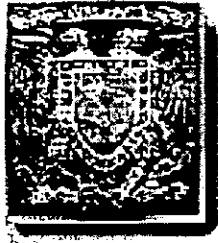


12

03081

2ej.
1978

282592



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACPyP del CCH

El estrés oxidativo y la muerte celular durante el desarrollo
de las extremidades del ratón.

Tesis de posgrado que, para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica,
presenta:

M. en I.B.B. Enrique Salas Vidal

Director de tesis:

Dr. Luis Covarrubias Robles.

Cuernavaca, Morelos

Agosto, 1998.



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.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Comité tutorial:

Dr. Luis Covarrubias
Dr. Alberto Darszon
Dr. Jesús Aguirre

Jurado de examen de grado:

| | |
|-------------|-------------------------|
| Presidente: | Dr. Luis Covarrubias |
| Secretario: | Dr. Mario Zurita |
| Vocal: | Dr. Wilhelm Hansberg |
| Vocal: | Dr. Jesús Chimal |
| Vocal: | Dr. Luis Felipe Jiménez |
| Suplente: | Dr. Roberto Stock |
| Suplente: | Dra. Carmen Beltrán |

RESUMEN

En este trabajo se obtuvo evidencia a favor de que las especies reactivas de oxígeno participan en el control de la muerte celular programada en el desarrollo embrionario del ratón. Se montó un ensayo de cultivo de extremidades embrionarias de ratón *in vitro*, en el cual la individualización de los dígitos ocurre exclusivamente por muerte celular, y probamos el efecto de diferentes antioxidantes (fenol, dimetilsulfóxido y DCDHF-DA). Encontramos que tanto la muerte celular como la regresión del tejido interdigital se previene con los tratamientos. De manera adicional al utilizar dos colorantes redox sensibles (MTT y DCDHF-DA), se observó que algunas células interdigitales presentan un estado de estrés oxidativo, precisamente en las etapas en que ocurre la muerte celular. Pocas células presentaron doble tinción, para los colorantes redox sensibles y para los indicadores de muerte celular (anaranjado de acridina y yoduro de propidio), lo cual sugiere que la generación de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis ocurren en etapas diferentes del proceso de muerte. Además encontramos que muchas células positivas para la tinción con los colorantes redox sensibles no expresan un marcador específico de macrófagos, por lo que las células en estrés oxidativo parecen ser del tejido mesenquimático. Sorprendentemente muchas de las regiones en donde ocurre la muerte celular durante el desarrollo del ratón, presentan células en estrés oxidativo, lo cual sugiere que el aumento en especies reactivas de oxígeno es un requerimiento común para que se lleve a cabo la muerte celular programada en el desarrollo embrionario del ratón.

Por otro lado, en un intento por encontrar la señal que induce a las células del interdígito a entrar en estrés oxidativo, observamos que el ácido retinoico (AR) también participa en el control de la muerte celular interdigital. Sin embargo hasta el momento no ha sido posible correlacionar ambas señales (AR y estrés oxidativo), lo cual se discute a fondo en la presente tesis.

Finalmente se presenta un proyecto en proceso para generar una base de datos de imágenes digitalizadas, de la distribución de la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario del ratón. Estos datos sugieren que los patrones en que ocurre la muerte celular durante el desarrollo de las extremidades son dinámicos, se presentan en gradientes que siguen los principales ejes de las extremidades antero-posterior, ventro-dorsal y disto-proximal. Por otro lado, analizando modelos bidimensionales y tridimensionales del desarrollo de extremidades generados por computadora, encontramos que la individualización de los dedos se lleva a cabo por muerte celular interdigital y por crecimiento diferencial entre los dígitos y los interdígitos. Este último resultado parece indicar que los mecanismos responsables de la separación de los dedos en mamíferos son reminiscentes de los que ocurren en anfibios, en donde la individualización de los dedos ocurre exclusivamente por crecimiento diferencial de tejidos (Cameron y Fallon, 1977. *Dev. Biol.* 55). La correlación de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo con el estudio del papel del estrés oxidativo y del AR en el control de la muerte celular en el desarrollo de las extremidades, se discute al final de la tesis en un modelo que intenta integrar los diferentes grupos de datos.

Vo.Bo.


Enrique Salas Vidal


Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles


ABSTRACT

Evidence presented in this thesis supports the notion that the generation of reactive oxygen species (ROS) is an important event during the course of programmed cell death in mouse development. Using a *in vitro* culture system for mouse embryonic limbs, in which digit individualization occurs exclusively by interdigital cell death, we assayed the effect of different antioxidants (phenol, dimethylsulfoxide or DCDHF-DA), and found that these treatments prevent interdigital cell death and tissue regression. Two ROS-sensitive dyes (MTT and DCDHF-DA), stained interdigits implying that they contain cells under oxidative stress. Very few interdigital cells were doubly stained with the ROS probes and the two cell death indicators (acridine orange and propidium iodide), suggesting that they detect a different stage during the course of apoptosis. Furthermore we found cells stained for ROS that did not express a specific macrophage marker, and in few cases were seen surrounded by a macrophage. Surprisingly, many regions of the midgestation mouse embryo that are undergoing cell death correlated with those that have a markedly higher level of ROS. Our data suggest that the generation of oxidative stress is a common requirement for cell death that occurs during mouse embryonic development.

