgs (endothelial differentiation genes). Éstos a su vez pueden actuar sobre diversos blancos como adenilato ciclasas, Ras, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfolipasa C (PLC), C-Src tirosina cinasa, Rac, Rho y fosfolipasa D. La capacidad de LPP3 de regular los niveles de LPA y S1P incide sobre la activación de estos blancos y de activar a su vez distintas vías de señalización (Fig. 4). Por ejemplo, LPP3 al regular los niveles intracelulares de PA puede determinar el status apoptótico de las células y activar la vía de p42/p44 MAPK, la cual es crítica para la supervivencia celular (Long et al., 2005).



**Inhibición de la
señalización de Edg**

(Sciorra & Morris, 2002)

Fig. 4 El papel de LPP3 en la regulación de la señalización inter e intracelular.

El LPA y la S1P están presentes en la circulación sistémica en concentraciones nanomolares altas o micromolares bajas y son sintetizadas y liberadas *in vitro* por plaquetas, adipocitos y fibroblastos (Eichholtz et al., 1993). El LPA además estimula la proliferación de manera autócrina y parácrina mediante la secreción del factor de crecimiento transformante α . Existe cada vez más evidencia que sugiere que S1P también tiene efectos endócrinos importantes (Pyne & Pyne, 2000). También hay evidencia que indica que LPA y S1P promueven la supervivencia en fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T, células de Schwann y macrófagos. En fibroblastos, LPA y S1P ejercen sus efectos antiapoptóticos activando la vía de p42/p44 MAPK (Grey et al., 2002) (fig.5). S1P activa otras vías de señalización como la movilización de calcio intracelular y la formación de fibras de estrés de actina (Pyne & Pyne, 2000). El PA también es un regulador importante de la señalización intracelular, ya que incrementa la concentración de Ras-GTP, lo cual incrementa la activación de MAPK y la división celular (Brindley & Waggoner, 1996). La C1P es el esfingolípido análogo al

PA y juega un papel importante en el transporte de vesículas. Además de actuar intracelularmente, C1P también estimula la división celular cuando se agrega externamente a las células (Gomez-Muñoz et al., 1995).

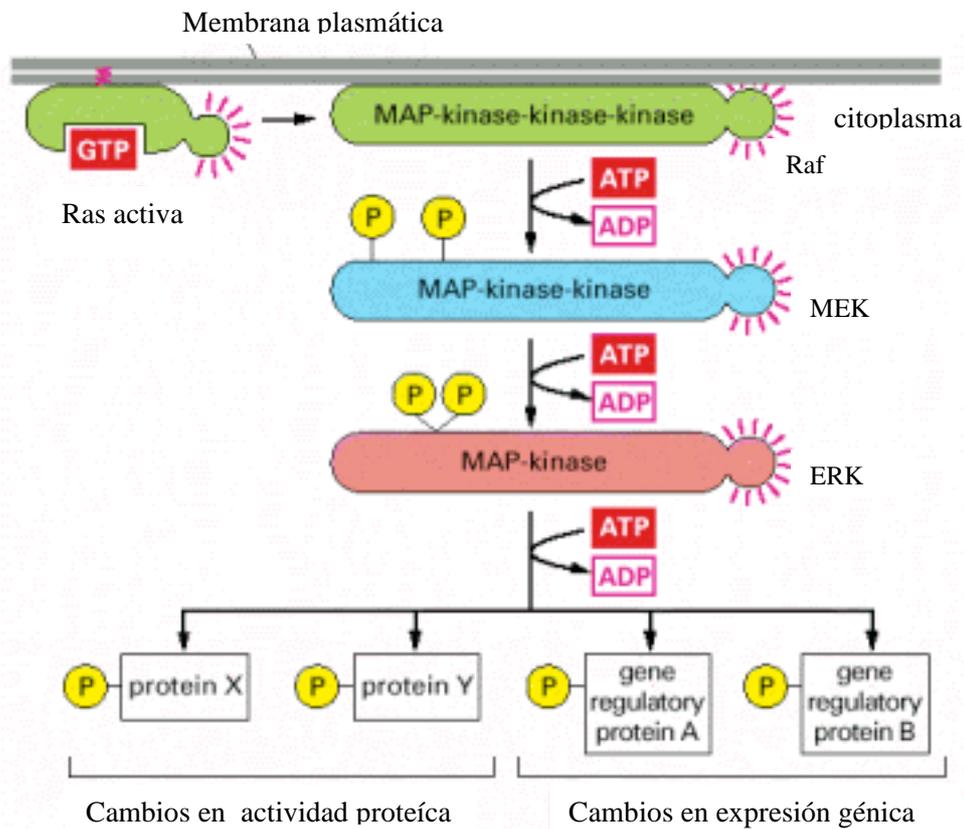


Fig.5 Activación de MAPK La estimulación de los receptores lleva a la activación de Ras. Ras a su vez, activa a MAP cinasa-cinasa-cinasa, llamada Raf, la cual fosforila y activa a MAP cinasa-cinasa MEK, una proteín cinasa que activa a MAP- cinasa (ERK) mediante la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina. ERK entonces fosforila a una variedad de proteínas nucleares y citoplásmicas, ejerciendo efectos en proliferación , diferenciación, supervivencia y ciclo celular (Alberts et al., 2002).

1.3 El LPA y el ciclo celular

Los mitógenos estimulan la división celular al liberar controles negativos intracelulares que normalmente bloquean el progreso a través del ciclo celular y generalmente los podemos encontrar en el suero como factores de crecimiento.

LPA actúa como un factor de crecimiento extracelular al activar los receptores acoplados a proteínas G como lo son ciertos G_i , G_q y $G_{12/13}$ y ejerce una fuerte actividad mitogénica al activarse $G\alpha_{12}$, estimular intercambio entre GDP/GTP y promover la activación de cinasas que inducen la proliferación celular (Radhika et al., 2005). Los mitógenos como el LPA controlan la tasa de división celular al actuar en la fase G1 del ciclo celular, permitiendo la progresión del ciclo hacia la fase S (fase de síntesis). Durante G1 muchos mecanismos actúan para suprimir la actividad de Cdk (cinasas dependientes de ciclina) y bloqueando la entrada a la fase S (fig.6). Los mitógenos actúan para permitir la activación de Cdk, al unirse a los receptores de membrana celular e iniciar un conjunto complejo de señales intracelulares (Alberts et al., 2002).

Uno de los primeros pasos en la señalización mitogénica es la activación de la GTPasa Ras, la cual lleva a la activación de la cascada de MAPK (fig.5). Esto lleva a que se aumenten los niveles de la proteína reguladora Myc que a su vez, promueve la entrada al ciclo celular mediante varios mecanismos que se sobrelapan (fig. 7).

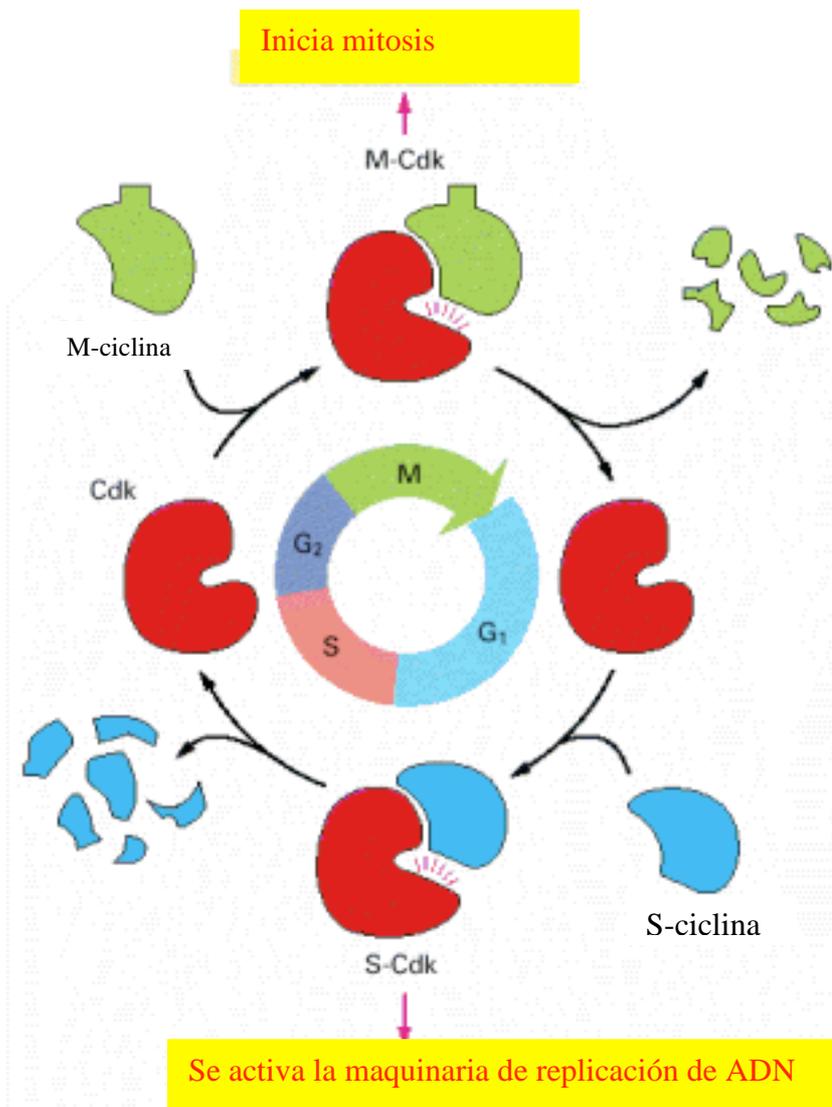


Fig.6 Ciclo celular y su sistema de control. Cdk se asocia con diferentes ciclinas para permitir los diferentes eventos del ciclo. Las Cdks se activan cuando las ciclinas se unen a éstas, permitiendo que el ciclo celular avance a la siguiente fase (Alberts et al.,2002).

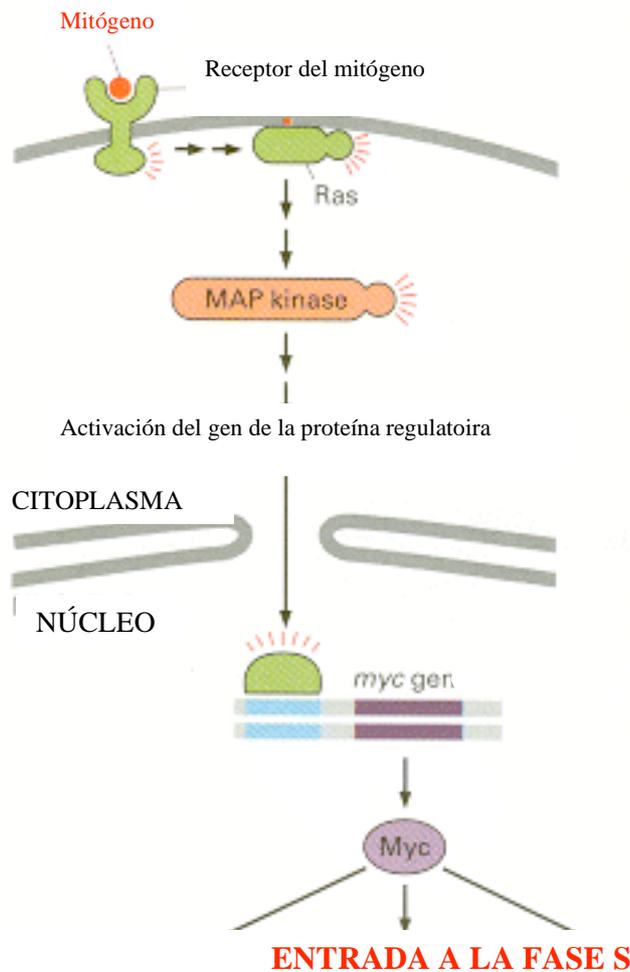


Fig.7 Modelo simplificado de la manera en la que los mitógenos estimulan la división celular. Al unirse al receptor, los mitógenos provocan la activación de las cascadas de Ras y MAPK. Un efecto de esta vía es el aumento en la producción del gen de la proteína reguladora Myc. Myc incrementa la transcripción de diversos genes. El resultado final es el aumento en la transcripción de genes requeridos para entrar a la fase S (Alberts et al.,2002).

1.4 Apoptosis

Existen procesos fundamentales como lo son el crecimiento celular, la división celular y la muerte celular y cada uno se regula mediante programas tanto intracelulares como extracelulares mediante señalización. Una de estas señales puede darse mediante los factores de sobrevivencia, los cuales suprimen la apoptosis.

Como ya se mencionó antes, LPA, S1P y C1P pueden actuar como factores de sobrevivencia; una simplificación de cómo podrían estar actuando se muestra en la figura 8. Se sabe que LPA protege contra la apoptosis en bastantes tipos celulares, como lo son los fibroblastos, osteoblastos, hepatocitos, células de Schwann, macrófagos, células renales tubulares, células de cáncer de ovario, células epiteliales intestinales, entre otras. El mecanismo principal de señalización que parece estar involucrado en esta protección incluye a Gi, PI3K y Akt. Además de que las vías a través de ERK pueden tener funciones protectoras contra la apoptosis también.

La protección contra apoptosis por SIP, como por LPA, está mediada principalmente a través de la señalización de PI3K/Akt a través de Gi (Radeff-Huang et al., 2004).

A su vez, se ha descrito un papel importante para LPP2 y LPP3 en la regulación de pozas intracelulares de PA y S1P respectivamente, lo cual puede determinar el estatus apoptótico de células que han sido sujetas a estrés celular. Esto regula la habilidad de LPA/S1P exógenos para activar la vía de MAPK, la cual es crítica para la sobrevivencia. La remoción de S1P intracelular por LPP3 y PA intracelular por LPP2 es consistente con una acción pro-apoptótica de las enzimas que parece ser dependiente de la ausencia del suero (Long et al., 2005).

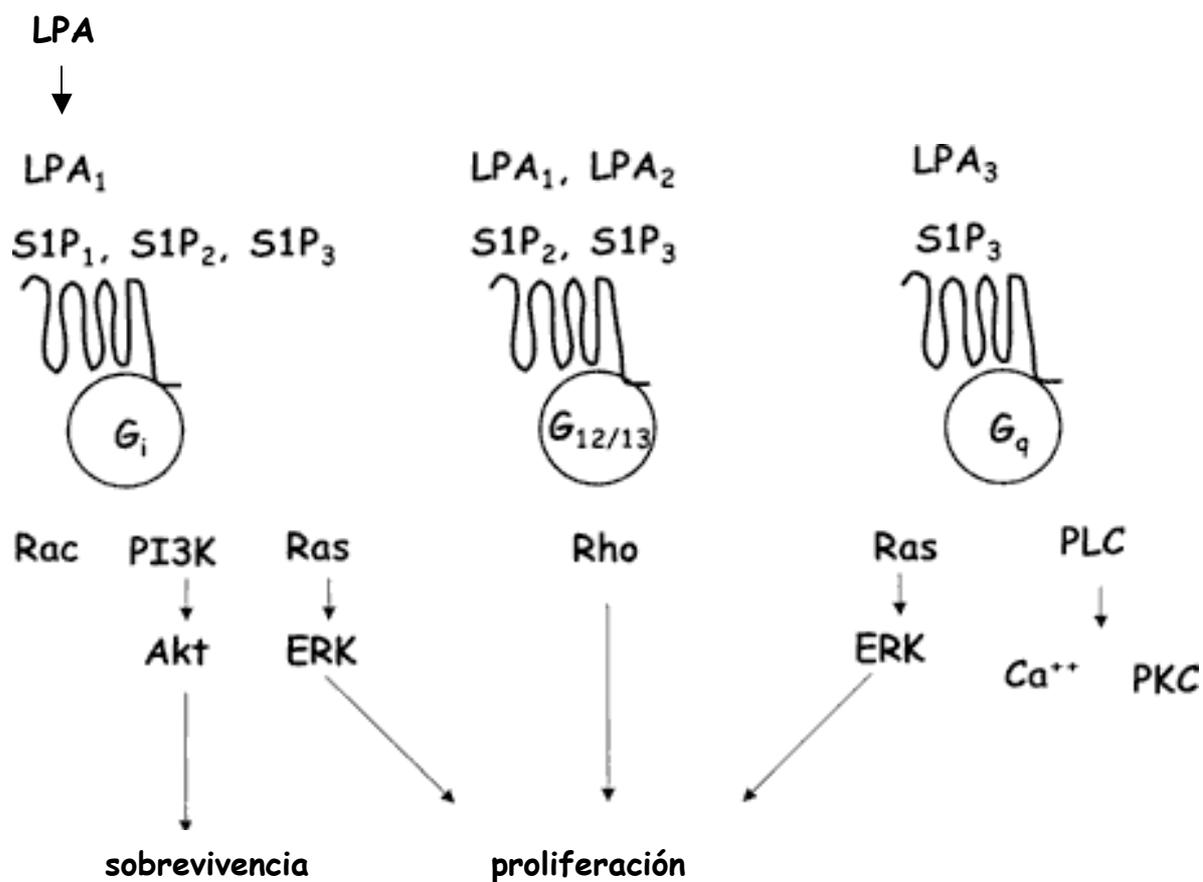


Fig.8 Modelo propuesto de la regulación de la supervivencia mediada por LPA y S1P. Los receptores de LPA y S1P pueden acoplarse a G_i, mediando una señal a través de PI3K/Akt para promover la supervivencia (Radeff-Huang et al., 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mutación nula de LPP3 puede estar afectando diversos procesos celulares como la apoptosis y el control del ciclo celular. Para caracterizar cómo están afectados estos procesos se necesitan estudiar las propiedades de crecimiento, senescencia, apoptosis y ciclo celular in vitro e in situ en embriones deficientes en LPP3.

3. HIPÓTESIS:

La LPP3 juega un papel clave en la regulación de la conducta proliferativa y de muerte celular, por lo tanto la mutación nula de LPP3 estará aumentando la conducta proliferativa y modificando la muerte celular y el ciclo celular en fibroblastos y embriones.