In an attempt to characterize the signal that triggers the rise in ROS accumulation in the interdigital cells, we found that retinoic acid (RA) also participates in the control of programmed cell death. However we have not yet found evidence correlating both signals (RA and ROS) on the same cascade. These results are discussed in the thesis. Also we present an ongoing effort to generate a digital image data-base of the cell death distribution during mouse development, using the limb development as a starting model for the analysis. We found that cell death patterns are dynamic during limb development, and occur in "waves" that follow the main limb axes, antero-posterior, ventro-dorsal and disto-proximal. Furthermore, using 2D and 3D computer generated models, we found that digit individualization occurs by interdigital apoptosis and by digit-interdigit differential growth, which seems reminiscent to digit individualization in amphibians, where it occurs only by differential tissue growth (Cameron and Fallon, 1977. *Dev. Biol.* 55). A model is shown at the end of the thesis, where these results are correlated with the data related to the ROS and the RA in the control of embryonic cell death.

Vo.Bo.


Enrique Salas Vidal


Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

DEDICATORIAS

A Denhi: Por lo maravilloso que es compartir con ella todos los días de mi vida.

A mis padres: A quienes les debo todo en la vida.

A mis hermanos: Por los grandes momentos que hemos disfrutado y sufrido juntos.

A la memoria de mi abuela Marta: con quien aprendí la magia de la imaginación.

A mis profesores en todos los niveles: que me han influenciado y de quienes he robado un poco para mi trabajo.

A la memoria de Rolando Lara, por su amistad y guía en mis primeros años de trabajo en el laboratorio

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Luis Covarrubias por su asesoría y guía a lo largo del doctorado.

Al comité tutorial y al jurado por sus críticas que me ayudaron a mejorar enormemente, tanto el trabajo experimental como el trabajo escrito.

A todos las compañeras y compañeros del laboratorio (presentes y emigrados) por su apoyo, sus críticas y su amistad.

Al Instituto de Biotecnología, incluyendo a todos, por su apoyo.

Al personal del Bioterio, pero en particular la Dra. Elizabeth Mata y Dra. Graciela Cabeza, por su apoyo y asistencia técnica en el manejo de los ratones.

A la UNAM.

RESUMEN

En este trabajo se obtuvo evidencia a favor de que las especies de oxígeno reactivas participan en el control de la muerte celular programada en el desarrollo embrionario del ratón. Se desarrolló un ensayo de cultivo de órganos *in vitro*, en el cual la individualización de los dígitos ocurre exclusivamente por muerte celular. Probamos el efecto de diferentes antioxidantes (fenol, dimetilsulfóxido y DCDHF-DA) y observamos que con los tratamientos, se evita tanto la muerte celular como la regresión del tejido interdigital. De manera adicional, al teñir extremidades embrionarias de ratón, con diferentes colorantes sensibles a cambios redox (MTT y DCDHF-DA), se observó que algunas células interdigitales presentan un estado de estrés oxidativo, precisamente en las etapas en que ocurre la muerte celular. Pocas células presentaron doble tinción para los colorantes sensibles a cambios redox y para los indicadores de muerte celular (anaranjado de acridina y yoduro de propidio), lo cual sugiere que la generación de especies de oxígeno reactivas y la apoptosis ocurren en etapas diferentes del proceso de muerte. Además, encontramos que muchas células positivas para la tinción con los colorantes sensibles a cambios redox no expresan un marcador específico de macrófagos, por lo que las células en estrés oxidativo podrían ser de tipo mesenquimático. Sorprendentemente, muchas de las regiones en donde ocurre la muerte celular durante el desarrollo del ratón presentan células en estrés oxidativo, lo cual sugiere que el aumento en especies de oxígeno reactivas es un requerimiento común para que se lleve a cabo la muerte celular programada en el desarrollo embrionario del ratón.

Por otro lado, en un intento por encontrar la señal que induce a las células del interdigito a entrar en estrés oxidativo, observamos que el ácido retinoico (AR) también participa en el control de la muerte celular interdital. Sin embargo, hasta el momento, no ha sido posible correlacionar ambas señales, lo cual se discute en la presente tesis.

Finalmente, se presenta un proyecto en proceso para generar una base de datos de imágenes digitalizadas de la distribución de la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario del ratón. Estos datos sugieren que los patrones en los que ocurre la muerte celular durante el desarrollo de las extremidades son dinámicos, se presentan en gradientes que siguen los principales ejes de las extremidades antero-posterior, ventro-dorsal y disto-proximal. Por otro lado, analizando algunos modelos bidimensionales y tridimensionales del desarrollo de las extremidades, generados por computadora, encontramos que la individualización de los dedos se lleva a cabo por muerte celular interdital y por crecimiento diferencial entre los dígitos y los interdígitos. Este último resultado parece indicar

que los mecanismos responsables de la separación de los dedos en mamíferos son semejantes a los que ocurren en anfibios, en donde la individualización de los dedos ocurre exclusivamente por crecimiento diferencial de tejidos (Cameron y Fallon, 1977. Dev. Biol. 55). Se discute al final de la tesis la correlación de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, con el estudio del papel del estrés oxidativo y del AR en el control de la muerte celular en el desarrollo de las extremidades, y se propone un modelo que intenta integrar los diferentes grupos de datos.

ABSTRACT

Evidence presented in this thesis supports the notion that the generation of reactive oxygen species (ROS) is an important event during the course of programmed cell death in mouse development. Using an *in vitro* culture system in which digit individualization occurs exclusively by interdigital cell death, we assayed the effect of different antioxidants (phenol, dimethylsulfoxide or DCDHF-DA) and found that these treatments prevent interdigital cell death and tissue regression. Two ROS-sensitive dyes (MTT and DCDHF-DA) stained interdigits, implying that they contain cells under oxidative stress. Very few interdigital cells were doubly stained with the ROS probes and the two cell death indicators (acridine orange and propidium iodide), suggesting that they detect a different stage during the course of apoptosis. Furthermore, we found cells stained for ROS that did not express a specific macrophage marker, and in few cases were seen surrounded by a macrophage. Surprisingly, many regions of the midgestation mouse embryo that are undergoing cell death correlated with those that have a markedly higher level of ROS. Our data suggest that the generation of oxidative stress is a common requirement for cell death that occurs during mouse embryonic development.

In an attempt to characterize the signal that triggers the rise in ROS accumulation in the interdigital cells, we found that retinoic acid (RA) also participates in the control of programmed cell death. However we have not yet found evidence correlating both signals (RA and ROS) on the same cascade. These results are discussed in the thesis. We present also an ongoing effort to generate a digital image data-base of the cell death distribution during mouse development, using the limb development as a starting model for the analysis. We found that cell death patterns are dynamic during limb development, and occur in "waves" that follow the main limb axes, antero-posterior, ventro-dorsal and disto-proximal. Furthermore, using 2D and 3D computer generated models, we found that digit individualization occurs by interdigital apoptosis and by digit-interdigit differential growth, which seems reminiscent to digit individualization in amphibians, where it occurs only by differential tissue growth (Cameron and Fallon, 1977. Dev. Biol. 55). A model is shown at the end of the thesis, where these results are correlated with the data related to the ROS and the RA in the control of embryonic cell death.

| | |
|--|-----|
| INDICE | |
| i.- CARATULA | i |
| ii.- DEDICATORIAS | iii |
| iii.- AGRADECIMIENTOS | iii |
| iv.- RESUMEN | iii |
| v.- ABSTRACT | iv |
| vi.- INDICE | v |
| vii.- INDICE DE FIGURAS | vi |
| viii.- INDICE DE TABLAS | vii |
| ix.- LISTA DE ABREVIATURAS | vii |
| 1.- INTRODUCCION | 1 |
| 1.1.- LA MUERTE CELULAR | 1 |
| 1.1.1.- La muerte celular por apoptosis y por necrosis | 1 |
| 1.1.2.- Fases de la apoptosis | 1 |
| 1.1.3.- La muerte celular en el desarrollo embrionario | 2 |
| 1.1.4.- Funciones de la muerte celular en el desarrollo embrionario | 2 |
| 1.1.5.- Control de la MCP | 3 |
| 1.1.6.- Algunos métodos utilizados para estudiar la muerte celular | 4 |
| 1.2.- EL ESTRES OXIDATIVO | 4 |
| 1.2.1 Vias de generación de especies de oxígeno reactivas (EOR) y el estrés oxidativo | 4 |
| 1.2.2.- Mecanismos de protección intracelulares contra agentes oxidantes. | 5 |
| 1.2.3.- El estrés oxidativo y la muerte celular | 5 |
| 1.3.- LOS RETINOIDES | 8 |
| 1.3.1.- Estructura y metabolismo de los retinoides | |
| 1.3.2.- Los retinoides en el control de la muerte celular | 8 |
| 1.4.- EL DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES | |
| 1.4.1.- Estructura general de las extremidades | 9 |
| 1.4.2.- Formación de la Cresta Ectodérmica Apical (CEA) y su interacción con la zona de progresión. | 9 |
| 1.4.3.- La muerte celular en el desarrollo de las extremidades | 10 |
| 1.4.4.- El desarrollo embrionario de las extremidades de ratón como modelo de estudio | 10 |
| 2.- HIPOTESIS | 11 |
| 2.1.- HIPOTESIS GENERAL DEL PROYECTO | 11 |
| 3.- OBJETIVOS | 11 |
| 3.1.- OBJETIVO GENERAL | 11 |
| 3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES | 11 |
| 4.- MATERIALES Y METODOS | 12 |
| 4.1.- ANIMALES | 12 |
| 4.2.- DISECCION DE EXTREMIDADES DE EMBRIONES DE RATON | 12 |
| 4.3.- CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EXTREMIDADES DE EMBRION DE RATON | 12 |
| 4.4.- ANALISIS DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA | 12 |
| 4.4.1.- Tinciones vitales. | 12 |
| 4.4.2.- TUNEL | 13 |
| 4.4.3.- Análisis histológico | 13 |
| 4.5.- HISTOLOGIA, INCLUSION EN PARAFINA | 13 |
| 4.6.- TRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS CON POLI L-LISINA | 13 |
| 4.7.- MICROSCOPIA ELECTRONICA | 13 |
| 4.8.- DETECCION DE EOR <i>IN SITU</i> | 13 |
| 4.9.- MICROSCOPIA CONFOCAL | 14 |
| 4.10.- SOBREPONICION DE IMAGENES | 14 |
| 4.11. RECONSTRUCCIONES TRIDIMENSIONALES DE IMAGENES | 14 |
| 4.12.- HISTOQUIMICA PARA LA DETECCION DE CARTILAGO | 15 |
| 4.13.- INMUNOHISTOQUIMICA CON EL ANTICUERPO F4/80, PARA LA DETECCION DE MACROFAGOS | 15 |
| 4.14.- USO DE CELULAS LC3, PARA EL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS <i>IN VIVO</i> DE ACIDO RETINOICO EN EXTREMIDADES EMBRIONARIAS DE RATON | 15 |
| 5.- RESULTADOS | |
| 5.1.- EL DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES EN RATON | 16 |
| 5.1.1.- Desarrollo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de las extremidades del ratón CD1 | 16 |
| 5.1.2.- Desarrollo del esqueleto de las extremidades del ratón <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 17 |
| 5.1.3.- Patrones de muerte celular durante el desarrollo de las extremidades del ratón | 18 |
| 5.2.- EL ESTRES OXIDATIVO Y LA MUERTE CELULAR | 20 |
| 5.2.1.- Estudio del efecto de agentes antioxidantes en la apoptosis en el desarrollo de extremidades del ratón | 20 |
| 5.2.2.- Los interdigitos expresan marcadores de condrogénesis | 20 |
| 5.2.3.- Determinación de regiones en estrés oxidativo <i>in situ</i> , durante el desarrollo de las extremidades del ratón. | 21 |
| 5.2.4.- La apoptosis y el estrés oxidativo en el desarrollo embrionario del ratón CD1 y en el desarrollo temprano en pollo. | 21 |
| 5.2.5.- Identidad de las células en estrés oxidativo. | 22 |
| 5.3.- EL ACIDO RETINOICO Y LA MUERTE CELULAR | 22 |
| 5.3.1.- AR y ROL inducen apoptosis en extremidades de embrión de ratón <i>in vitro</i> . | 23 |
| 5.3.2.- Inhibidores de la biosíntesis del AR reducen la muerte celular y la <i>regresión</i> interdigital, en extremidades de embrión de ratón <i>in vitro</i> . | 23 |
| 5.3.3.- Inhibidores de la biosíntesis del AR, compiten con los efectos provocados por el retinol, pero no con los efectos del AR <i>in vitro</i> . | 24 |
| 5.3.4.- Efecto del ácido retinoico sobre el estado de estrés oxidativo en extremidades de ratón en desarrollo <i>in vitro</i> . | 25 |
| 6.- DISCUSION. | 25 |
| 6.1.- EOR EN EL CONTROL DE LA MUERTE CELULAR | 25 |
| 6.1.1.- El efecto de antioxidantes en el desarrollo de las extremidades <i>in vitro</i> . | 25 |
| 6.1.2.- Identidad de las células en estrés oxidativo. | 26 |
| 6.1.3.- EOR en el control de la muerte celular. | 26 |
| 6.1.4.- ¿La evidencia a favor de que las EOR | |