4. OBJETIVOS:

- Estudiar los procesos celulares afectados por la deficiencia de LPP3.
 - Analizar y comparar diferencias en las curvas de crecimiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) mutantes (deficientes en LPP3) y silvestres.
 - Comparar la apoptosis entre fibroblastos MEFs mutantes y silvestres.
 - Comparar el ciclo celular entre MEFs mutantes y silvestres y analizar diferencias entre la distribución de fases del ciclo y su duración.
 - Estudiar la proliferación y viabilidad celular en embriones deficientes en LPP3 y compararlos con los silvestres.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, MEDIOS Y REACTIVOS:

Cajas de cultivo CORNING :

Cajas de cultivo estériles 150 mm x 25 mm

Cajas de cultivo estériles 100 mm x 20 mm

Cajas de cultivo de 12 pozos

Preparación medio D10:

-DMEM Gibco alta glucosa sin glutamina 500 ml (botella) (cat. 11960-044)

se retiran 50 ml de medio y se agrega:

-glutamina 200 mM.....5ml (Gibco cat.35050-061)

-β mercaptoetanol (βME) 100 mM.....500μl

-penicilina-estreptomina.....2.5 ml (Gibco cat. 15140-122)

-SBF..... 50 ml (Gibco cat. 12318-028)

-piruvato 100X.....5 ml (Gibco cat. 11360-070)

-Aminoácidos no esenciales.....5ml (Gibco cat. 35050-061)

-βME 100mM stock 1000x

70 μl de βME en 10 ml PBS y se esterilizan por filtración.

Tripsina Gibco (00365)

(0.25% tripsina, EDTA 4 Na)

PBS 10x cultivo pH 7.2

1 lt.

NaCl 80 gr.

KCl 2 gr.

Na ₂ HPO ₄	14.4 gr.
KH ₂ PO ₄	2.4 gr.

Paraformaldehído al 4%

Se pesan los 4 gr del paraformaldehído y se afora a 100 ml de PBS 1X. Esto se calienta y cuando se disuelve está como a 60°C. El PBS debe de estar a ph 7.4 por lo que el formaldehído debe de quedar al mismo ph.

Descongelar fibroblastos:

1. Descongelar vial con células a 37°C.
2. Resuspender células en 6 ml D10 y mezclar por inmersión.
3. Centrifugar 5 min a 1000 rpm.
4. Resuspender pellet con 2 ml D10 y sembrar en cajas de cultivo (2 cajas por vial)(hacerlo suavemente).

Pasar fibroblastos:

1. Quitar medio mediante bomba de vacío.
2. Lavar con 4 ml PBS y aspirar mediante bomba de vacío.
3. Despegar fibroblastos agregando 1 ml de tripsina e incubar 1 min a 37°C.
4. Resuspender muy bien con 3 ml de medio con suero (medio D10).
5. Contar en el hemocitómetro y hacer cálculos para saber cuántos fibroblastos se quieren pasar a la siguiente caja.
6. Sembrar el número celular deseado para tener en total 10 ml de medio D10 para cajas de cultivo de 100 mm X 25 mm y 25 ml de medio para las cajas de 150 mm.

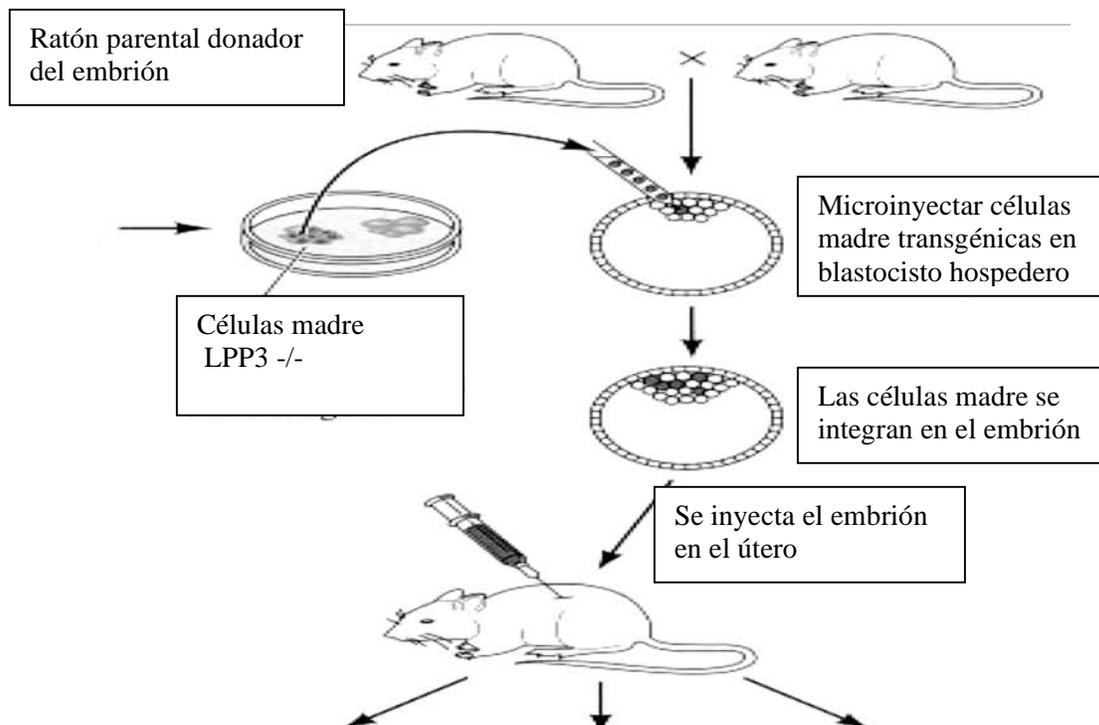
MEFs (fibroblastos embrionarios de ratón) WT y LPP3 -/-:

La Dra. Diana Escalante obtuvo fibroblastos primarios embrionarios de ratón (PMEFs) silvestres y mutantes de la siguiente manera:

- Se inyectan células madre LPP3^{-/-} que portan el cassette PgkNeo (expresan constitutivamente el gen Neo^r), en blastocistos de ratón silvestres. Los embriones quiméricos obtenidos se sacrifican a los 13 dg, de éstos se derivan los fibroblastos primarios embrionarios murinos (PMEFs).
- Los fibroblastos se derivan al explantar y cultivar embriones quiméricos de 13 días después de remover la cabeza y los órganos internos. Se seleccionan las células LPP3^{-/-} por ser resistentes a G418, mientras que las células silvestres mueren (ver diagrama de flujo 1).

Una vez obtenidos estos fibroblastos, se inmortalizaron ya que los PMEFs ^{-/-} mueren con demasiada facilidad, lo que no permite trabajar con ellos fácilmente. Para inmortalizar los PMEFs fueron transducidos con un retrovirus que expresa el oncogen E1A. Como control se inmortalizaron PMEFs silvestres de la misma manera que las células ^{-/-}. En adelante se les denominó MEFs porque ya no corresponden a cultivos primarios.

Diagrama de flujo 1:



Obtención de fibroblastos primarios embrionarios de ratón (PMEFs)

5.2 CURVAS DE CRECIMIENTO:

5.2.1 Cultivo Celular:

Se tienen fibroblastos confluentes en una caja de 100 mm.

1. Se quita el medio mediante bomba de vacío.
2. Se lavan las células con 4 ml de PBS 1x y se aspira el PBS.
3. Se agrega 1ml de tripsina (0.25 %) y se incuban 1 min a 37°C.
4. Se agregan 3 ml de medio D10 con suero, se resuspende muy bien, las células tienen que quedar bien disgregadas.
5. Se toman 20 µl y se cuentan en el hemocitómetro.

5.2.2 Conteo:

1. Se llena el hemocitómetro o cámara de Neubauer.
2. Se cuentan los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cuadrícula del hemocitómetro.
3. Ese número se divide entre 4.
4. Si se hizo alguna dilución antes de contar se multiplica por el factor de dilución.
5. Multiplicar por 10 000 (debido a la conversión de 0.1mm³ hacia ml).
6. Este resultado se multiplica por el volumen celular (que son los ml en los cuales se encuentran resuspendidas las células).
7. El resultado es el número de células en total que tenemos en nuestro volumen.
8. Se hace una regla de tres para convertir el número de células que queremos sembrar en microlitros.

Fórmula:

Volumen celular X factor de dilución X (células contadas/números de cuadrantes contados)
X 10 000

5.2.3 Siembra

1. Se siembran 2 cajas de 12 pozos cada una con 2 ml de medio D10 y 10 000 células por pozo.
2. Se siembran 2 cajas para los fibroblastos WT y 2 cajas para los LPP3 -/-.
3. Se mezclan bien para que no queden todas las células acumuladas en un punto.
4. Las 4 cajas se incuban a 37°C y con 5% de CO₂.

5.2.4 Conteo

Se cuentan las células de 3 pozos WT y 3 pozos LPP3 -/- cada 24 h de la siguiente manera:

1. Aspirar medio con la bomba de vacío.
2. Lavar con 800 µl de PBS 1X.
3. Aspirar PBS con la bomba de vacío.
4. Agregar 200 µl de tripsina (0.25 %) a cada pozo.
5. Incubar por 1 min.
6. Inactivar la tripsina con 800 µl de medio D10.
7. Resuspender muy bien.
8. Contar las células como se describió anteriormente.
9. Se tendrán 3 conteos para WT y 3 para LPP3 -/-, los cuales se promedian y ese promedio se grafica.

Esto se repite cada 24 h hasta que concluya el experimento, se hace con 2 cajas para WT y 2 cajas para las LPP3-/-.

Se realizaron 3 repeticiones del mismo experimento.

Para la curva de crecimiento LPP3 -/- triple vs WT se prosiguió de la misma manera excepto que en vez de sembrarse 10 000 células por pozo iniciales se sembraron 300 000 células por pozo para WT y 900 000 para LPP3 -/-.

5.3 Determinación del área que ocupan los MEFs WT vs LPP3-/-

Se utilizó el programa “Image J”, el cual es un programa que procesa y analiza imágenes.

Este programa se puede descargar en la siguiente dirección de internet:

<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>imágenes.

Se trabajó con imágenes tomadas al mismo aumento de fibroblastos mutantes y silvestres sembrados a la misma densidad y durante el mismo tiempo. Se escogieron 10 células al azar y a cada una se les midió el área con la opción de “measure”. Con base en estas medidas se obtuvo el área promedio.

5.4 Determinación de la duración del ciclo celular usando células marcadas con BrdU

(se usa el kit #1296 736 de Roche: 5-Bromo2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit 1)

1. Se toma una caja de 150 mm confluyente de la línea celular de interés y se siembran cajas dependiendo del número de muestras que se quiera tener y del tiempo (ej: 10 h, midiendo cada h, se usan 10 cajas, o 10 h midiendo cada 2 h se usan 5 cajas) más 3 cajas que serán los controles. Cada caja debe tener 1×10^6 células con 10 ml de medio D10 adheridas para el siguiente día. Las células se dejan adherir toda la noche.
2. En la mañana siguiente se reduce el volumen del medio de cada caja a 5 ml (no cambiar el medio, solo reducirlo). Después se añade el “BrdU labeling reagent” 1:1000 (5 μ l) a todas las cajas menos a una (se debe de mezclar bien con el medio). Todas estas manipulaciones deben de hacerse rápidamente, manteniendo a las células tibias.
3. Se re-incuban las células por 30 min.

4. Inmediatamente se lavan las células con 10 ml de medio D10 pre-incubado y se regresan a la incubadora.
5. Se toman 2 cajas marcadas con BdrU y se les asignan las etiquetas “30 min BdrU” y “30 min BdrU-PI” y a la caja sin marcar con BrdU se le asigna la etiqueta “30 min PI”.

5.4.1 Colectar las células

1. Aspirar el medio.
2. Lavar las células 2 veces con 10 ml de la solución de lavado (PBS 1x).
3. Tripsinizar en 1 ml de tripsina, incubar 1 min.
4. Agregar a las células tripsinizadas 3 ml de medio.
5. Centrifugar por 1200 rpm, 5 min a 4°C.
6. Lavar las células una vez en solución de lavado, drenar pellets.
7. Fijar las células resuspendiendo con cuidado en 1 ml de EtOH al 70% (en buffer de glicina a pH 2.0 y 50 mM).
8. Incubar toda la noche (ON) a 4°C (las células fijadas se pueden almacenar hasta un mes).
9. Colectar las cajas como se indica arriba después de cada h o cada 2 h contando desde que se marca con BrdU, y asignando etiquetas 1h BrdU-PI, etc.

5.4.2 Detección de BrdU

1. Centrifugar las células fijadas en etanol-glicina a 900 rpm.
2. Lavar las células fijadas CON MUCHO CUIDADO 1 vez, con 1ml de solución de lavado fría (lavar las células es muy difícil, los pellets se pierden fácilmente).
3. Centrifugar a 900 rpm durante 5 min.
4. Retirar la solución de lavado (PBS) suavemente, con pipeta porque si no se va el pellet.
5. Agregar HCl 2N durante 30 min.

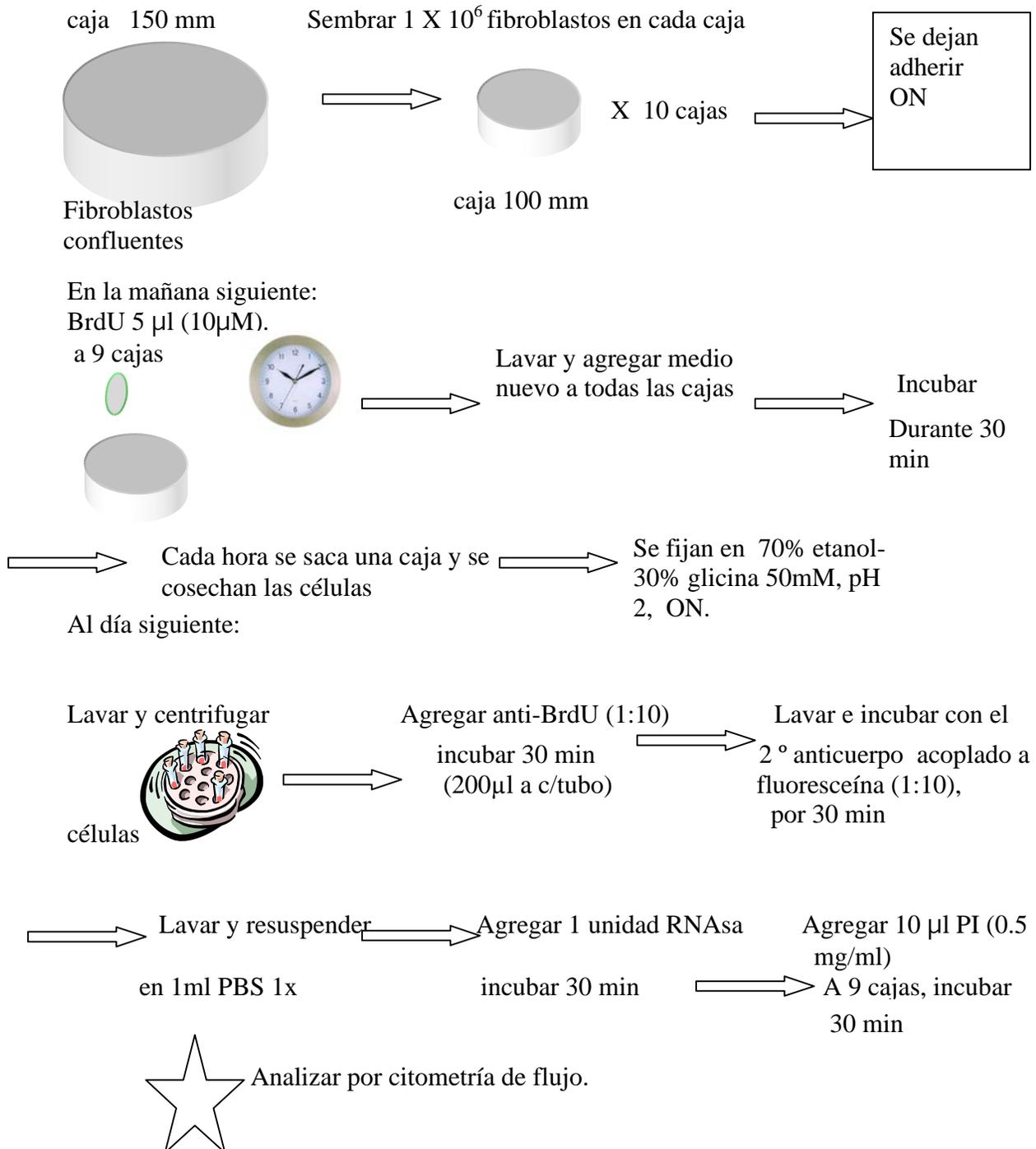
6. Lavar las células en 0.5% BSA y PBS.
7. Añadir 300 μ l ó 200 μ l de la solución con el anticuerpo primario (anti-BrdU) a cada tubo menos al “30 min PI” y resuspender.
8. Incubar los tubos a 37°C en baño de agua, por 30 min.
9. Centrifugar 5min 900 rpm (ó 1200 rpm máximo).
10. Lavar las células 1 vez con 1 ml de solución de lavado.
11. Centrifugar 5 min 900 rpm (ó 1200 rpm máximo).
12. Incubar con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína (300 μ l ó 200 μ l) a 37°C en baño de agua , durante 30 min, es importante tapar de la luz.
13. Centrifugar 5min a 900 rpm (ó 1200 rpm máximo).
14. Lavar las células 1 vez con 1 ml de solución de lavado.
15. Resuspender las células en 1 ml de PBS 1x (es importante que no queden agregados).
16. Añadir 2 μ l de RNAsa libre de DNAsa (una unidad) a cada muestra y mezclar. Incubar a 37°C durante 30 min.
17. Añadir 10 μ l de Yoduro de propidio (PI) (0.5 mg/ml) a todas las muestras excepto a la muestra “30 min BrdU”.
18. Después de 30 min de incubación a 37°C, analizar las células mediante citometría de flujo. Leer PI en FL-2 y BrdU en FL-1. Es importante analizarlas ese mismo día.

5.4.3 Lectura en el citómetro de flujo: (Citómetro Becton-Dickinson)

1. Escoger los parámetros FI-1 y FI-2. FI-1 se mide en escala lineal y FI-2 en escala logarítmica.
2. Escoger la opción de FI-2A para los histogramas de FI-2.
3. Marcar una ventana que solo lea las células que nos interesan, descartando el llamado “debris”. Se marca la región de interés y después se escoge la opción G4 = R4 para que al leer los eventos solo considere esas células.
4. Leer 10 000 eventos (células).
5. Abrir una ventana que muestre el histograma de FL-1 y otra que grafique FL-1 vs FL-2.

6. FL-1 equivale a la lectura de fluoresceína (FITC) y FL-2 a la de PI.
7. Los datos se analizan con el programa "Flow JO". Este programa se encuentra disponible para descargar en la red y permite analizar datos obtenidos en el citómetro de flujo.