| | |
|---|-----------|
| participan en el control de la muerte celular es conclusiva? | 28 |
| 6.1.5.- El papel fundamental de las mitocondrias en el control de la muerte celular. | 29 |
| 6.1.6.- EOR en el desarrollo embrionario. | 29 |
| 6.1.7.- El control del estado redox en el desarrollo embrionario. | 30 |
| 6.1.8.- Diferenciación a cartilago de las células interdigitales sobrevivientes. | 31 |
| 6.2.- LOS RETINOIDES EN EL CONTROL DE LA MUERTE CELULAR | 31 |
| 6.2.1.- El ácido retinoico en el control de la muerte celular durante el desarrollo embrionario. | 31 |
| 6.2.2.- Mecanismos de inducción de apoptosis por el AR. | 32 |
| 6.2.3.- Requerimiento del ectodermo para el control de la muerte celular. | 33 |
| 6.2.4.- Requerimiento del ectodermo para la proliferación celular en la zona de progresión. | 33 |
| 6.2.5.- La CEA y su interacción con la zona de progresión. | 34 |
| 6.2.6.- Otras señales involucradas en el desarrollo de la extremidades. | 34 |
| 6.3.- ANALISIS DE IMAGENES Y LA GENERACION DE MODELOS EN EL ESTUDIO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS EXTREMIDADES DEL RATON | 35 |
| 6.3.1.- Análisis de imágenes y bases de datos. | 35 |
| 6.3.2.- Modelos del desarrollo de las extremidades en vertebrados. | 36 |
| 6.3.3.- Inicio de la formación de las extremidades. | 36 |
| 6.3.4.- ¿Quién controla los gradientes de muerte disto-proximal y dorso-ventral en el desarrollo de las extremidades? | 36 |
| 7.- CONCLUSIONES | 39 |
| 8.- REFERENCIAS | 39 |
| 9.- PUBLICACIONES | |

INDICE DE FIGURAS

| |
|---|
| Figura 1. Caricatura en la que se representa la secuencia de los principales cambios ultraestructurales que ocurren, durante la apoptosis y la necrosis. |
| Figura 2. Fases del proceso de apoptosis. |
| Figura 3. Método de TUNEL. |
| Figura 4. Ruta de biosíntesis del ácido retinoico a partir del precursor retinol. |
| Figura 5. Estructura general de la extremidades. |
| Figura 6. Esquema general de la hipótesis del proyecto. |
| Figura 7. Sistema de cultivo <i>in vitro</i> de extremidades de embrión de ratón. |
| Figura 8. Reacción de la sal tetrazolica con superóxido. |
| Figura 9. Mecanismo de acción de DCDHF-DA. |
| Figura 10. Distribución de la muerte celular en el desarrollo de las extremidades. |