5.4.4 Diagrama de flujo para determinar la duración del ciclo celular:



Variación para el segundo experimento:

Al realizar un segundo experimento (Fig. 20) se prosiguió de la siguiente manera:

Se empezó con MEFs en una caja de 150 mm y se dejaron hasta que llegaron a 80% de confluencia (ya que no pueden estar al 100% si se les va a quitar el suero porque se mueren). Una vez al 80% de confluencia en caja de 150 mm, se les retiró el suero y se dejaron durante 8 h sin suero, después de estas 8 h se contaron las células y se pasaron 1 millón de células a cajas de 100 mm. con 10 ml de D10 (que lleva suero). Los MEFs se dejaron adherir ON, al día siguiente se empezó el experimento y se siguió el protocolo normal. Los MEFs no se sincronizaron completamente porque si se liberaban al ciclo celular al momento de empezar el experimento no se podría marcar la fase S con BrdU, ya que al liberar al ciclo todas las células estarían en G₀, G₁.

5.5 Sincronización de células:

Se deben de tener fibroblastos adheridos pero como a un 80% de confluencia antes de sincronizar porque si no se mueren. Se prepara previamente medio que tenga todo lo que se le pondría al medio D10 excepto suero. Se aspira el medio que tienen los fibroblastos y se reemplaza por éste. Se dejan con ese medio sin suero de 17 h a 24 h. Para liberar al ciclo, se vuelve a cambiar el medio sin suero por medio D10.

5.6 Detección de apoptosis

5.6.1 Principios de la reacción de TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling)

Durante la apoptosis o muerte celular programada el ADN genómico se corta, creando fragmentos de bajo peso molecular y de doble cadena y también cortes en una sola cadena (los llamados “nicks” en inglés) en ADN de alto peso molecular. Aprovechando este

proceso, la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) puede agregar nucleótidos marcados (con fluoresceína en este caso) a los extremos 3'-OH libres del ADN fragmentado en una manera independiente del templado.

5.6.2 Protocolo (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, cat. No. 1 684 795, de Roche):

Se siembran el mismo número de fibroblastos WT y LPP3 -/- en una laminilla de 8 pozos y se dejan adherir y crecer ON (aproximadamente 12 h). El número inicial de células sembradas fue de 10×10^3 , 25×10^3 , 50×10^3 , 70×10^3 , 100×10^3 y 200×10^3 y se hicieron 3 repeticiones de este experimento.

i. Preparar primero:

- PBS
 - Paraformaldehído en PBS pH 7.4 al 4% preparado fresco (solución de fijación)
 - Solución de permeabilización: 0.1% de tritón en 0.1% de citrato de sodio, preparado fresco
1. Fijar muestras con la solución de fijación por 1 h a 15-25°C.
 2. Lavar con PBS.
 3. Incubar con la solución de permeabilización por 2 min en hielo (2 a 8°C).

ii. Después preparar:

DNasa a 1 μ l/ml en Tris-Hcl 1M, pH 7.5 y 1mg/ml de BSA.

1. Tomar 10 μ l del vial marcado como “Label solution” (proporcionado por el kit) para un control negativo y colocarlos en el vial 1.
2. Añadir el vial de “Enzyme solution” (proporcionado por el kit) al de “label solution” en una dilución 1:9 en otro vial (vial 2) para obtener la reacción TUNEL.

3. Mezclar bien.

iii. Controles:

Control negativo: Incubar las células fijadas y permeabilizadas con 50 µl de “Label solution” (vial 1).

Control positivo:

Incubar las células con la solución de DNasa 1 por 10 min a 25°C para inducir rompimiento de DNA.

iv. Marcado:

1. Lavar 2 veces con PBS.
2. Secar área alrededor de la muestra.
3. Agregar 10 µl de mezcla de reacción de TUNEL a cada muestra, y cubrirlas con “parafilm” o cubreobjetos durante la incubación.
4. Incubar en atmósfera húmeda por 60 min a 37°C en la oscuridad.
5. Lavar 3 veces con PBS.
6. Montar con glicerol-50% PBS.
7. Analizar con luz de excitación de 450-500 nm y detectar en el rango de 515-565 nm (luz verde) en un microscopio con fluorescencia.
8. Fotografíar.

5.7 Inmunohistoquímicas vs PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

PCNA es un marcador asociado al ciclo celular que actúa como co-factor para la DNA polimerasa delta en la fase S y también durante la síntesis asociada a daños en el mecanismo de reparación del DNA.

Para hacer la inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes kits:

- kit R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick kit de Vector (cat. No. PK-7800)
- Antigen Unmasking Solution de Vector cat.no. H-3300
- Avidin/Biotin Blocking Kit de Vector
- DAB Substate kit for peroxidase cat. No. SK-4100

El anticuerpo utilizado fue el anti-proliferating cell nuclear antigen de Vector cat.no. VP-P980

Se trabajó con cortes frontales de embriones de 6 somitas tanto WT como LPP3 -/- incluidos en parafina. A estos cortes se les hizo la inmunohistoquímica de la siguiente manera:

Protocolo:

1. Fundir parafina (calentar a 62°C)
2. Desparafinar:
 - 3 cambios, 5 min en xilol
 - 2 cambios, 5 min en etanol 100%
 - 2 cambios, 5 min etanol 95%
 - 2 cambios, 5 min etanol 80 %
 - rehidratar con agua destilada por 20 min
3. Presentación de antígenos: (Se usó el “Antigen Unmasking Solution” de Vector cat. No H-3300).
 - A 1600 ml de agua destilada agregar 15 ml de “Antigen Unmasking Solution” y verter en una olla express.
 - Cubrir sin cerrar la olla express y dejar hervir la solución (se calentó sobre una plancha caliente: hotplate/stirrer VWR).
 - Meter los cortes en una gradilla de vidrio para teñir y meter en la olla express asegurándose que los cortes se cubran totalmente con la solución, cerrar la olla express.

- Esperar a que suba la presión hasta que salga vapor de la olla express (se tarda algunos min en llegar hasta este punto de presión).
 - Contar un minuto y retirar la olla express del calor.
 - Enfriar bajo la llave del agua y abrir la olla hasta que no haya presión.
 - Poner cortes en agua de la llave por 5 min.
4. Pasar cortes a PBS por 5 min.
5. Permeabilizar: tritón-x-100 0.1% con 1% de citrato de sodio
- Preparar: 0.005 gr de citrato de sodio en 5 ml de PBS + 5µl de tritón-x-100.
- Los cortes se incuban con esta solución de permeabilización por 10 min.
6. Lavar en PBS por 3 min.
7. Bloquear la peroxidasa endógena:
- Agregar 1 ml de H₂O₂ al 30% a 9 ml de agua para que quede al 3%
- ó
- Preparar 40 ml de metanol con los 10 ml de H₂O₂ al 3%
8. Incubar cortes con esta solución de bloqueo en cámara húmeda por 30 min.
9. Lavar en PBS por 5 min.
10. Incubar cortes por 10 min en suero de bloqueo (del R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick kit) a temperatura ambiente (T.A.) y en cámara húmeda.
11. Bloquear la biotina endógena : (Se utilizó el Avidin/Biotin blocking kit)
- Incubar cortes en avidina por 15 min T.A.
 - Enjuague rápido en PBS
 - Incubar cortes en biotina 15 min a T.A.
 - Enjuague rápido en PBS.
12. Incubar con anticuerpo primario vs PCNA diluido 1:300 en PBS con 1.5% de suero de bloqueo. Para el control negativo solamente se incubó con PBS y 1.5% de suero de bloqueo. Se deja incubar por 2 h a T.A. en cámara húmeda. Se usan 300 µl de dilución para cubrir cada corte.
13. Lavar con PBS durante 5 min.
14. Incubar con anticuerpo secundario (proporcionado por el kit) por 10 min a T.A. en cámara húmeda.

15. Lavar 5 min con PBS.
16. Incubar con streptavidina-peroxidasa (incluido en el kit) por 5 min.
17. Lavar 5 min con PBS
18. Revelar con DAB (diaminobenzidina, del kit de vector):
 - Agregar 2 gotas de “Buffer stock solution” a 5 ml de agua destilada y mezclar bien
 - Agregar 4 gotas de la solución stock de DAB, mezclar bien
 - Agregar 2 gotas de la solución de peróxido de hidrógeno, mezclar bien
 - Dejar 6 min revelando en la oscuridad
 - Lavar en agua de la llave por 5 min
19. Dejar secar y deshidratar:
 - 2 min etanol 70%
 - 2 min etanol 80%
 - 2 min etanol 95% 2 cambios
 - 2 min etanol 100% 2 cambios
 - 5 min xilol
 - Montar con permount con cuidado de no producir burbujas.
20. Los cortes se observaron al microscopio óptico y se les tomaron fotos.

5.8 Tinción de rojo neutro para detectar apoptosis:

Tratar el tejido de la siguiente forma:

1. Lavar con PBS.
2. Diluir el rojo neutro en PBS hasta tener una solución de un rojo más tenue.
3. Incubar en rojo neutro entre 10 y 20 min a 37°C (monitorear la tinción hasta observar las células muertas), cuidar que no haya una tinción excesiva.
4. Lavar con PBS por 2 min, 2 cambios.
5. Fijar en formol cálcico toda la noche a 4°C (se puede dejar todo el fin de semana si es necesario).
6. Sumergir en isopropanol (2-propanol) a 4°C 1h, 2 cambios.
7. Aclarar en xilol a 4°C,
8. Fotografiar

9. Los embriones se pueden almacenar en glicerol-PBS 50%-50%.

Soluciones:

Rojo neutro 2 %: 2 g de rojo neutro en 100ml de PBS

Formol Cálxico: 100 ml de formol al 4% + 1 g de CaCl₂, pH 7.

5.9 TUNEL in situ para embriones de ratón

1. Disectar embriones de 8.5 días en PBS
2. Colocar un embrión por pozo en una placa de 24 pozos.
3. Fijar los embriones en paraformaldehído al 4 % en PBS por 2 h a 4°C.
4. Lavar tres veces en hielo con PBS con 0.1% de Tween-20 (PBT).
5. Almacenar los embriones en este punto transfiriéndolos a metanol al 100% y se guardan a -20°C.
6. Para continuar el proceso, los embriones se rehidratan pasando por metanol/PBT 75%, 50% y 25%.
7. Lavar los embriones 3 veces en PBT.
8. Tratar los embriones con 20 µg/ml de proteinasa K en PBT por 3 min a temperatura ambiente y con agitación.
9. Lavar 2 veces en PBT.
10. Fijar de nuevo en glutaraldehído al 0.2% y paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y con agitación.
11. Lavar 3 veces con PBT.
12. Pasar los embriones a tubos de 50 µl cada uno.
13. Preparar la mezcla de reacción de TUNEL (utilizando los reactivos proporcionados por el kit “In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, cat. No. 1684795, de Roche”) :
 - 31.5 µl de solución “label” más 3.5 µl de enzima, obteniendo 35 µl en total para 7 muestras, para utilizar 5 µl de reacción en cada una.
14. Un embrión se trata con 5 µl de Dnasa (DNasa 1 en Tris-Hcl 1M, pH 7.5 y 1mg/ml de BSA, usar una unidad de DNasa por cada ml) para que sirva de

control positivo. Se deja por 10 min a temperatura ambiente. Después de esto se lava una vez en PBT.

15. Agregar 5 μ l de la reacción de TUNEL a cada embrión.
15. Incubar por 2 h a 37°C.
16. Lavar los embriones 4 veces con PBT.
17. Agregar a cada embrión una gota de vectashield o de glicerol/PBS 50%.
18. Observar bajo el microscopio de fluorescencia con luz de excitación de 450-500 nm y detectar en el rango de 515-565 nm (luz verde).
19. Observar bajo microscopía confocal.

6. RESULTADOS

I. Diferencias morfológicas entre MEFs WT y LPP3 -/-

Al observar los MEFs al microscopio, de entrada se registraron diferencias morfológicas entre los LPP3 -/- y los WT. Los MEFs LPP3 -/- son más pequeños (50%) (ver tabla 6,apéndice), menos extendidos, con menos filopodios y con bordes más irregulares que los WT (Figs. 9 y 10).

En este ensayo se cultivaron MEFs WT y LPP3 -/- a la misma densidad celular con medio D10 en cajas de cultivo de 100 mm. Se observaron al microscopio y se les tomaron fotos.

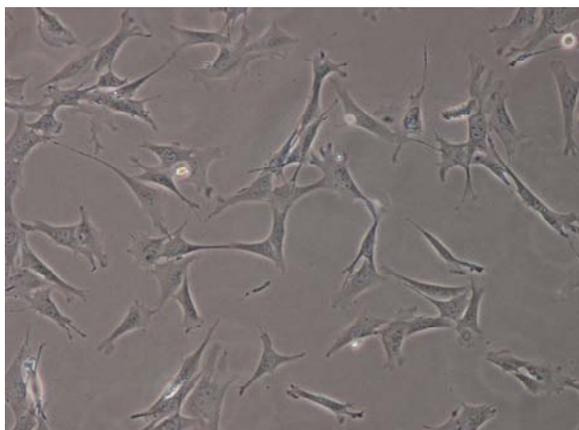


Fig. 9 MEFs WT (aumento 10 X)

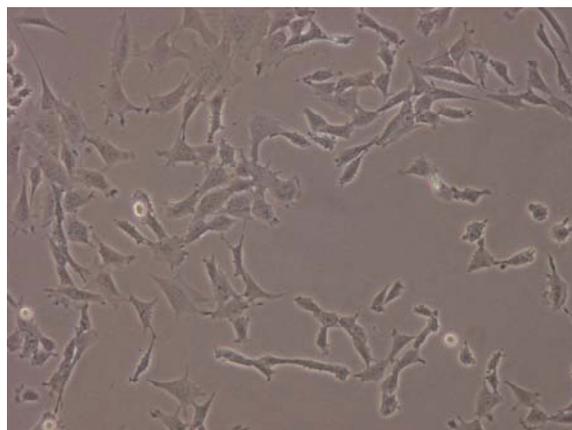


Fig. 10 MEFs LPP3 -/- (aumento 10X)

Además de las diferencias morfológicas, se observó que aparentemente los MEFs LPP3-/- proliferaban mas rápido por lo que se plantearon ensayos para analizar esta posibilidad.

II. Curvas de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento de los MEFs LPP3 $-/-$ y los WT se hicieron varias curvas de crecimiento (ver materiales y métodos). Esto ayudó a determinar la velocidad a la que crecen las células durante un período de tiempo determinado. Las curvas de crecimiento también permiten medir proliferación celular.

Se hicieron 3 repeticiones para las curvas de crecimiento; aquí se muestra una curva representativa (ver Fig. 11, para ver las otras curvas de crecimiento consultar apéndice).

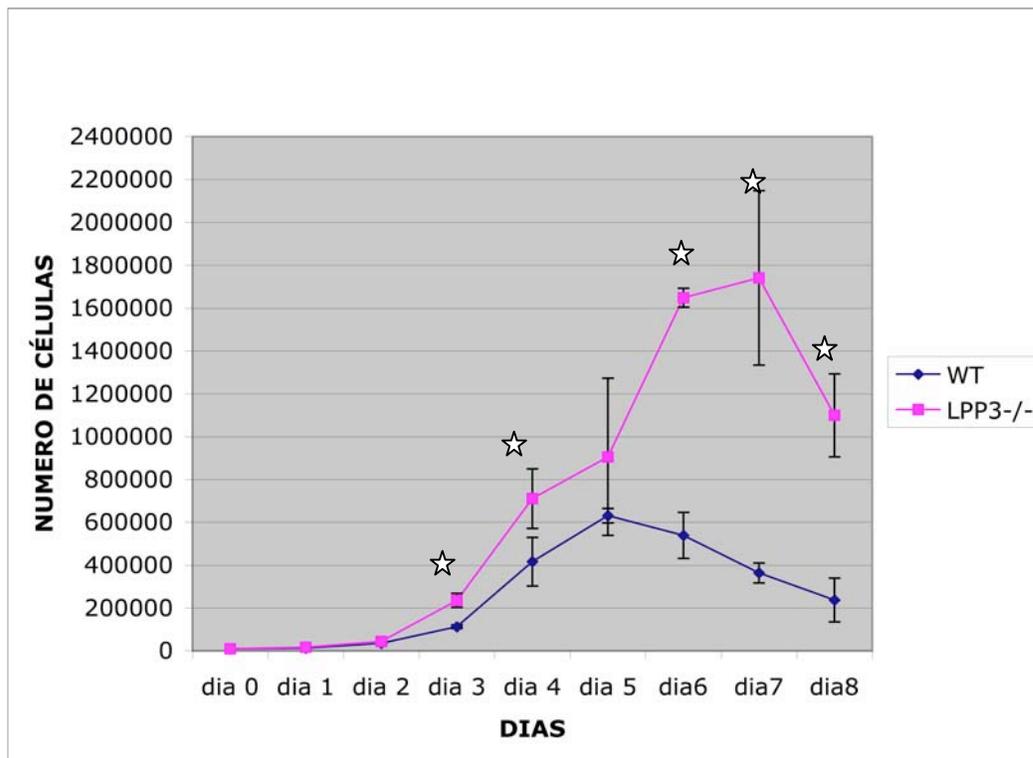


Fig. 11 Esta curva de crecimiento se hizo a partir de los datos mostrados en la tabla 2 (ver apéndice). Las barras sobre los puntos representan las desviaciones estándar. Los MEFs LPP3 $-/-$ proliferan más pues tienen una fase exponencial mucho más prolongada y pronunciada. Al hacer una prueba de T student, las estrellas muestran los datos que presentan diferencias significativas, $p < 0.05$.

Como se ve claramente en las curvas de crecimiento, los MEFs LPP3 $-/-$ tienen una cinética de crecimiento mucho más acelerada que los MEFs WT, además de que proliferan por más tiempo (Fig.11 y apéndice). En las 3 curvas de crecimiento se aprecia que los MEFs LPP3 $-/-$ dejan de proliferar a partir del día 7, en cambio los WT dejan de proliferar desde el día 4 ó 5. La fase exponencial de los WT es mucho más corta que la de los LPP3 $-/-$ y ambos tienen una fase lag muy parecida, incluso en las curvas se ve casi como si estuvieran sobrelapadas. Sin embargo, a partir del día 3-4 los MEFs LPP3 $-/-$ alcanzan números celulares mayores que los WT, a pesar de partir de un mismo número celular inicial (Fig.11 y apéndice).