| |
|---|
| Figura 11. Análisis de imágenes de la regresión interdigital y crecimiento de los dígitos en extremidades de ratón. |
| Figura 12. Desarrollo <i>in vivo</i> del esqueleto en extremidades de ratón. |
| Figura 13. Sobreimposiciones del desarrollo de los elementos esqueléticos (Fig. 12) sobre extremidades teñidas con anaranjado de acridina. |
| Figura 14. Patrones de crecimiento y regresión interdigital durante el desarrollo de las extremidades del estadio 8 al 12+. |
| Figura 15. Desarrollo <i>in vitro</i> de los elementos esqueléticos en extremidades teñidas con azul alciano. |
| Figura 16. Patrones de muerte en extremidades de ratón de 10, 12, 13 y 14. |
| Figura 17. Cortes ópticos sagitales, generados a partir de las reconstrucciones tridimensionales. |
| Figura 18. Margen distal ventral de extremidades de embrión de ratón teñidas con anaranjado de acridina. |
| Figura 19. Extremidades incubadas con agentes antioxidantes durante 12h y teñidas con azul alciano. |
| Figura 20. Condrogénesis interdigital en extremidades incubadas 12h <i>in vitro</i> , detectada con aglutinina de cacahuete fluoresceinada. |
| Figura 21. Embrión de pollo de 11 somitas teñido con el colorante redox sensible Rodamina 123. |
| Figura 22. Extremidades de ratón, teñidas con AA, incubadas previamente durante 18h <i>in vitro</i> , en medio control, o en presencia de ácido retinoico o retinol |
| Figura 23. Efecto <i>in vitro</i> de inhibidores de alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa sobre la muerte celular en extremidades incubadas por 6h. |
| Figura 24. Competencia de los efectos <i>in vitro</i> entre el ácido retinoico y retinol con los inhibidores de alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, sobre la muerte celular en extremidades incubadas por 18h. |
| Figura-25. Inducción de lacZ en células LC3, por retinoides endógenos (A) y producidos por conversión de retinol (B) en extremidades de embrión de ratón. |
| Figura 26. Patrones de expresión de alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa-2, RAR β y de transglutaminasa, en las extremidades de ratón. |
| Figura 27. Puntos de inhibición de la síntesis del AR por diferentes agentes. |
| Figura 28. Modelos donde se representa como contribuyen la muerte y el crecimiento en la separación de los dígitos. |
| Figura 29. Posible secuencia de eventos e interacciones moleculares que participan en el control de la muerte celular interdigital y el crecimiento de los dígitos. |

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Longitudes de onda de absorción y emisión, de los diferentes fluorógenos utilizados en el proyecto.

Tabla 2. Efecto de los antioxidantes sobre la muerte interdigital, medida con base en la tinción con el colorante anaranjado de acridina (AA), y su relación con la formación ectópica de cartilago, en extremidades de embriones de ratón *in vitro*.

Tabla 3. Efecto de diferentes fármacos sobre la actividad de alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa.

Tabla 4. Efectos sobre la muerte celular en extremidades *in vitro*, con tratamientos dobles.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Anaranjado de acridina.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ADH: Alcohol deshidrogenasa.

AER: Apical ectodermal ridge.

ALDH: Aldehído deshidrogenasa.

AR: Acido retinoico.

AR9c: Acido retinoico 9 cis.

9cAR: Acrónimo en inglés de 9cAR.

ARtt: Acido retinoico todo trans.

atRA: Acrónimo en inglés de ARtt.

BMP: Bone morphogenetic protein (s).

BSA: Albúmina de suero bovina.

°C: Grados centígrados.

CEA: Cresta ectodérmica apical.

D C D H F - D A : 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate.

ddAR: 3,4-didehído ácido retinoico.

ddRA: 3,4-didehído retinoic acid.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

dpc: Dias post coito.

EOR: Especies de oxígeno reactivas.

FGF: Fibroblast growth factors.

GPS: Glutamina, penicilina G y estreptomycin.

GSH: Glutatión en su forma reducida.

hr: Hora (s).

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HO₂·: Radical hiperoxi.

IL-beta: Interleucina-1beta.

MCP: Muerte celular programada.

M: Molar.

min: Minutos.

mg: Miligramos.

ml: Mililitros.

μl: Microlitros.

μg: Microgramos.

mM: Milimolar.

μm: Micrometros.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

NBT: Nitro blue tetrazolium (sal tetrasólica).

NGF: Nerve growth factor.

nm: Nanómetros.

p/v: peso/volumen.

O₂: Oxígeno molecular.

O₂·-: Superóxido.

.OH: Radical hidroxilo.

PBS: Amortiguador de fosfatos salino.

RAR: Receptores al ácido retinoico. Acrónimo en inglés igual. Hay tres formas α, β y γ.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

RRX: Receptores de retinoides X (desconocidos).

Hay tres formas α, β y γ.

RXR: Siglās en Inglés de RRX.

ROL: Retinol.

ROS: Reactive oxygen species.

S: Estadios según Wanek et al (1989). Los estudiados comprenden del S9 al S12.

SBF: Suero bovino fetal.

SOD: Superóxido dismutasa.

t.a.: Temperatura ambiente.

TGFβ: Transforming growth factor beta.

TNF: Tumor necrosis factor.

TUNEL: Tdt-mediated X-dUTP nick end labeling.

YP: Yoduro de propidio.

2D: Dos dimensiones.

3D: Tres dimensiones.

Escribí este libro durante las interminables horas que empleé esperando a que mi mujer acabara de vestirse para salir. Si hubiera andado siempre desnuda, nunca habría tenido la oportunidad de escribirlo.

Groucho Marx (1976).

1. INTRODUCCION

LA MUERTE CELULAR

La muerte celular por apoptosis y por necrosis

La muerte celular es un fenómeno biológico que se ha encontrado en todos los organismos pluricelulares estudiados, que ocurre de manera natural en el desarrollo embrionario y durante el recambio celular en animales adultos (Vaux, Haeccker y Strasser, 1994; Clarke, 1990). La muerte celular participa además en diferentes procesos patológicos como: en la disminución de las células T en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en la degeneración neuronal del síndrome de Huntington y en la enfermedad de Alzheimer (Mc Conkey y Orrenius, 1994), así como en el cáncer, en donde hay una disminución en la sensibilidad de las células cancerosas a morir lo cual favorece la formación de tumores (Fisher, 1994).

La muerte celular puede ocurrir por dos procesos generales diferentes (Figura 1). Se ha propuesto que la forma natural más común de eliminación celular ocurre por apoptosis (del griego apo-TEO-sis, que se refiere a la "caída natural de las hojas en otoño"), la cual depende de un proceso dirigido genéticamente que se encuentra latente en todas las células (Raff *et al.*, 1993). Al segundo tipo de muerte se le conoce como necrosis (del griego nekrosis, que significa mortificación o privar de vitalidad) y se considera que sólo ocurre de manera patológica por un daño severo debido a cambios en el ambiente que afectan de manera letal a la célula (Kerr y Harmon, 1991; Clarke, 1990).

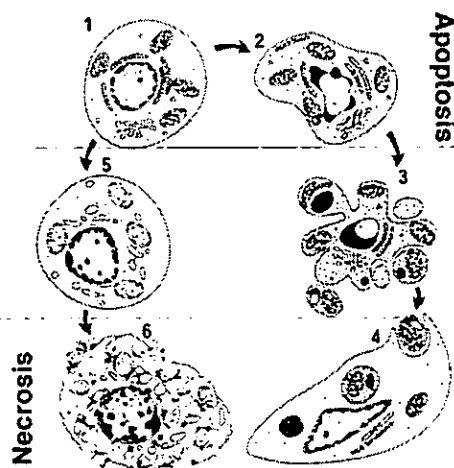


Figura 1. Diagrama en el cual se representa la secuencia de los principales cambios ultraestructurales que ocurren durante la apoptosis (1-4) y la necrosis (5-6). Tomado y modificado de Tomei y Cope (1991).

La célula que muere por apoptosis se caracteriza inicialmente por que adquiere una

forma redondeada y se separa de las células contiguas (Fig. 1.1). A nivel del núcleo, la cromatina se compacta formando "masas", aparentemente de mayor densidad, que incrementan en número (Figura 1.2) hasta que el núcleo es francamente picnótico (i.e. condensado) (Fig. 1.3) (Clarke, 1990). Durante este proceso, el ADN se fragmenta y se observa por electroforesis en geles de acrilamida, un patrón característico de "escalera". Por otro lado, la membrana celular presenta numerosas convoluciones, que se internalizan profundamente en el citoplasma (Fig. 1.3), que posteriormente provocan la fragmentación de la célula. Cada fragmento posee membrana e incluso puede contener organelos celulares que preservan su estructura aún después de ser fagocitados (Fig. 1.4). Por su parte, los lisosomas normalmente permanecen intactos, aún después de la fragmentación de la célula. Durante la muerte por apoptosis, el contenido celular no es vertido al espacio extracelular y no se genera una respuesta de tipo inflamatoria. En contraste, durante el proceso de muerte por necrosis, la cromatina se condensa en masas poco definidas, los organelos se hinchan, los lisosomas pierden su continuidad y vierten sus componentes al citoplasma (Fig. 1.5). Posteriormente la membrana se rompe y la célula se desintegra, por lo que el citoplasma y los fragmentos de organelos escapan al espacio extracelular (Fig. 1.6), lo que provoca una respuesta de tipo inflamatoria (Kerr y Harmon, 1991). En condiciones naturales la vía más común de muerte es la de apoptosis. Sólo en casos extremos de daño celular se lleva a cabo el proceso de necrosis. En lo ulterior se utilizará el término muerte celular y apoptosis de manera indistinta y, al referirnos a muerte por necrosis, utilizaremos específicamente éste término.

Fases de la apoptosis

En años recientes se ha generado una gran cantidad de evidencias a favor de que la apoptosis es un proceso activo, regulado a nivel genético. Debido a que el control del proceso parece estar ampliamente conservado en la evolución (Martin y Green, 1995), se ha obtenido mucha información sobre los mecanismos genéticos que lo controlan, utilizando modelos animales como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Hedgecock *et al.*, 1983.) del cual se han encontrado genes homólogos funcionales que controlan la muerte celular que ocurre en otros organismos (Hengartner y Horvitz, 1994). La muerte celular se ha dividido en cuatro fases diferentes (Fig. 2): a) la fase de activación, en donde la célula decide si va a morir o si seguirá algún otro proceso como proliferar o diferenciarse; b) la fase de ejecución, que lleva a que la célula presente los cambios característicos descritos en la Fig. 1; c) la fase de engullimiento, en la que los fragmentos de la célula en proceso de muerte son fagocitados; d) la fase de degradación, en donde

ocurre. Por ejemplo, mutantes deficientes de muerte celular en *C. elegans*, presentan un desarrollo y un lapso de vida normal, aún cuando tienen aproximadamente alrededor de un 15% más de células que los organismos tipo silvestre (Ellis *et al.*, 1991). Mutantes de *Drosophila* en el gene *reaper*, en los que virtualmente desaparece toda la muerte celular durante su desarrollo, presentan un número mayor de células pero no logran eclosionar del estadio de pupa (White *et al.*, 1994). En Mamíferos no se han descrito mutantes similares a los estudiados en *C. elegans* o en *Drosophila*. Sin embargo, los ratones transgénicos sin caspasa 3 (CPP32) mueren antes de nacer y presentan un número mayor de células en el cerebro comparados con el silvestre (Kuida *et al.*, 1996). Lo anterior parece indicar que, al menos en artrópodos y vertebrados, la muerte celular se requiere para el desarrollo embrionario normal.