Los MEFs LPP3 $-/-$ ocupan la mitad de área que los WT (ver tabla 6, apéndice). Al ocupar menos área tardarían más tiempo en llegar a confluencia y podrían proliferar por más tiempo antes de llegar a la inhibición por contacto. Para descartar que el efecto del tamaño influyera en los resultados de las curvas de crecimiento, se hizo un experimento en el que en vez de empezar la curva de crecimiento con el mismo número celular, los MEFs LPP3 $-/-$ se sembraron al triple de densidad que los WT (Fig. 12). Al analizar esta curva de crecimiento se observa que los MEFs WT se dividen una vez y llegan a inhibición por contacto 24 horas después de sembrados. En contraste los MEFs LPP3 $-/-$ se dividen al menos dos veces más, continúan proliferando y no presentan inhibición por contacto.

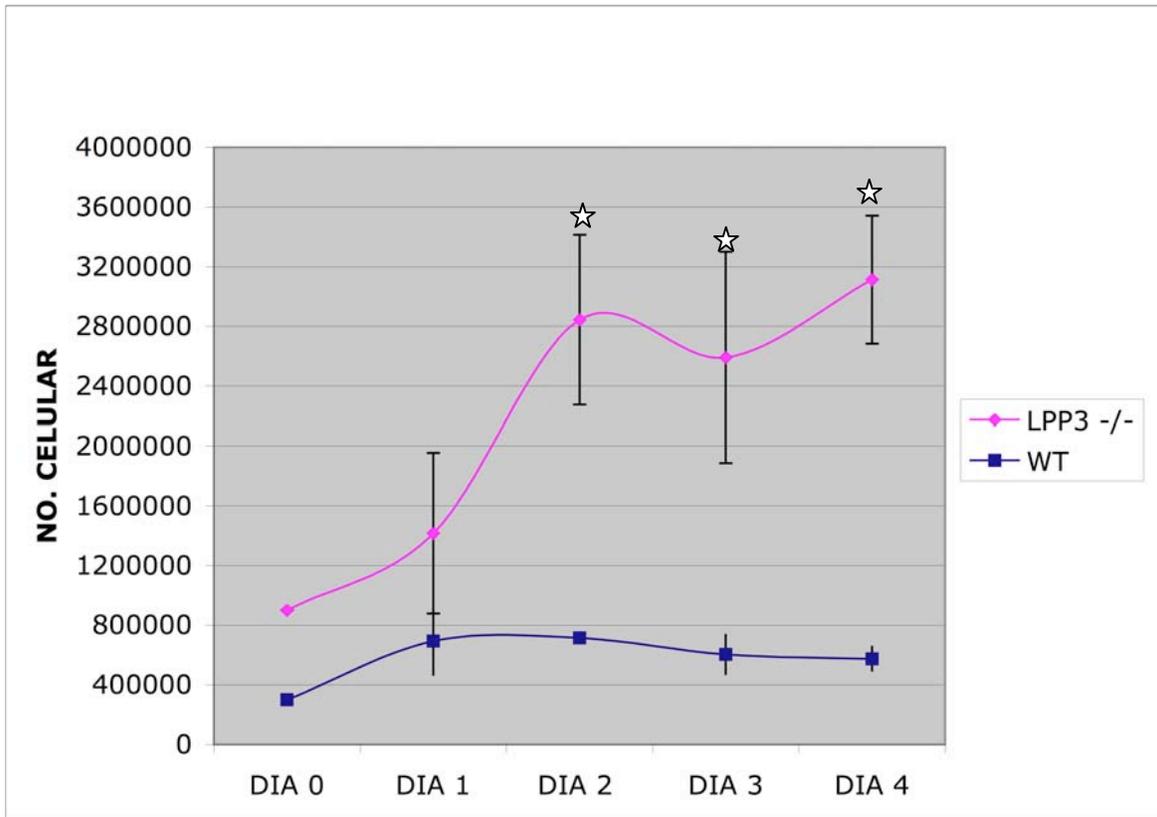


Fig. 12 Los MEFs LPP3^{-/-} fueron sembrados a un número inicial tres veces más grande que el de los WT. Los LPP3^{-/-} presentan una curva de crecimiento atípica. Las estrellas muestran las diferencias significativas con la prueba de T, con $p < 0.05$.

Al encontrar estas diferencias proliferativas entre los MEFs LPP3^{-/-} y WT lo siguiente fue observar si había diferencias en el número de células apoptóticas entre las dos poblaciones. Además un experimento preliminar (analizando las células por FACS), sugería un aumento de células “apoptóticas” (con menor cantidad de ADN que en G1) en cultivos de MEFs LPP3^{-/-}.

III. Detección de apoptosis mediante TUNEL

Después de estudiar la conducta proliferativa, nos interesó estudiar un tipo de muerte celular programada: la apoptosis, ya que es otro proceso celular que puede ser regulado por lípidos bioactivos. Se detectaron a las células apoptóticas en poblaciones de MEFs WT (silvestres) y LPP3 $-/-$ (mutantes) y se compararon para saber si había diferencias en la cantidad de células apoptóticas en las poblaciones mutantes con respecto a las silvestres debido a la ausencia de LPP3. Los MEFs se sembraron a diversas densidades para comparar el grado de apoptosis (Figs. 13-18).

Todas las fotos fueron tomadas al mismo aumento (20 x) y bajo las mismas condiciones, la intensidad de la fluorescencia fue la misma para todas. Se hicieron 3 repeticiones de cada experimento obteniendo los mismos resultados en los 3 casos. Se muestran fotos representativas de cada condición.

Al observar los MEFs sembrados a densidades bajas e intermedias (Figs. 13-15) no se encontraron diferencias en cuanto apoptosis entre las poblaciones silvestres y mutantes. En las únicas densidades en las que hay diferencias es en las más altas (Figs. 16-17), en donde los MEFs mutantes se han despegado y quedan muertos en el medio y los que quedan adheridos ya se han muerto también. Los MEFs silvestres, en cambio, casi no presentan apoptosis a esas mismas densidades.

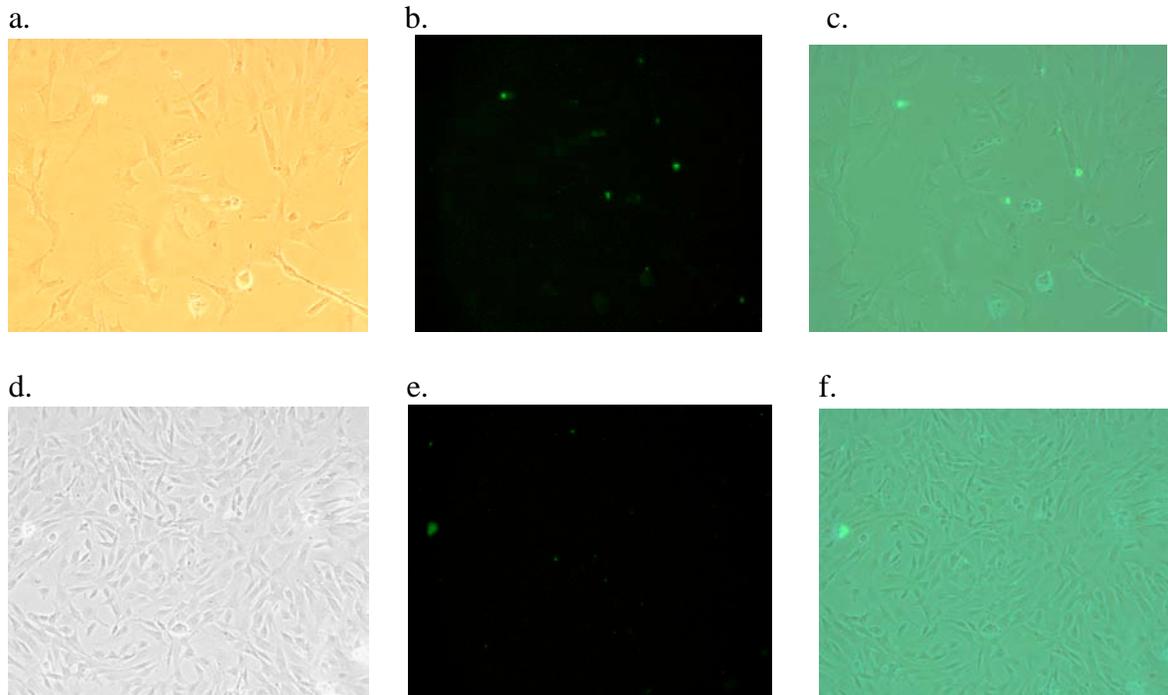


Fig. 13 MEFs, 10 000 células sembradas. Las figuras a,b,c son WT y d,e,f son LPP3^{-/-}. En la figura b se observan solamente 3 células en apoptosis y en la figura e solamente se observa una célula en apoptosis. La figura c muestra las figuras a y b superpuestas. La figura f muestra las figuras d y e superpuestas.

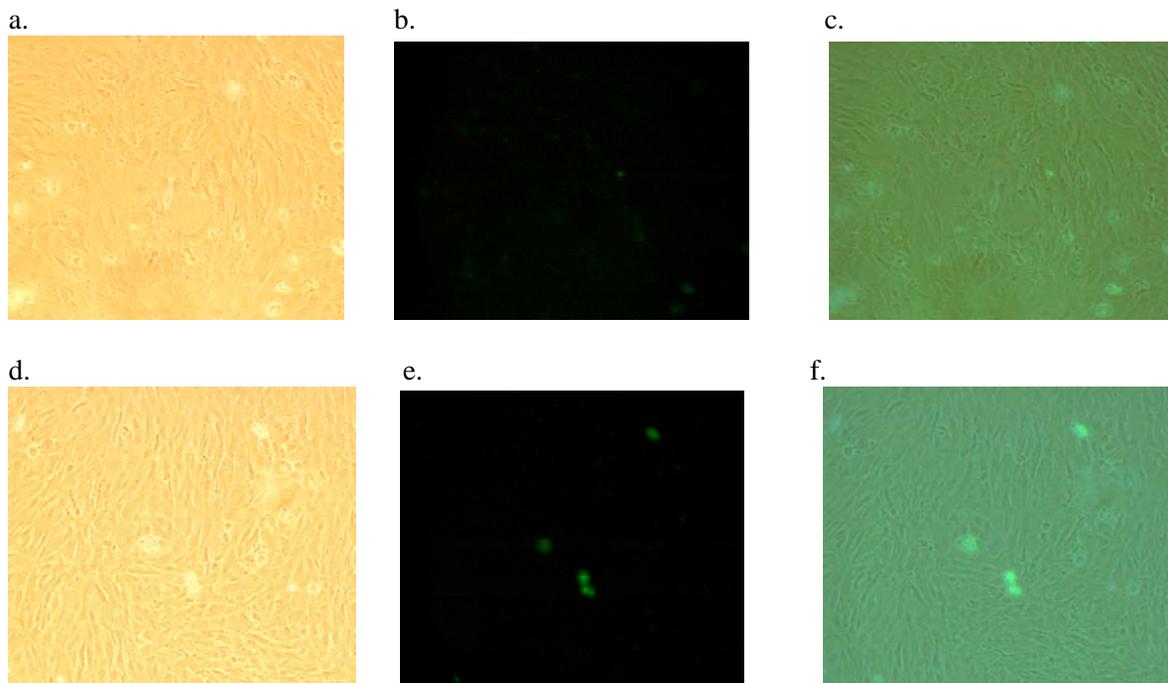


Fig. 14 MEFs WT (a,b,c) y LPP3^{-/-} (d,e,f), 50 000 células sembradas. Se observan 4 células apoptóticas en las figuras e y f. Las figuras c y f muestran a las figuras (a,b) y (d,e) superpuestas.

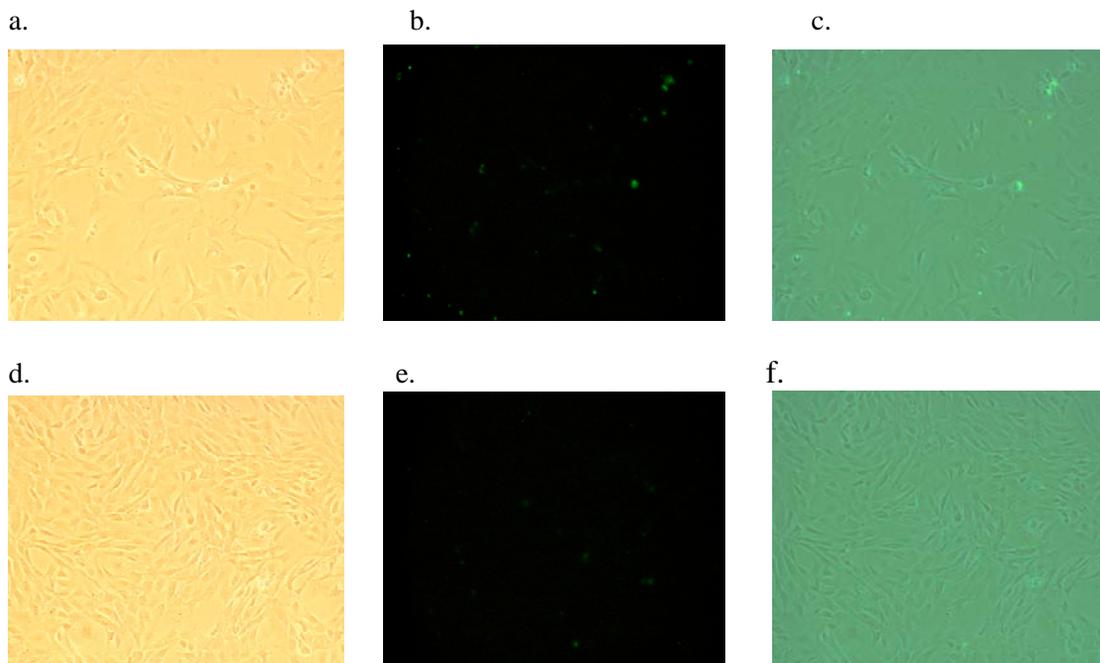


Fig. 15 MEFs WT (a,b,c) y LPP3^{-/-} (d,e,f); 70 000 células sembradas. Se observan células en apoptosis en la figura b que coinciden con las que en la figura a se ven morfológicamente distintas a las demás, como se ve la coincidencia en la figura c. En las MEFs LPP3^{-/-} no se observa ninguna célula apoptótica (d,e,f)

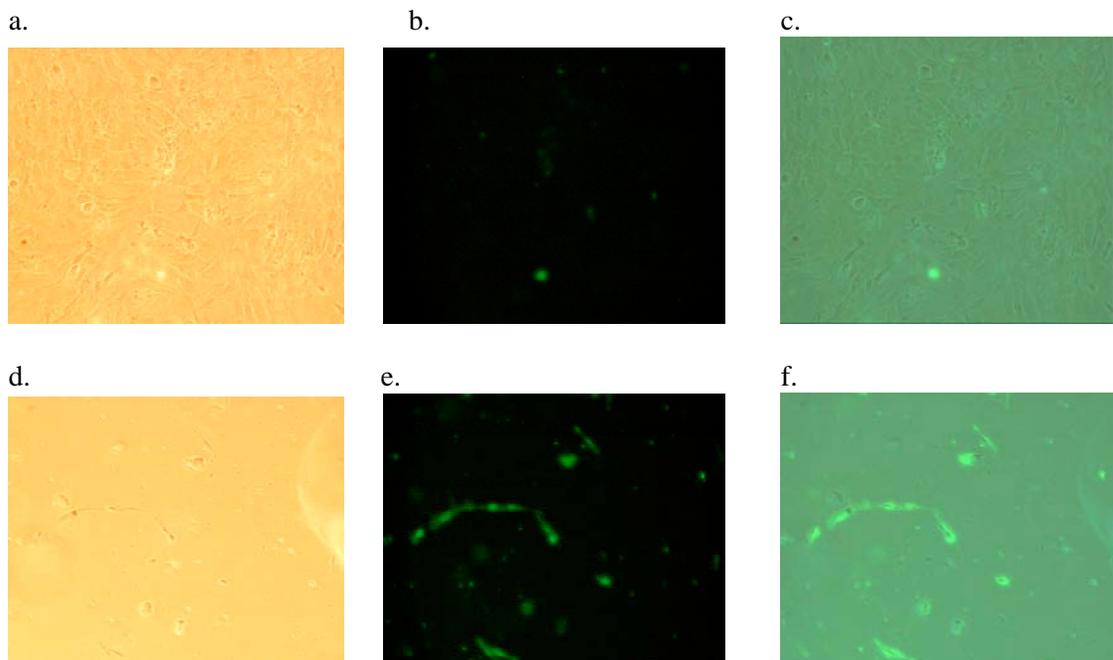


Fig. 16 MEFs WT (a,b,c) y LPP3^{-/-} (d,e,f), 100 000 células. En las WT Solamente se ve una célula apoptótica. En las LPP3^{-/-} todas las células están apoptóticas, se observan pocas células adheridas en la figura d porque las demás se despegaron.

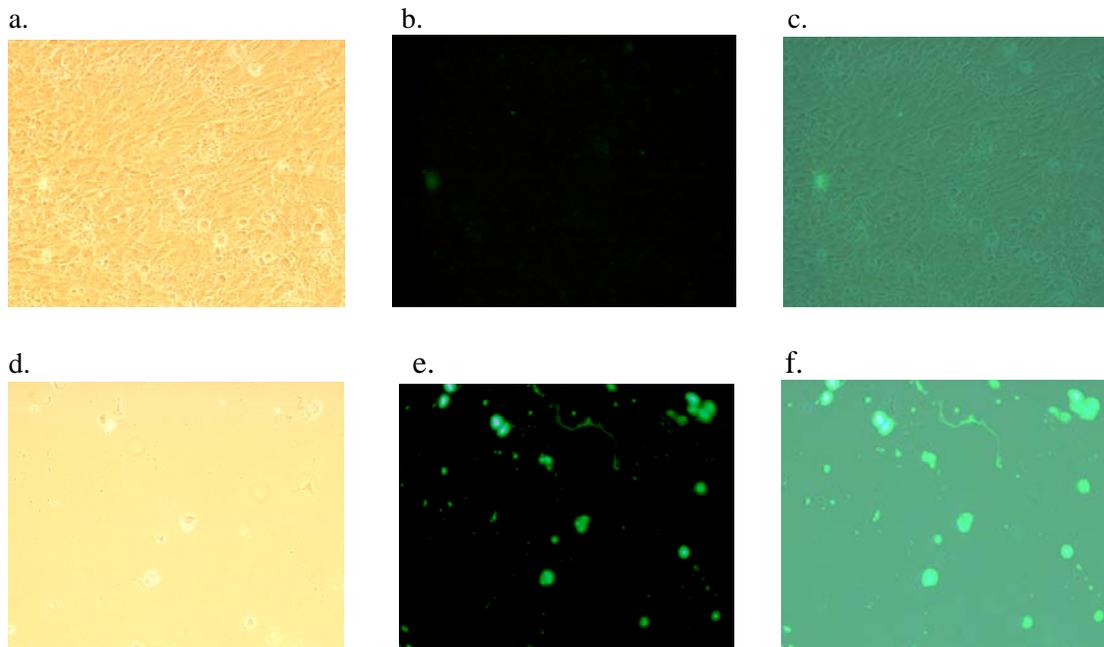


Fig. 17 MEFs WT (a,b, c) y LPP3^{-/-} (d,e,f), 200 000 células sembradas. En la figura a se observa que las células están 100% confluentes, no hay ninguna célula apoptótica. En las figuras d,e,f se observa que todas las células están apoptóticas y son las únicas que quedaron de todas las que se despegaron, inclusive se ven restos celulares (fig. d y f).

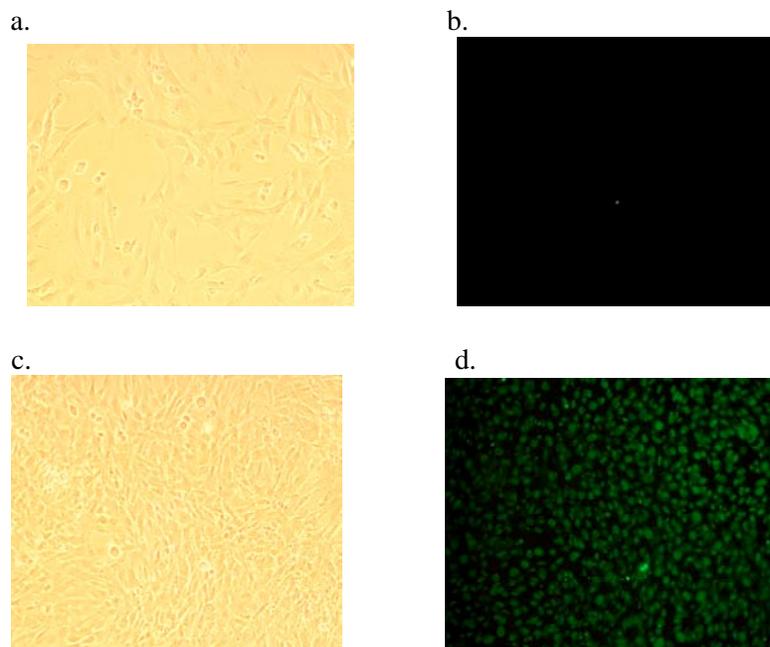


Fig. 18 Controles negativo(a,b) y positivo (c,d) para detección de apoptosis mediante TUNEL. Los paneles a y c muestran a los MEFs bajo contraste de fases y en b,d a estos mismos pero bajo fluorescencia. En la figura b no se ve ninguna célula apoptótica (se detecta con microscopio de fluorescencia al excitar con una longitud de onda de 488 nm). En la figura d los núcleos que fluorescen tienen el ADN fragmentado, debido a que se trataron con DNasa.

IV. Determinación de la duración del ciclo celular

Al haber encontrado diferencias significativas en cuanto a la proliferación en los MEFs LPP3^{-/-}, procedimos a estudiar el ciclo celular. Esto nos podría indicar también si había un proceso de transformación relacionado.

Se analizaron las fases del ciclo celular de MEFs WT y LPP3^{-/-} para determinar si existían diferencias en la duración del ciclo celular y en específico en la duración de alguna de estas fases. La duración del ciclo para ambas poblaciones se obtuvo después de analizar las fases en varios experimentos marcando a las células con bromodesoxiuridina (BrdU) y con yoduro de propidio (PI). Al final se obtuvieron datos a partir de citometría de flujo y éstos se graficaron (Figs. 19- 21).

El experimento 1 (Fig. 19) se hizo para determinar la duración del ciclo celular, con células no sincronizadas, colectando muestras cada hora durante 7 h.

Del experimento 1 se puede concluir que la fase de S dura entre 7 y 8 h, ya que los porcentajes casi no varían a lo largo de las h y no se ven cambios; se ve sobre todo al comparar los resultados entre este primer experimento y el segundo experimento. En este experimento también se observa que a las 4 h aparece una población de células que corresponden a células inicialmente marcadas en S pero que han progresado en el ciclo hacia la fase de G1, indicando que las fases G2/M tienen una duración de alrededor de 4 h (Fig. 19, 4 h).

Para el experimento 2 (Fig. 20) se trabajó con MEFs WT parcialmente sincronizados (ver materiales y métodos). En vez de tomar muestras cada hora, se tomaron cada 2 h, lo cual fue muy útil después al comparar con el primer experimento para detectar cómo las células avanzan en su ciclo (Fig. 19, 20).

La duración del ciclo celular de los MEFs WT es de 17.5 h, ya que al ver los resultados del primer experimento, vemos que en las 7 h que duró el experimento un gran porcentaje de MEFs marcados inicialmente siguen estando en fase S, eso quiere decir que S dura al menos 7 h. También en el segundo experimento, en el cual hay muestras de hasta 10 h, los porcentajes de los MEFs en fase S se empiezan a mover hasta alrededor de las 7 u 8 h. Se sabe que S dura alrededor del 40% del total del ciclo, entonces tenemos que:

$$7 \text{ h} \text{ --- } 40\%$$

$$x \text{ h} \text{ ---- } 100\% \quad x = 17.5 \text{ h}$$

Si S tiene una duración de 7 h, G2/M de 4 h, entonces G1 debe de tener una duración de alrededor de 7 h (obteniendo una duración total del ciclo de alrededor de 17-18 h).

Esto coincide con las 17.64 h obtenidas al calcular el tiempo de duplicación, a partir de datos obtenidos en cultivo.

Tiempo de duplicación de MEFs WT

$$T_d = \frac{(\text{tiempo}) (\ln 2)}{\ln \left[\frac{\# \text{ final (el número contado al final)}}{\# \text{ inicial (el número de células sembradas inicialmente)}} \right]}$$

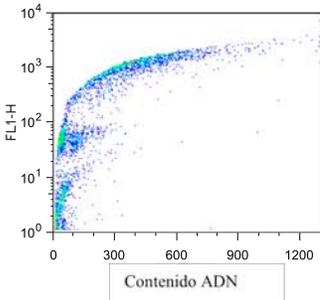
$$T_d = \frac{(85 \text{ h}) (\ln 2)}{\ln \left[\frac{3\,600\,000}{127\,692.3} \right]}$$

$$T_d = 17.64 \text{ h}$$

Se realizaron diferentes ensayos y en todos se obtuvieron tiempos de duplicación similares.

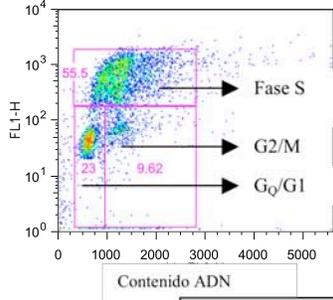
control BrdU

BRDU27ABRIL.001



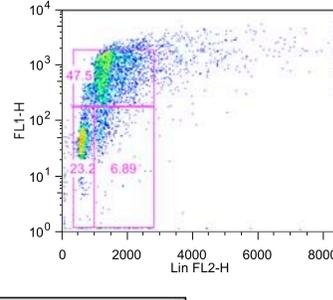
30'

BRDU27ABRIL.002



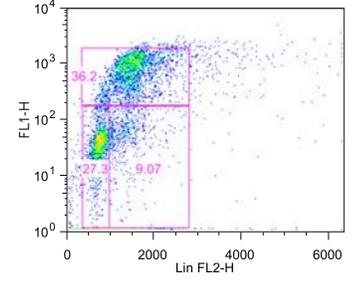
1 hora:

BRDU27ABRIL.003



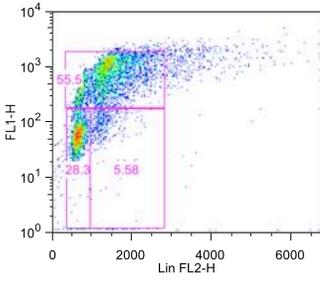
2 horas:

BRDU27ABRIL.004



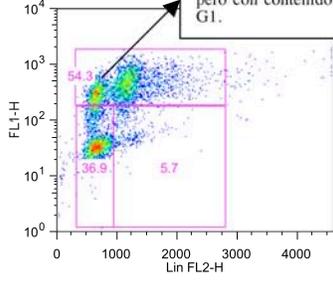
3 horas:

BRDU27ABRIL.005

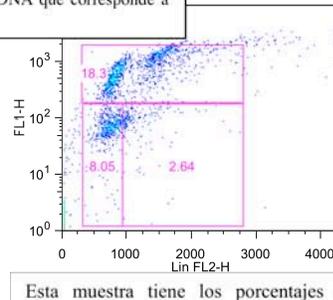


4 horas:

BRDU27ABRIL.006

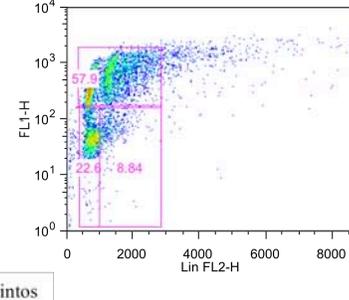


Este grupo de células se movió de S hacia G1 (pasando por G2/M), por eso están marcadas pero con contenido de DNA que corresponde a G1.



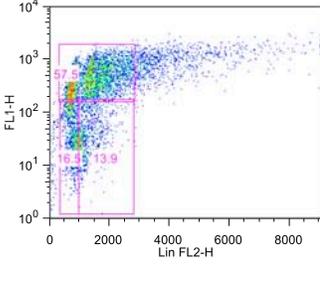
6 horas:

BRDU27ABRIL.008



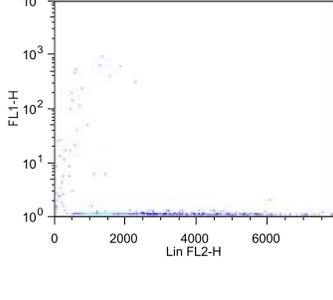
7 horas:

BRDU27ABRIL.009



control sólo PI:

BRDU27ABRIL.010



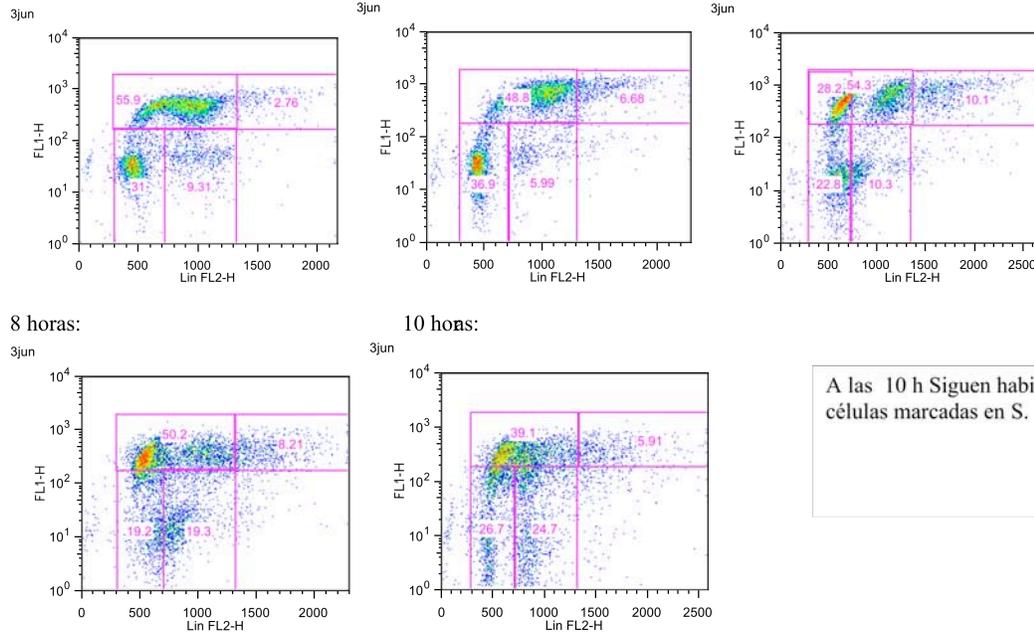
Esta muestra tiene los porcentajes distintos porque se tapó el citómetro y la lectura que hace después de purgar no es confiable para esa muestra.

Fig. 19 Primer experimento con MEFs WT marcadas con BrdU y PI. Las gráficas muestran la intensidad de fluorescencia de PI en el eje de las abscisas y la intensidad de fluorescencia de fluoresceína (que está acoplada a BrdU) en el eje de las ordenadas. La intensidad de PI refleja el contenido de ADN. Las gráficas de 30' hasta 7 horas reflejan el movimiento de las células marcadas inicialmente con BrdU, esto es en fase S, hacia las otras fases a través del ciclo celular. Cada gráfica corresponde a la muestra que se sacó x tiempo después de dar el pulso inicial con BrdU y que siguió transcurriendo en su ciclo celular (ver materiales y métodos). En la gráfica 30' se indica qué grupo de células corresponde a qué fase del ciclo celular. Los números sobre los cuadrantes indican el porcentaje de células que hay para dicho cuadrante.

30'

2 horas:

6 horas:



A las 10 h Siguen habiendo muchas células marcadas en S.

Fig.20 Segundo experimento con MEFs WT marcadas con BrdU y PI. Las gráficas muestran la intensidad de fluorescencia de PI en el eje de las abscisas y la intensidad de fluorescencia de fluoresceína (que está acoplada a BrdU) en el eje de las ordenadas. La intensidad de PI refleja el contenido de ADN. En las diferentes gráficas se observa el movimiento de las células a lo largo del ciclo celular.

Para determinar la longitud del ciclo celular en los MEFs mutantes se trabajó con una población de MEFs desincronizados, tomando muestras a las 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 h para poder ver los cambios en los porcentajes de células a lo largo del ciclo celular (Fig. 21).

Al analizar las gráficas de los MEFs mutantes (Fig. 21) ocurren varias cosas que en los MEFs WT no suceden. Se observa una población de células que pueden ser apoptóticas o aneuploides, pero parecen ser aneuploides porque se observa que se marcan con BrdU y se mueven a lo largo del ciclo celular (Fig. 21). Además se presenta también un grupo de células poliploides, lo cual es indicativo de anomalías dentro del ciclo celular y una inestabilidad genómica. Además los porcentajes de la fase S cambian constantemente. También hay gran pérdida de fluorescencia (las células se desplazan hacia el eje de las abscisas).

En la figura 21 se observa también que a las 7 h se mueven muchas células de S hacia G2/M. A las 10 h casi no hay células originalmente marcadas en S. De las 8 a las 10 h los porcentajes de células en fase S cambian de 25.4 a 11%, lo cual indica que un gran porcentaje de células se movió hacia las fases de G2/M ó G1.

Al comparar la gráfica de 10 h mutante contra la silvestre se ve que en las silvestres sigue habiendo gran cantidad de células en S, en cambio, en las mutantes ya casi no hay.

Después de analizar y comparar las gráficas de las figuras 19 a 21 se concluyó que la duración del ciclo celular para los MEFs es de alrededor de 17 h para los silvestres y de entre 15 y 16 h para los mutantes. En los MEFs mutantes la fase de G1 puede estar acortada. En los MEFs silvestres G1 tiene una duración de 7 h, de acuerdo a las gráficas y experimentos (Figs. 19 a 21).

El tiempo de duplicación para los MEFs mutantes fue el siguiente:

$$T_d = \frac{(72 \text{ h}) (\ln 2)}{\ln \left[\frac{233\,750}{10\,000} \right]} = \mathbf{15.83 \text{ h}}$$

Se obtuvieron varios tiempos de duplicación haciendo diferentes ensayos y se obtuvieron tiempos de duplicación similares.

Experimento con MEFs mutantes (LPP3 $-/-$):

30' BrdU-PI:

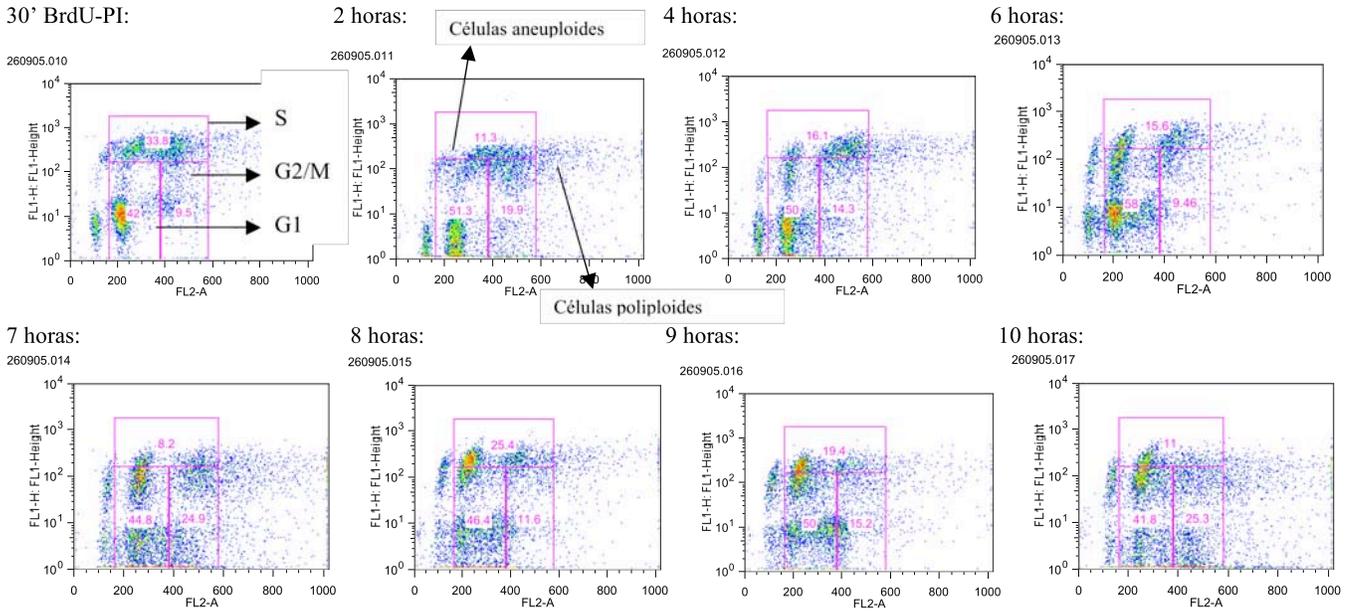


Fig. 21 Experimento con MEFs mutantes (LPP3 $-/-$). Las gráficas muestran la intensidad de fluorescencia de PI en el eje de las abscisas y la intensidad de fluorescencia de fluoresceína (que está acoplada a BrdU) en el eje de las ordenadas. La intensidad de PI refleja el contenido de ADN. En las diferentes gráficas se observa el movimiento de las células a lo largo del ciclo celular. Los números en cada gráfica representan el porcentaje de células que hay en ese cuadrante. Los cuadrantes están marcados de esa manera para observar los cambios de intensidad de fluorescencia más fácilmente y poder comparar entre una gráfica y otra.