La MCP parece jugar varias funciones durante el desarrollo embrionario. Algunos autores han clasificado dichas funciones de forma diferente (Glucksman, 1951; Jacobson *et al.*, 1997). Algunas propuestas son las siguientes:

(1) Moldear estructuras o formas. La MCP es importante para dar forma a diferentes órganos y estructuras en el desarrollo, como durante la individualización de los dígitos (Saunders, 1966), la fusión de estructuras como el esternón (Saunders, 1966) y del paladar (Glucksman, 1951) y también durante el proceso de cavitación para la formación de la oquedad preamniótica en los embriones de ratón (Coucovanis y Martin, 1995). Sin embargo, en poco casos se ha evaluado en detalle la importancia de la muerte en el desarrollo de los órganos (Milligan *et al.*, 1995; Weil *et al.*, 1997).

(2) Remover estructuras "transitorias". En el desarrollo de algunos organismos existen estructuras transitorias que son necesarias en una etapa pero son removidas conforme avanza el desarrollo. Por ejemplo, la regresión de la cola y las branquias en la metamorfosis en los anfibios (Tata, 1994) o en la regresión de los túbulos mesonéfricos en los mamíferos (Gilbert, 1994).

(3) Controlar el número de células. Hay órganos en los cuales se producen una gran cantidad de células y posteriormente se reduce el número por muerte celular. En el caso del sistema nervioso, aproximadamente el 50% de las células que se producen son eliminadas. Se ha considerado que sólo sobreviven las células capaces de hacer contacto con las células blanco y las demás son eliminadas (Barde, 1989; Oppenheim, 1991).

(4) Eliminar células anormales, mal ubicadas, no funcionales, o "dañinas". Es importante la muerte de células potencialmente peligrosas para el organismo, como durante el desarrollo del sistema inmune, en donde se eliminan las células que potencialmente generarían reacciones auto-inmunes (Golstein,

1989).

(5) Producir células diferenciadas sin organitos. Hay algunos tipos celulares en los que la diferenciación terminal requiere que las células mueran, como es el caso de los queratinocitos. En estos la sobreexpresión de *bcl-2* inhibe su diferenciación terminal *in vitro* (Nataraj *et al.*, 1994).

(6) Suplir deficiencias nutricionales de tejidos adyacentes. Algunos autores han sugerido que durante la gastrulación en el pollo, la muerte de las células endodérmicas con vitelo se requiere para que haya una degradación y liberación de los derivados del vitelo y así suplir las deficiencias nutricionales de los tejidos adyacentes (Glucksman, 1951).

(7) Producir un sustrato de fibras para otras células. Por otro lado, se ha propuesto que la muerte de algunas células permite la formación del sustrato requerido por otras células para su migración o crecimiento (Glucksman, 1951).

Control de la MCP

Se desconocen los mecanismos que controlan la decisión de cuáles células son removidas por la MCP y cuales sobreviven en el desarrollo embrionario. Existe una gran variedad de factores que participan en la activación de la MCP (Steller, 1995).

Evidencia experimental con la droga estaurosporina (inhibidor de protein-quinas, calcio/fosfolípidos dependiente) y ciclohexamida (inhibidor de la síntesis de proteínas) de manera simultánea, muestra que todas las células animales, incluso las células embrionarias, expresan de manera constitutiva la maquinaria requerida para que se lleve a cabo la muerte celular (Ishizaki *et al.*, 1995; Weil *et al.*, 1996), por lo que, en principio, la muerte celular puede ocurrir de manera autónoma. Estos datos sugieren que las células vivas requieren de factores de sobrevivencia que se contrapongan a la maquinaria de muerte, que se encuentra en estado latente. Trabajos recientes indican que la MCP es regulada en la fase de activación del proceso por señales que provienen de otras células. Los tipos de señales propuestas son: (a) señales activadoras que inician al programa de muerte, como sería el caso del factor de necrosis tumoral (Wong *et al.*, 1989); (b) señales supresoras de la MCP, como el factor de crecimiento neural, que es secretado por las células blanco en cantidades limitantes y sólo las neuronas simpáticas, que hacen contacto con ellas, pueden sobrevivir (Levi-Montalcini, 1987).

Las señales que regulan la muerte durante el desarrollo en los diferentes tejidos embrionarios son en su mayoría desconocidas, sin embargo, la combinación así como la concentración tanto de las señales que activan y las que reprimen la muerte celular, modulan la decisión de las células para que sobrevivan o mueran (Jacobson *et al.*, 1997).

menor debido a que normalmente las enzimas participantes se encuentran saturadas a la presión normal del oxígeno (Fisher, 1987). Sin embargo el dos por ciento de EOR que escapa de la cadena respiratoria (Ames, Shigenaga y Hagen, 1993) puede tener un efecto considerable bajo ciertas condiciones. Al aumentar la presión parcial del oxígeno, la generación de EOR por autoxidación puede provocar un aumento de EOR proporcional al incremento de la concentración de oxígeno (Fisher, 1987).

Mecanismos de protección intracelulares contra agentes oxidantes.

Defensas naturales intracelulares.

1. Mecanismos de secuestro. Uno de los mecanismos de defensa, que utilizan las células para prevenir el efecto de las EOR, es el secuestro de las enzimas y las moléculas que forman EOR, para que no se generen libremente en toda la célula. Por ejemplo, se secuestran algunas de las enzimas que generan peróxido de hidrógeno en los peroxisomas. El otro mecanismo de secuestro es quelar el hierro y el cobre mediante proteínas como la transferrina y la ferritina o la ceruloplasmina, para así evitar que estos metales libres lleven a cabo la reacción de Fenton en el citoplasma (Ames *et al.*, 1993).