También se hicieron experimentos sincronizando a las células, dejándolas 17 h con medio sin suero y marcándolas con PI solamente (Figs. 22-23).

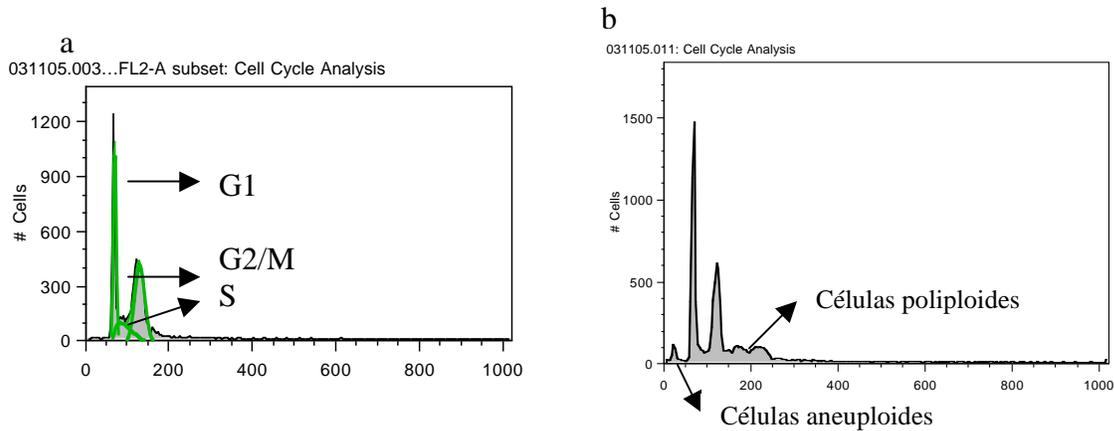


Fig 22. En los MEFs silvestres(a) se muestra una distribución de fases normal, en donde el comportamiento de las células es normal (marcado en verde). En los MEFs mutantes(b) las células presentan un ciclo celular anormal, una población de células aneuploides y una población de células poliploides. Esta muestra corresponde a la primer muestra tomada después de dejar a los MEFs durante 17 h sin suero. En el eje de las abscisas la intensidad de fluorescencia del PI representa la cantidad de DNA. En el eje de las ordenadas se grafica el número de células.

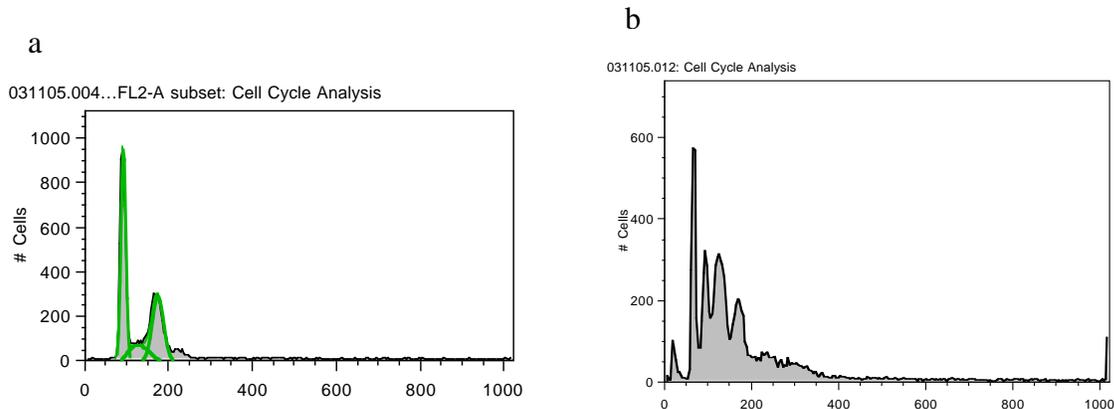


Fig 23. En los MEFs silvestres(a) se muestra una distribución de fases normal, en donde el comportamiento de las células es normal (marcado en verde). En los MEFs mutantes(b) las células presentan un ciclo celular anormal. Esta muestra se tomó 2 h después de haber agregado de nuevo suero al medio de los MEFs.

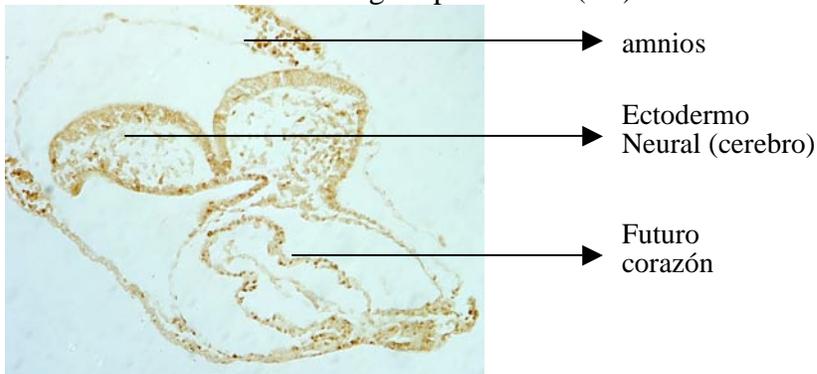
En la Fig. 22 en la gráfica para los MEFs mutantes (b) las células presentan un ciclo celular anormal, una población de células aneuploides y una población de células poliploides. Los

MEFs mutantes muestran anomalías en la distribución de fases del ciclo celular (Figs. 22 y 23). Al ver la figura 23 b incluso es difícil distinguir las fases del ciclo, presentan un comportamiento anormal, similar al de células de tumores. Es decir, estas células presentan salidas prematuras de las fases del ciclo celular, reflejando problemas en los puntos de control y presentan inestabilidad genómica como lo son las aneuploidías y poliploidías. Probablemente esto refleje también defectos en mecanismos de reparación y en los puntos de control de G1/S.

V. Inmunohistoquímica Vs PCNA Para Detectar Proliferación

Hasta este punto los estudios habían sido in vitro, trabajando con MEFs, pero debido a los defectos que presentan los embriones mutantes para LPP3, nos interesó estudiar si el proceso proliferativo estaba afectado al igual que en los MEFs. Para lograr esto, a cortes de embriones de 6 somitas (alrededor de 8.5 días de gestación) LPP3^{-/-} y LPP3^{+/-} (WT) incluidos en parafina se les hicieron inmunohistoquímicas vs PCNA con el fin de detectar las zonas en proliferación. Se quiere ver si como consecuencia de la mutación cambian los patrones de proliferación que normalmente se presentan en ese estadio (Figs. 24-28).

a. Corte de embrión heterocigoto para LPP3 (+/-)



b. Corte de embrión mutante (LPP3 -/-)

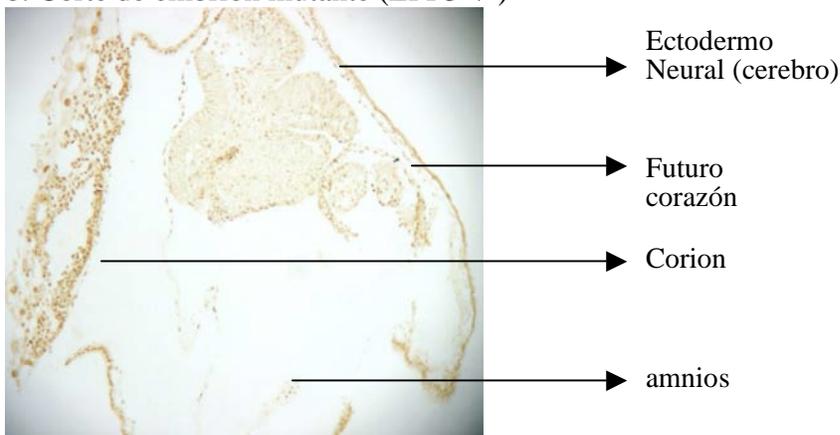


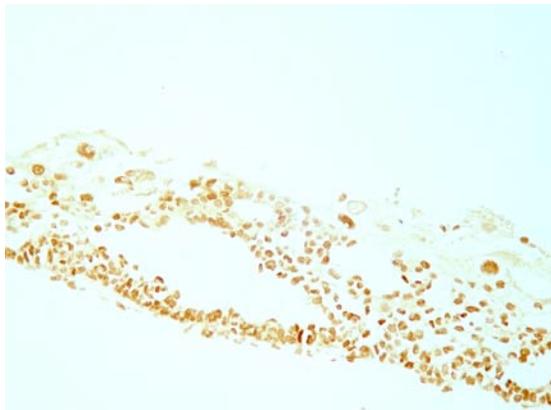
Fig. 24 Cortes de embriones de 6 somitas (de 8.5 d.g.) a. muestra un corte frontal de embrión WT y b. muestra un corte lateral de embrión mutante.

Los cortes (Fig. 24) aunque tienen diferente orientación son equivalentes ya que en ambos se observan las mismas estructuras. Una vez identificadas las estructuras, se compararon las zonas que están proliferando en varios cortes tanto del mismo embrión, como de embriones diferentes. Al comparar las zonas en proliferación, no hay diferencias evidentes entre los mutantes y los heterocigotos.

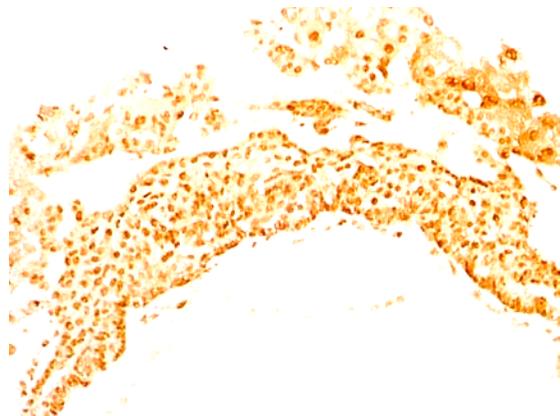
Las células en proliferación son las que se observan de un color más oscuro. En los embriones heterocigotos hay más fondo que en los mutantes, por lo que son las células que se observan de un color aún más oscuro las que están proliferando (Figs. 24-28).

Al ver con más detalle y con más aumento las zonas que están proliferando y que son equivalentes para ambos embriones no se observan diferencias en proliferación (Figs. 24-28).

En los cortes donde se muestra el corion éste presenta una alta proporción de células en proliferación tanto en los silvestres como en los mutantes (Fig. 26). Al comparar el ectodermo neural silvestre contra el mutante, se observa en ambos una mediana proliferación, sobre todo en las células de las orillas, algunas del neuroepitelio y algunas pocas en el mesénquima (Fig. 26). Al obtener los índices mitóticos obtuvimos un índice de 0.55 para los mutantes y de 0.60 para los silvestres. En la región que va a dar lugar al corazón se observa proliferación en todas las células que rodean a la cavidad (Fig. 27) y se obtuvo un índice mitótico de 0.92 para los mutantes y de 0.87 para los silvestres.

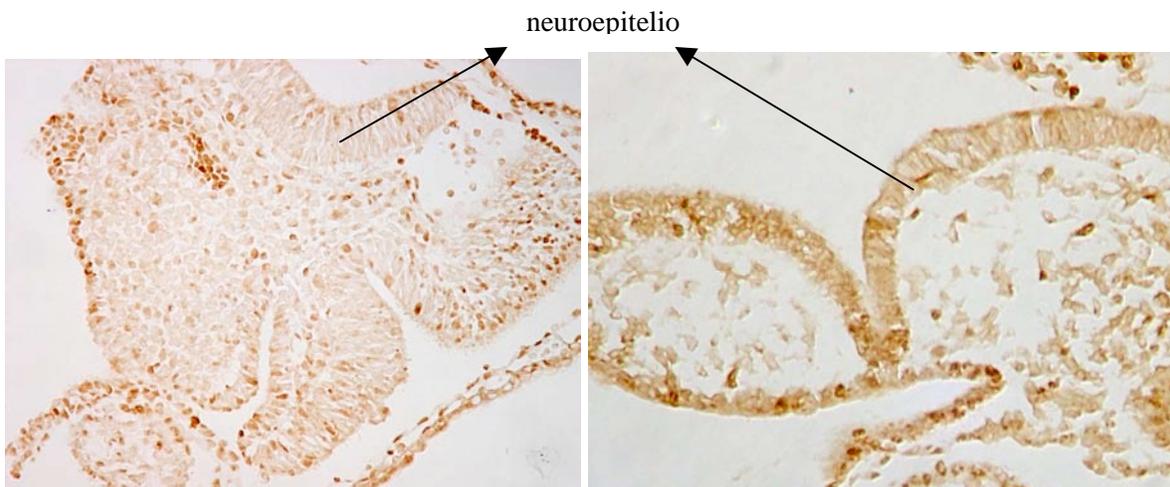


embrión LPP3 -/-



embrión LPP3 +/-

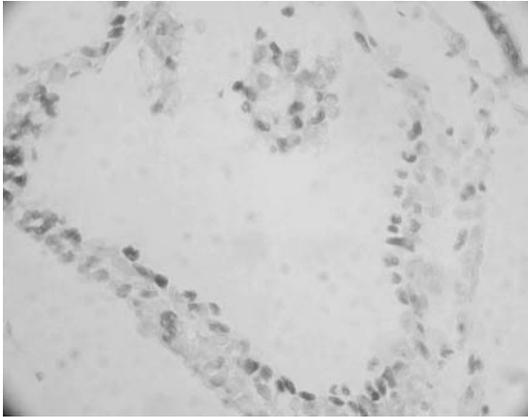
Fig.25 Cortes de embrión LPP3 -/- y +/- en donde se muestra la región del corion. Se observan los núcleos de las células en proliferación teñidos de un color café oscuro.



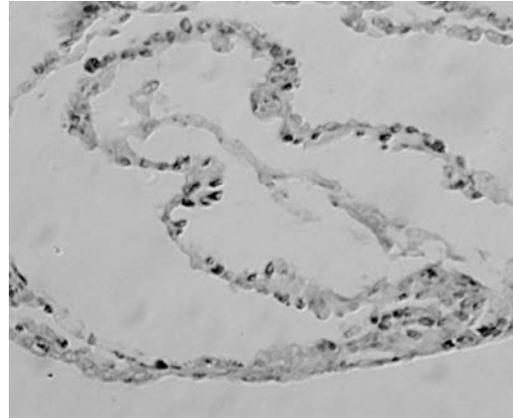
embrión LPP3 -/-

embrión LPP3 +/-

Fig.26 Cortes de embrión LPP3 -/- y +/- en donde se muestra la región del ectodermo neural. Se observa en ambos una mediana proliferación, sobretodo en las células de las orillas, algunas del neuroepitelio y algunas pocas en el centro.



embrión LPP3 -/-

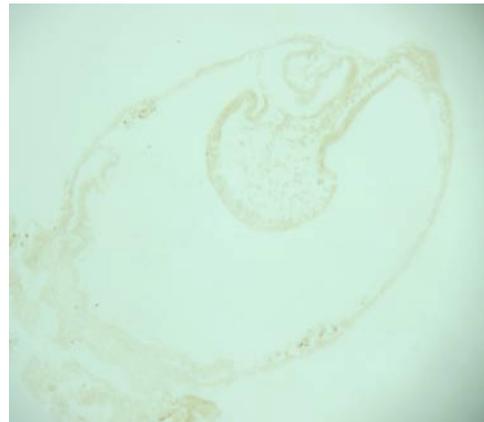


embrión LPP3 +/-

Fig.27 Cortes de embrión LPP3 -/- y +/- en donde se muestra la región del corazón. En la región que va a dar lugar al corazón se observa proliferación en todas las células que rodean a la cavidad.



embrión LPP3 -/-



embrión LPP3 +/-

Fig.28 Controles negativos de la inmunohistoquímica. Cortes de embrión LPP3 -/- y +/-

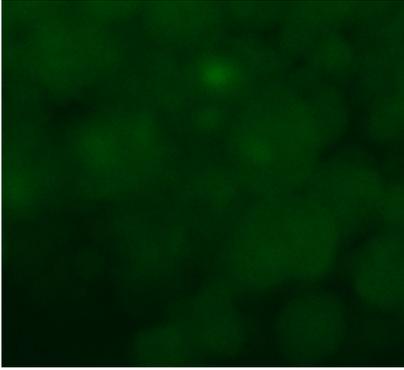
El control negativo del embrión heterocigoto tiene más fondo que el del embrión mutante, a pesar de que el tiempo de revelado fue el mismo (Fig. 28). A pesar de esto, no se observan células positivas para proliferación.

VI. Resultados de TUNEL in situ para detectar apoptosis:

Los embriones deficientes en LPP3 presentan un retraso general en el desarrollo y son más pequeños, por lo que un proceso como la apoptosis podría estar presente. Para determinar esto se hicieron ensayos de TUNEL a embriones completos, tanto a silvestres como a mutantes de 8.5 días de gestación (figuras 29 y 30).

En el embrión silvestre (figura 29) no se observan células apoptóticas. En cambio en el embrión mutante vemos células apoptóticas en la zona anterior. El embrión en este caso incluso se desarrolló fuera del saco vitelino, un fenotipo producido por la ausencia de LPP3 en algunos casos. El embrión también es más pequeño y presenta esta apoptosis localizada que no se encuentra en los embriones silvestres. Incluso en otros embriones silvestres teñidos con rojo neutro tampoco se observan estas zonas de apoptosis (datos no mostrados).

a.



b.

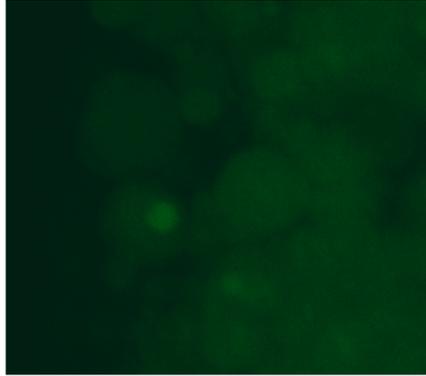
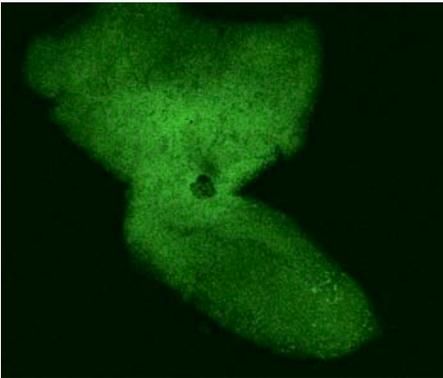
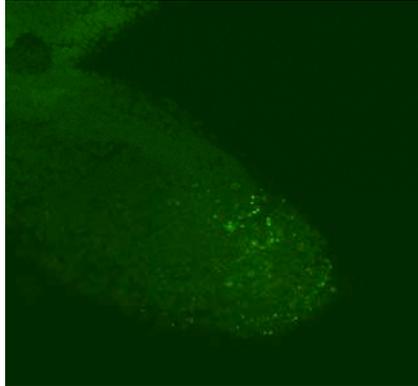


Fig. 29 Embrión silvestre de 8.5 días, visto con microscopía confocal. Se muestra la zona posterior en el panel a. y la posterior en el b. y no se observan células en apoptosis,

a.



b.



c.

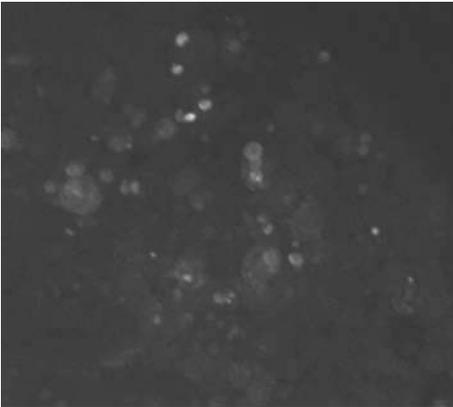


Fig. 30 Embrión mutante de 8.5 días, visto bajo microscopía confocal. En el panel a. se observa el embrión completo, en el panel b se muestra un acercamiento a la zona anterior y en el panel c. se ve un corte óptico de esa zona anterior.

7. DISCUSIÓN:

En este trabajo se emplearon MEFs. Debido a la letalidad de la mutación, el cultivo celular nos permite estudiar eventos que de otra manera no se podrían realizar en el ratón. Los MEFs presentan varias ventajas: representan la mayoría de las características celulares en el ratón, son relativamente fáciles de obtener y permiten cultivarse indefinidamente (una vez que están inmortalizados con el oncogen E1A).

Desde un principio los MEFs mutantes mostraron diferencias morfológicas, las cuáles son consecuencia de la ausencia de la enzima LPP3. Esto puede deberse a que los niveles de los lípidos sustrato y producto de la LPP3 se han modificado y por consiguiente pueden modificarse eventos celulares regulados por las vías en las que participan, como se menciona en la introducción.

Inicialmente analizamos si existían diferencias proliferativas entre los MEFs mutantes y los silvestres, ya que estas diferencias reflejarían cómo la mutación de LPP3 afecta a procesos celulares.

Una curva de crecimiento revela la cinética de crecimiento de las células desde la fase lag, hacia la fase log y después hacia la meseta. En la fase lag las células se recuperan de la tripsinización y se adhieren a la superficie, por lo que hay poco aumento de células. Normalmente durante la fase log las células se incrementan exponencialmente hasta que alcanzan una fase de meseta, donde las células llegan a confluencia y ya no aumentan en cantidad. Esto no pasa con los MEFs mutantes ya que no se ven afectados por la inhibición por contacto dependiente de la densidad. Una indicación de esto es que crecen uno sobre el otro y superan un número celular más allá del equivalente al 100% de confluencia en las células silvestres.

La forma de una curva de crecimiento puede dar información acerca de las diferencias en la tasa de crecimiento, adaptación o supervivencia, así como la limitación de crecimiento dependiente de la densidad (nivel de la densidad o saturación en la meseta) (Freshney RI, 1994). La forma de la curva de crecimiento de los MEFs mutantes es muy distinta a la de los silvestres, por lo cual sabemos que hay diferencias en la tasa de crecimiento, siendo mucho más acelerada en los mutantes. Sabemos también que los MEFs mutantes no limitan su crecimiento, pues al cambiarles el medio éstos continúan proliferando a diferencia de los silvestres (datos no mostrados).

Se sabe que las líneas celulares transformadas requieren un cambio de medio después de 3 ó 4 días de cultivo (Freshney RI, 1994). Esto lo indica un incremento en la acidez del medio, ocasionando un cambio de color rojo a color amarillo debido a la presencia de rojo fenol. Cuando en los MEFs mutantes el medio cambia a color amarillo, en los silvestres el medio todavía se ve de color rojo. Esta observación ya es indicativa de que los MEFs mutantes continúan proliferando.

Las diferencias proliferativas pueden indicar un desajuste en la regulación de procesos celulares asociados como apoptosis y ciclo celular, por lo que estudiamos estos procesos.

En cuanto a la apoptosis, se presentaron diferencias solamente a las densidades más altas. A altas densidades los MEFs silvestres mantienen una población constante en donde ya están en confluencia y alguna que otra célula se torna apoptótica. Los MEFs mutantes, en cambio, presentan un alto número de células apoptóticas a altas densidades. Creemos que este evento es consecuencia de que las células mutantes agotan los nutrientes del medio más rápido debido a que, como ya vimos, proliferan más rápido y continúan proliferando. Al no tener inhibición por contacto las células demandan más medio hasta que la población ya no puede sostenerse y por eso se vuelven apoptóticas. Apoyando esta idea está la

observación de que cultivos a una densidad de 70 000 células (en confluencia) no presentan células apoptóticas debido a que todavía no agotan el medio a esta densidad. Además, si se les cambia el medio a los MEFs mutantes cultivados a altas densidades, entonces las células no se mueren, sino que siguen proliferando, por lo que sabemos que la apoptosis que nosotros detectamos se debe a la falta de nutrientes y no a algún otro mecanismo más directo ocasionado por la mutación.

Los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento sugieren alteraciones en el ciclo celular, por esto nos interesó comparar la duración del ciclo y sus fases en MEFs mutantes y silvestres.

Después de analizar las gráficas de las fases del ciclo celular, se encontró que los MEFs mutantes presentan un acortamiento en el ciclo celular. Esto se ve al analizar el movimiento de las células a lo largo de las horas. La muestra inicial de MEFs silvestres presenta un mayor porcentaje de células marcadas con BrdU (55%) a comparación de los MEFs mutantes (33%). Esto es un indicio de que el ciclo celular de los MEFs silvestres tiene mayor duración (Lyons et al., 2003). También se puede estudiar a la población de células que se marcan inicialmente en S y que después observamos en el cuadrante de la fase S pero con cantidad de DNA diploide (Fig. 19-4 horas), las cuales son células que pasaron de la fase S a la fase de G1. Al analizar el movimiento y cambios en el porcentaje de este grupo de células se pudo obtener la duración del ciclo celular y se observó un acortamiento en las fase G1 del ciclo celular de los mutantes.

Se sabe que el LPA induce respuestas mitogénicas en fibroblastos mediante la activación de MAPKs a través de las proteínas G. Tanto el efecto proliferativo como el anti-apoptótico son sensibles a la acción de la toxina de pertusis, indicando que ambos procesos son efectivamente mediados por proteínas G (Fang et.al, 2000). Es posible que en la condición

mutante el efecto mitogénico del LPA no está pudiendo ser regulado por la LPP3 (ya que carecen de ella), por lo cual las señales mitogénicas y proliferativas pueden estar en “exceso” y ocasionar este tipo de comportamiento.

Por otro lado, al tratar de sincronizar los MEFs mediante la supresión del suero, no fue suficiente dejarlos sin suero por 17 horas, probablemente se necesitan 24 horas para sincronizarlos. Al intentar sincronizar los MEFs por más tiempo, los mutantes empezaron a tener muchas células apoptóticas, en cambio los silvestres no. Al liberar al ciclo después de la privación de suero, los MEFs mutantes muestran un comportamiento anormal, en el cual hay una gran población de células aneuploides y por otro lado hay muchas células poliploides también. Los MEFs silvestres en cambio presentan un histograma que se ajusta perfectamente al modelo pragmático de Watson. El que los MEFs mutantes tengan problemas al sincronizarse puede estar relacionado con los niveles de LPA extracelular y con problemas en los puntos de control en el ciclo.

A pesar de que ambas líneas están inmortalizadas con el oncogen E1A, los MEFs mutantes presentan comportamientos adicionales que nos recuerdan al de células malignas transformadas. Una alteración que presentan son las características de su crecimiento. Éstas muestran una deficiencia en la inhibición de la proliferación dependiente de la densidad (inhibición por contacto). Las células transformadas frecuentemente crecen hacia una mayor densidad que sus contrapartes normales y se apilan en cultivo en vez de dejar de crecer en cuanto hacen contacto. Otra característica es que tienen un menor requerimiento de suero. Las células transformadas usualmente requieren menores concentraciones de suero o factores de crecimiento para replicarse en cultivo. La presencia de células poliploides, aneuploides y apoptóticas es común de células transformadas.

Otro punto importante es la pérdida del control del ciclo celular. Las células transformadas no se paran en los puntos de control del ciclo celular cuando están sujetas a restricciones metabólicas de crecimiento (Kufe et al., 2003).

Estos comportamientos se observaron en los MEFs mutantes, los cuales podrían ser un muy buen modelo para estudiar alteraciones en el ciclo celular. Se sabe que en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de ovario, los niveles de LPA en plasma se encuentran elevados, aumentando la proliferación, sobrevivencia e invasividad de estas células (Tanyi et al., 2003). En contraste, los niveles de LPP3 se encuentran disminuidos en algunos tipos de cáncer, como en cáncer de colon y de mama (Umezu-Goto et al., 2004). La introducción de hLPP-3 ocasiona apoptosis e inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de ovario (Tanyi et al., 2003).

Además, si recordamos que las células mutantes son más pequeñas, esto puede tener una explicación a nivel del ciclo celular. Se sabe que hay células transformadas que son más pequeñas al no tener un freno en G2 y por lo tanto hay problemas en los checkpoints de G2, en donde están participando la ciclina B, cdc25 y wee (figura 29). Los mutantes de wee, por ejemplo, son células más pequeñas debido a que tienen una fase G2 más corta (Russell & Nurse, 1987). Este problema en el punto de control ó “checkpoint” de G2 también podría explicar el acortamiento en el ciclo y la poliploidía de los MEFs mutantes (Doherty et al., 2003). Es posible que el oncogen E1A al interactuar con pRb contribuya en la transformación de los MEFs mutantes pudiendo estar Ras de alguna manera modificado (Kufe et al., 2003).

Recientemente, se ha hablado acerca de la participación de LPPs en el ciclo celular. Las células detenidas en G2 tienen niveles bajos de LPA (Morris, 2006), en nuestro caso sucede lo contrario hay niveles altos de LPA, por lo que las células en vez de quedarse detenidas

no tendrían un freno en G2. En células que sobreexpresan LPP2, éste regula el momento de entrada hacia S, pero no es esencial para la progresión del ciclo celular. Al sobreexpresar LPP2 hay una entrada prematura hacia la fase S, acompañado de una acumulación de ciclina A. Esto habla de un papel para la actividad de LPP2 y los lípidos bioactivos en la regulación de la progresión del ciclo celular (Morris, 2006). Al analizar los niveles de expresión de LPP2 entre MEFs mutantes y silvestres no encontramos diferencias (datos no mostrados), lo cual implica que los MEFs mutantes no elevan los niveles de LPP2 para intentar suplir la ausencia de LPP3.

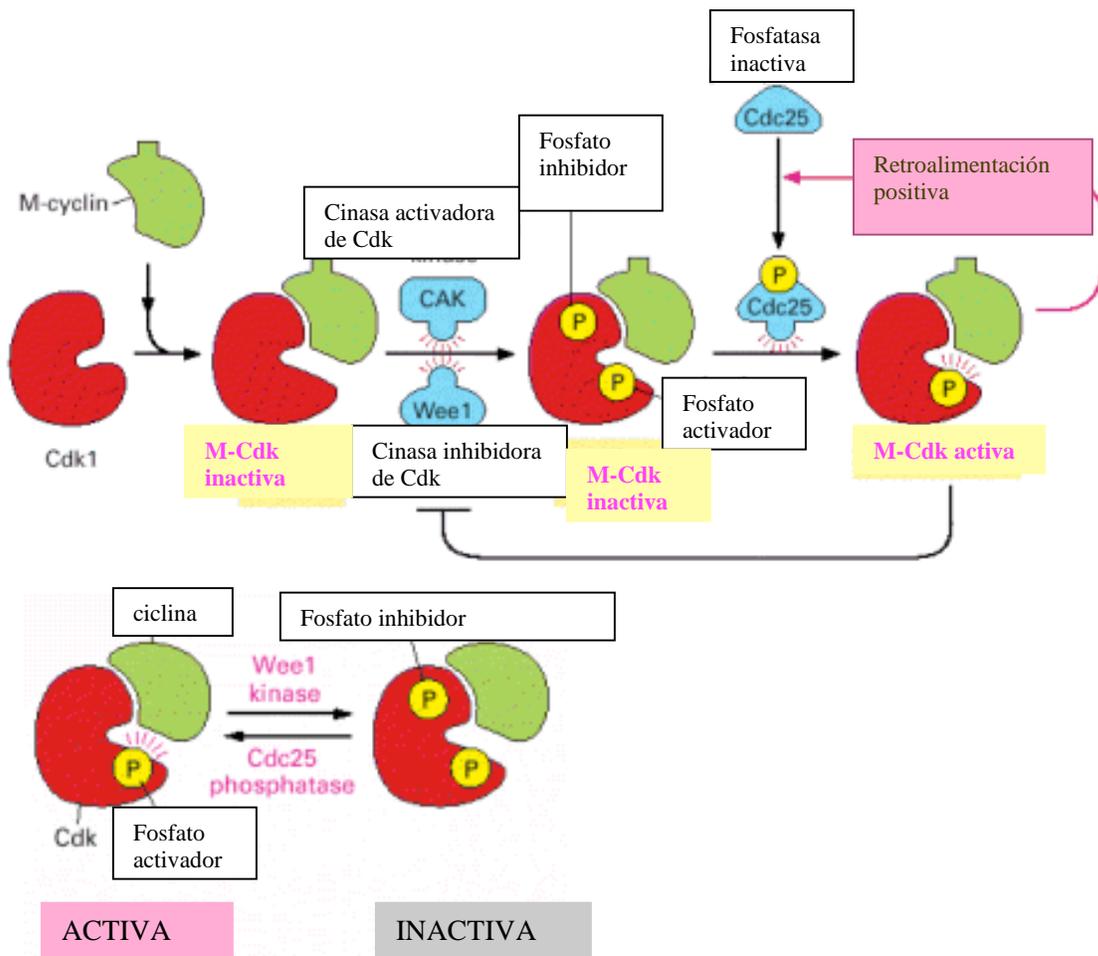


Fig. 29 Esquema mostrando cómo actúan las cinasas y los complejos Cdk1 para activar o inactivar la progresión del ciclo celular hacia la fase de M (Modificado de Alberts et al., 2003).

Los embriones de ratón que presentan deficiencia en LPP3 (mutantes) tienen un retraso en el desarrollo, son más pequeños y tienen defectos en la vascularización de tejidos embrionarios. Por eso nos interesó estudiar proliferación y apoptosis no sólo en los MEFs sino que en embriones de ratón mutantes también.

Para estudiar la proliferación se utilizaron cortes de embriones embebidos en parafina de 6 somitas a los cuáles se les hicieron inmunohistoquímicas contra PCNA. Se compararon las zonas proliferativas entre los embriones mutantes y los silvestres. No se encontraron diferencias en cuanto a la proliferación. Esto puede ser porque a pesar de la ausencia de la enzima en los mutantes, hay otros factores de crecimiento y señales que la compensan. Precisamente como se trata de desarrollo embrionario, la proliferación es un evento clave y muy importante el cual va a estar regulado por muchos factores además de los mitogénicos. También se estudió la apoptosis en los embriones completos de 8.5 días y se encontró que en los embriones mutantes existen zonas de alta apoptosis que no se presentan en los embriones silvestres. Esta región es la zona anterior, donde la mutación podría estar afectando de manera localizada. Incluso en otros embriones que presentan una mutación condicional principalmente en las células germinales también se han observado efectos de la mutación en esa zona (Escalante-Alcalde, datos no publicados). En estos embriones el neuroepitelio no se cierra, lo que podría ser explicado por un incremento de apoptosis en el neuroepitelio. Así como la mutación afecta al proceso de vascularización, la mutación aquí posiblemente también está ocasionando efectos que llevan a las células hacia apoptosis en regiones específicas. Por todo esto, LPP3 puede estar jugando un papel importante en la remodelación y mantenimiento de ciertos tejidos durante el desarrollo embrionario.

Mientras que los MEFs mutantes presentan alteraciones en su ciclo celular, los embriones mutantes no parecen tener esas alteraciones. Por esto es importante mencionar que al trabajar tanto in vitro como in situ, lo que pasa en un sistema no necesariamente pasa en el otro. Debido a que en un embrión tenemos un sistema mucho más complejo donde intervienen demasiadas variables, fue bueno trabajar in vitro para poder tener un control sobre éstas. Por otro lado el trabajar in situ presenta la ventaja de estudiar los procesos en su contexto.

8. CONCLUSIONES:

Los MEFs deficientes en LPP3 presentan una desregulación en el ciclo celular, probablemente debido a que presentan problemas en los puntos de control, lo cual lleva a una proliferación celular descontrolada. Esto sugiere que LPP3 juega un papel importante en la regulación del ciclo celular.

Los embriones mutantes para LPP3 presentan un incremento de muerte celular en zonas específicas, sugiriendo que LPP3 se requiere para la supervivencia de las células en dichas zonas durante el desarrollo embrionario.

9. PERSPECTIVAS:

Debido a que estos resultados arrojan información adicional acerca de los efectos de la mutación es interesante ahondar en algunos aspectos. Después de ver que la ausencia de la enzima afecta la proliferación en los MEFs, los ensayos de proliferación y apoptosis se pueden hacer con otros tipos celulares como por ejemplo las células endoteliales y así se podría tener más información sobre la causa del fenotipo vascular.

También se puede analizar qué tipos celulares son los que se están muriendo en los embriones para conocer más acerca de cómo afecta la mutación y por qué se tienen esos defectos en el desarrollo.

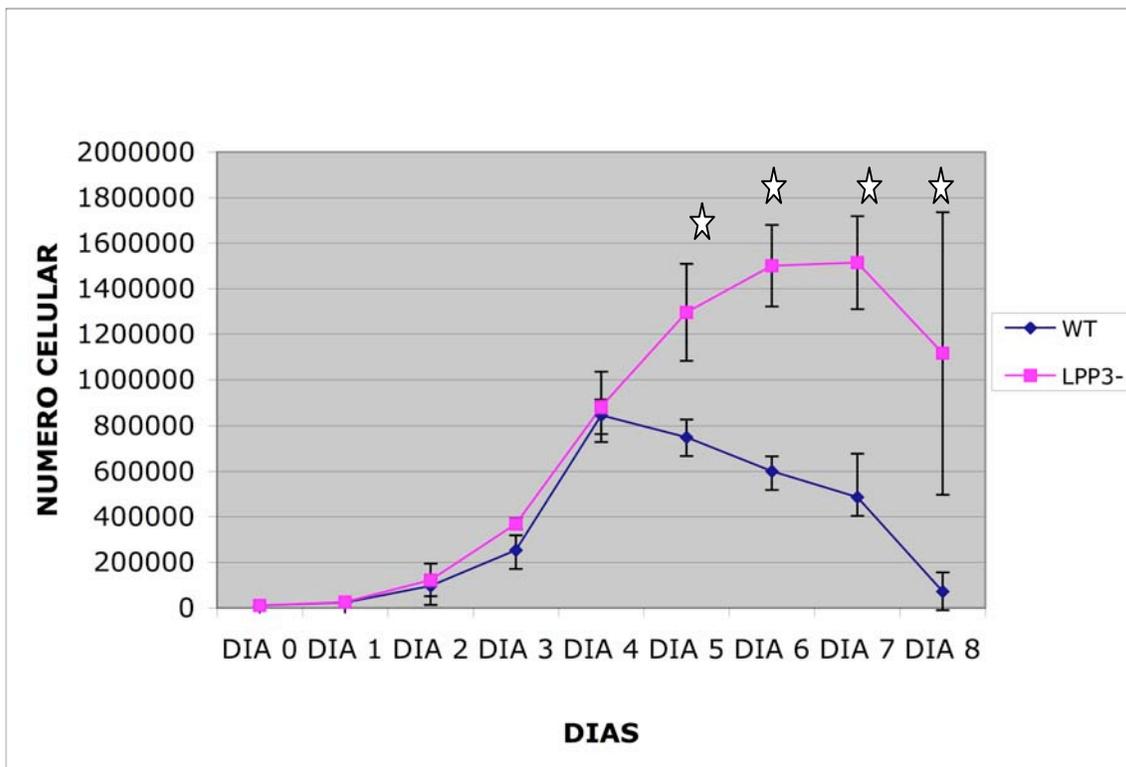
Los resultados del ciclo celular son apenas el comienzo de un estudio donde sería necesario conocer otros cambios en el ciclo celular. Es necesario medir la actividad de ciclinas B, cdc25, wee, p21 y Rb. Para estudiar a fondo qué está pasando en realidad con G2 se pueden sincronizar las células con algún compuesto químico como lo es la afidicolina, la cual inhibe a las células en la fase de S por lo cual al liberarlas al ciclo se puede comparar la duración de G2/M y entender qué está pasando. También se puede

inhibir a las células en la fase M con algún inhibidor del citoesqueleto como la colchicina o citocalasina para estudiar la fase G1 y S con más profundidad.

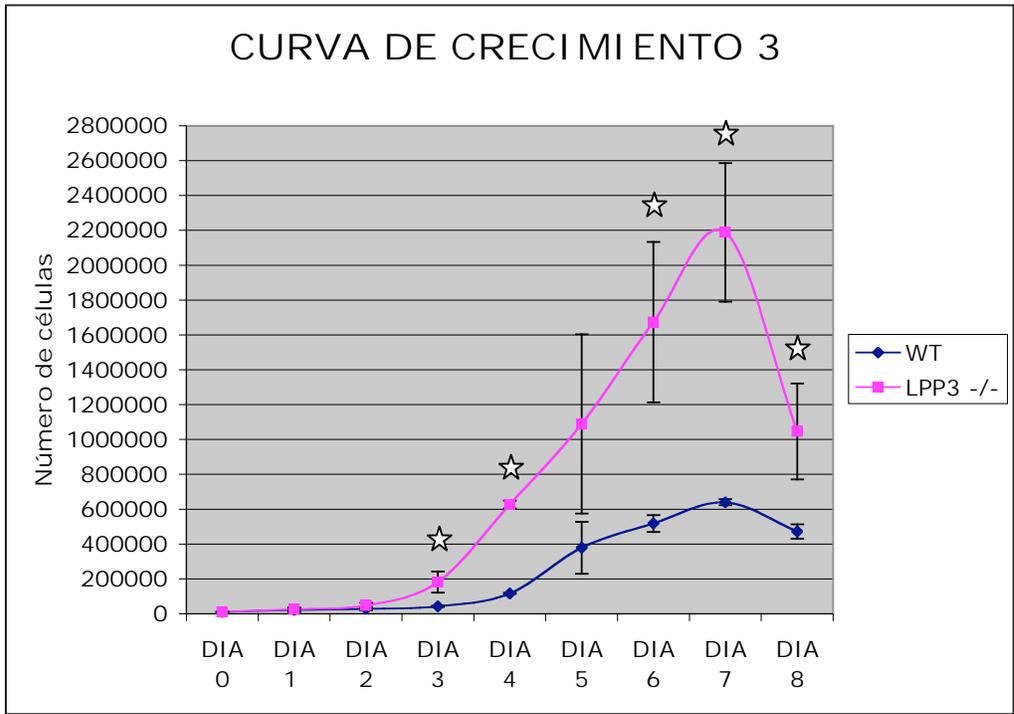
Como se mencionó en la discusión, el tamaño pequeño de los MEFs puede ser una consecuencia del descontrol en el ciclo celular y los problemas con los puntos de control. Para saber si esto también pasa a nivel celular en los embriones mutantes, que son más pequeños, se pueden medir las células marcando la membrana y después analizándolos en el microscopio confocal y posteriormente analizar con software de digitalización de imágenes.

APÉNDICE

10. APÉNDICE



Curva de crecimiento 1. Esta curva se hizo a partir de los datos mostrados en la tabla 3 (apéndice). Las barras representan la desviación estándar. Los MEFs LPP3^{-/-} tienen una cinética de crecimiento mucho más acelerada que los WT. Al hacer una prueba de T student, las estrellas muestran los datos que presentan diferencias significativas, con $p < 0.05$.



Curva de crecimiento 3. Ésta se obtuvo a partir de los datos mostrados en la tabla 4. se muestran las desviaciones estándar. Los fibroblastos LPP3-/- proliferan por más tiempo que los silvestres.☆ diferencias significativas, $p < 0.05$.

APÉNDICE TABLAS

Tabla 2

WT	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia5	dia 6	dia7	dia8
conteo 1	10000	7500	40000	112750	288750	646250	657250	365750	137500
conteo 2	10000	12500	37500	121000	453750	592625	448250	316250	341000
conteo 3	10000	17500	27500	104500	506000	654500	511500	409750	233750
promedio	10000	12500	35000	112750	416166.667	631125	539000	363916.66	237416.66
desv.est.	0	5000	6614.37	8250	113396.52	33596.17	107179.46	46776.95	101799.53

LPP3 -/-	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia7	dia8
conteo 1	10000	20000	35750	203500	585750	665500	1606000	1276000	918500
conteo 2	10000	15000	42500	269500	860750	1328250	1694000	1912500	1303500
conteo 3	10000	17500	52250	233750	684750	723250	1644500	2034000	1075250
promedio	10000	14166.67	33333.33	112750.00	458638.89	626083.33	499583.33	363305.55	270722.22
desv.est.	0	1734.72	9459.83	82147.86	201575.29	380461.21	675760.76	931484.98	542523.88

Tabla 2. Datos obtenidos para la curva de crecimiento 1, se muestra el número de células contadas al hemocitómetro en 3 pozos para cada día. Los promedios

de los conteos se graficaron para obtener la curva de crecimiento 1. También se obtuvieron las desviaciones estándar para los conteos y se muestran en las curvas de crecimiento.

Tabla 3

WT	dia 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
conteo 1	10000	25000	85000	187000	911250	840000	651000	372000	167750
conteo 2	10000	20000	132500	258500	848250	711000	528000	706500	13750
conteo 3	10000	25000	72500	316250	780000	699000	624000	382500	35750
promedio	10000	23333.33	96666.67	253916.67	846500.00	750000.00	601000.00	487000.00	72416.67
desv.est.	0	2886.75	31655.70	64746.78	65642.50	78172.89	64645.19	190165.06	83290.66

LPP3 '/'	dia 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
conteo 1	10000	25000	205000	398750	913000	1419000	1380000	1554000	675000
conteo 2	10000	27500	87500	354750	1017500	1419000	1707000	1695000	1824000
conteo 3	10000	25000	75000	354750	715000	1050000	1416000	1293000	849000
promedio	10000	25833.33	122500.00	369416.67	881833.33	1296000.00	1501000.00	1514000.00	1116000.00
desv.est.	0	1443.38	71719.94	25403.41	153639.46	213042.25	179307.00	203963.23	619287.49

Tabla 3. Datos obtenidos para la Fig. 11, se muestra el número de células contadas al hemocitómetro en 3 pozos para cada día. Los promedios de los conteos se graficaron para obtener la curva de crecimiento. También a partir de éstos se obtuvieron las desviaciones estándar.

Tabla 4

WT	DIA 0	DIA1	DIA 2	DIA3	DIA4	DIA5	DIA6	DIA7	DIA8
conteo 1	10000	8250	27500	46750	118250	547250	464750	660000	487500
conteo 2	10000	24750	19250	42625	112750	321750	559000	630000	503750
conteo 3	10000	33000	38500	38500	118250	266750	529750	630000	425750
promedio	10000	22000	28416.67	42625.00	116416.67	378583.33	517833	640000	472333
desv.est.	0	12602.08	9657.68	4125.00	3175.43	148635.74	48242	17321	41152

LPP3 -/-	DIA 0	DIA1	DIA 2	DIA3	DIA4	DIA5	DIA6	DIA7	DIA8
conteo 1	10000	30250	63250	129250	643500	1251250	1210000	1776750	1006250
conteo 2	10000	30250	46750	247500	635250	1504250	2130000	2570250	793500
conteo 3	10000	16500	33000	167750	602250	514250	1680000	2219500	1339750
promedio	10000	25666.67	47666.67	181500.00	627000.00	1089916.67	1673333.33	2188833.33	1046500.00
desv.est.	0	7938.57	15145.82	60312.21	21827.45	514340.68	460036.23	397637.90	275340.36

Tabla 4. Datos obtenidos para la curva de crecimiento 3, se muestra el número de células contadas al hemocitómetro en 3 pozos para cada día. Los promedios de los conteos se graficaron para obtener la curva de crecimiento 3. También a partir de éstos se obtuvieron las desviaciones estándar.

WT	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
	1300 000	915000	705000	745000	525000
	2300 000	450000	735000	595000	675000
	3300 000	716250	705000	470000	525000
LPP3 -/-	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
	1900 000	795000	3390000	1777500	2647500
	2900 000	1755000	2887500	2970000	3495000
	3900 000	1698750	2256250	3030000	3195000
promedios	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
LPP3 -/-	900000	1416250	2844583.33	2592500	3112500
WT	300000	693750	715000	603333.333	575000

Tabla 5. Datos obtenidos para la Fig. 12, se muestra el número de células contadas al hemocitómetro en 3 pozos para cada día. Los promedios de los conteos se graficaron para obtener la curva de crecimiento LPP3-/- al triple.

Tabla 6 Área celular WT vs. LPP3 -/-

	Área LPP3-/-	Área WT
	2163	8631
	3459	3411
	1608	4840
	2559	4704
	2190	7809
	1386	1314
	1002	3684
	4170	2296
	2415	3860
	1422	3158
PROMEDIO	2237,4	4370,7
DESVEST	982,18	2287,04

Tabla 6. En esta tabla se refleja el área que ocupa cada MEF WT o LPP3-/-; el promedio nos indica que los MEFs WT ocupan alrededor del doble de área que los mutantes.

REFERENCIAS:

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Meter (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th ed., New York: Garland Publishing

Barila D, Plateroti M, Nobili F, Muda AO, Xie Y, Morimoto T, Perozzi G. (1996)

The Dri 42 gene, whose expression is up-regulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein.

J Biol Chem. 1996 Nov 22;271(47):29928-36.

Brindley, D.N., y Waggoner, D.W. (1996) Phosphatidate phosphohydrolase and signal transduction, *Chem. Phys. Lipids* **80**, 45-57.

Brindley,D.N., and Waggoner, D.W. (1998). Mammalian Lipid Phosphate Phosphohydrolases. *J.Biol.Chem.* **273**, 24281-24284.

Burnett, C. & Howard, K. (2003) Fly and mammalian lipid phosphate phosphatase isoforms differ in activity both in vitro and in vivo. *EMBO Rep.* 2003 Aug;4(8):793-9. Epub 2003 Jul 11. Erratum in: *EMBO Rep.* 2005 Mar;6(3):289.

Doherty, S.C., McKeown, S.R., McKelvey-Martin, V., Downes, C.S., Atala, A., Yoo, J.J., Simpson, D.A. and Kaufmann, W.K. (2003) Cell cycle checkpoint function in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95: 1859-68, 2003.

Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291:677–680

Escalante-Alcalde D, Hernandez L, Le Stunff H, Maeda R, Lee, H-S, Cheng Jr G, et al. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development.* **130**:4623–37.

Fang X, Yu S, LaPushin R, Lu Y, Furui T, Penn LZ, Stokoe D, Erickson JR, Bast RC

Jr, Mills GB. (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Nov* 15;352 Pt 1:135-43.

Freshney RI (1994). Quantitation and experimental design. In: *Culture of animal cells*. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp 277-278.

Gómez-Muñoz A., P.A. Duffy, A. Marin, L.O'Brien, H.S. Byun, R. Bittman, D.N, Brindley, (1995) Short-chain ceramid-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides., *Mol. Pharmacol.* 47

Grey A, Chen Q, Callon K, Xu X, Reid IR, Cornish J. (2002) The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology.* Dec;143(12):4755-63.

Humtsoe. O., S. Feng, G.D. Thaddeus, J. Yang, J. Hong and K.K: Wary. (2003) Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VC1P. *EMBO J.* 22 pp. 1539-1554.

Jamal, Z., Martín, A., Gómez-Muñoz, A., and Brindley, D.N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 2988-2996.

Jia Y.-J, M. Kai, I. Wada, F. Sakane and H. Kanoh, (2003). Differential localization of lipid phosphate phosphatases 1 and 3 to cell surface subdomains in polarised MDDK cell. *FEBS Lett.* 552, pp. 240-246.

Kai M., I. Wada, S. Imai, F. Sakane and H. Kanoh. (1996). Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 271, pp. 18931-18938.

Kai M., I. Wada, s.-I. Imai, F.Sakane, H.Kanoh, (1997) Cloning and characterization of

two human isozymes of Mg independent phosphatidic acid phosphatase, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24572-24578

Kanoh, H., Kai, M. and Wada, I. (1997). Phosphatidic acid phosphatase from mammalian tissues: discovery of channel-like proteins with unexpressed functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 56-62.

Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors. (2003) *Cancer Medicine* 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.; c2003

Long J, Darroch P, Wan KF, Kong KC, Ktistakis N, Pyne NJ, Pyne S. (2005). Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *Biochem J.* Oct 1;391 (Pt 1):25-32.

Lyons DA, Guy AT, Clarke JD. (2003) Monitoring neural progenitor fate through multiple rounds of division in an intact vertebrate brain. *Development.* 2003 Aug;130(15):3427-36.

Morris, A.J., Engebrecht, J.E., and Forman, M.A. (1996) *Trends. Pharmacol. Sci* 201, 182-185

Morris KE, Schang LM, Brindley DN. (2006) Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9297-306. Epub 2006 Feb 8.

Pyne S, Pyne NJ (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 349:385-402

Pyne S., Kong K., Darroch P., (2004). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**, 491-501.

Radeff-Huang, J.Seasholtz, TM. Matteo RG, Brown JH. (2004) G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem. Aug 1;92(5):949-66. Review*

Radhika V, Hee Ha J, Jayaraman M, Tsim ST, Dhanasekaran N. (2005) Mitogenic signaling by lysophosphatidic acid (LPA) involves Galpha12. *Oncogene*. 2005 Jun 30;24(28):4597-603.

Russell P., Nurse P. (1987) Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*. May 22;49(4):559-67.

Sciorra, V.A. and Morris , A.J. (1999). Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol.Biol.. Cell* 10, 3863-3876.

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

Siegal, George J.; Agranoff, Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K.; Uhler,MichaelD.,editors. (1999) Philadelphia: Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects 6th ed. Lippincott, Williams & Wilkins.

Tanyi JL, Morris AJ, Wolf JK, Fang X, Hasegawa Y, Lapushin R, Auersperg N, Sigal YJ, Newman RA, Felix EA, Atkinson EN, Mills GB. (2003) The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res*. Mar 1;63(5):1073-82.

Umezu-Goto M, Tanyi J, Lahad J, Liu S, Yu S, Lapushin R, Hasegawa Y, Lu Y, Trost R, Bevers T, Jonasch E, Aldape K, Liu J, James RD, Ferguson CG, Xu Y, Prestwich GD, Mills GB. (2003) Lysophosphatidic acid production and action: validated targets in cancer? *J Cell Biochem.* 2004 Aug 15;92(6):1115-40. Review. Erratum in: *J Cell Biochem.* Oct 1;93(2):427.

Waggoner DW, Xu J, Singh I, Jasinska R, Zhang QX, Brindley DN. (1999) Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jul 30;1439(2):299-316. Review.

Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K.J., Cheng, Y., and Howard, K. (1997) *Nature* 385, 64-67.

Zhang Q.X, C.S. Pilquil, J. Dewald, L.G. Berthiaume and D.N. Brindley. (2000). Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem. J.* 345, pp. 181-184.

Zhang N, Sundberg JP, Gridley T. (2000) Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis* 27:137-140.