2. Antioxidantes:

Por otro lado, existen mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) encargados de evitar que los EOR reaccionen con las diferentes macromoléculas celulares. Las catalasas, previenen la acumulación de peróxido de hidrógeno por la dismutación del H₂O₂ en agua y oxígeno molecular, se encuentra localizadas principalmente en los peroxisomas pero se encuentra también en el citosol (Fridovich, 1987). Otras enzimas importantes son las superóxido dismutasas (SOD), que son metaloproteínas encargadas de la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Se han descrito tres formas de SODs las cuales presentan una distribución característica y una asociación con metales particulares: la SOD que presenta cobre y zinc (CuZnSOD) que se encuentra principalmente en el citosol de las células eucariotas, la SOD que contiene manganeso (MnSOD), que se ha encontrado tanto en procariotas como en las mitocondrias de eucariotas, y la SOD con hierro (FeSOD), que se ha reportado en procariotas (Wong *et al.*, 1989). Otro grupo de enzimas encargadas de la detoxificación por peróxido a agua y oxígeno molecular, son las peroxidasas, que de manera adicional pueden reducir peróxidos de lípidos a sus alcoholes correspondientes (Toussaint *et al.*, 1993), que se encuentra localizado en mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y en el citoplasma (Singh *et al.*, 1994).

Una de las principales vías antioxidantes no enzimáticas descrita es la de la cisteína, que

puede ser tomada del medio extracelular vía sistema de transporte preferente para la alanina, serina y la cisteína para convertirlo a glutatión (Sandstrom *et al.*, 1994; Meister, 1983). El glutatión funciona como un amortiguador redox intracelular y, en conjunción con la glutatión peroxidasa, como un atrapador de EOR (Sandstrom *et al.*, 1994). La cisteína *per se* tiene también un papel como agente antioxidante, aunque es menos eficaz que el glutatión, al reducir directamente los radicales libres, o al actuar como precursor de proteínas antioxidantes, ricas en cisteína, como la metalotioneína (Ratan *et al.*, 1994). El glutatión es un tripéptido (gamma-glutamil-L-cistein-glicina) que se encuentra ampliamente distribuido en diversos tejidos y es mantenido (99%) en su forma reducida (GSH) por medios enzimáticos. Se considera que el glutatión preserva la integridad celular debido a que incrementa el poder antioxidante de la célula y es capaz de reducir peróxidos y radicales libres, así como de mantener las uniones disulfuro de las proteínas en su estado reducido (Ratan *et al.*, 1994). La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de peróxidos orgánicos por el glutatión (Greenlund, 1995).

Otras moléculas que funcionan como antioxidantes intracelulares son la vitamina A (retinal), la vitamina C (ascorbato), la vitamina E (tocoferol) (Ames *et al.*, 1993) y los carotenos, que pueden ser ingeridos en la dieta y tienen una actividad antioxidante particularmente contra el oxígeno en singulete. Muchos carotenos pueden ser metabolizados para dar origen a la vitamina A (retinal) (Ames *et al.*, 1993).

3. Inhibición de la síntesis de proteínas. La inhibición de la síntesis de proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo, pueden provocar una redistribución de la cisteína, llevando a su vez a un incremento de las posas de glutatión. Algunos autores han considerado éste como un mecanismo que genera poder reductor intracelular (Ratan *et al.*, 1994)

A pesar de que el metabolismo de las EOR se ha caracterizado ampliamente, aún se desconoce en detalle como se lleva a cabo el control del balance redox durante el desarrollo embrionario. El trabajo expuesto en la presente tesis llama la atención sobre la posibilidad de que durante el desarrollo en vertebrados, existan mecanismos muy finos en el control del estado redox celular, que participan en el proceso de la muerte. En el siguiente apartado se da un panorama general de la evidencia a favor de que la producción de EOR participa en el control de la muerte celular.

El estrés oxidativo y la muerte celular

Se sabe que el oxígeno y algunos de sus derivados son capaces de provocar daño a los diferentes componentes celulares por medio de la oxidación de sus macromoléculas, como el ADN,

del pico de producción de EOR, se evita la muerte celular. De manera adicional, al añadir el factor NGF al cultivo, poco después del pico máximo de producción de EOR, se previene la muerte celular. En conjunto, estos reportes sugieren que la producción de EOR, funciona como una señal temprana del programa de muerte, y no como un agente ejecutor del proceso (Greenlund *et al.*, 1995). Esta estrategia de proteger de muerte celular al tratar con antioxidantes ha probado ser efectiva en otros sistemas:

a) En líneas celulares. En hibridomas de células T, se induce la apoptosis por tratamientos con la proteína mielina básica o bien al cultivarlas en presencia de células irradiadas, presentadoras de antígenos espláncicas. Las células T que normalmente mueren en estas condiciones, son protegidas al ser incubadas con N-acetilcisteína (NAC), el cual es un precursor del glutatión (Sandstrom *et al.* 1994). Otro ejemplo es la línea celular L929 de fibrosarcoma de murino, en la que se induce muerte el TNF, y puede ser inhibida por tratamientos con glutatión (Goossens *et al.*, 1995). Por otro lado, en la línea celular DLD-1, la sobreexpresión de p53 induce apoptosis. En este sistema se observa un pico de producción de EOR previo a la muerte y ésta se bloquea por la adición del antioxidantes (Polyak *et al.*, 1997). Se ha observado algo similar en células de músculo liso de humano y de rata, en donde la sobreexpresión de p53 que induce muerte celular, se evita por tratamientos con NAC (Johnson *et al.* 1996).

b) En cultivos primarios de células provenientes de pacientes con diferentes patologías. Por ejemplo, la proteína β amiloide es citotóxica para células nerviosas y se ha asociado como una de las moléculas causantes de el síndrome de Alzheimer. En cultivos primarios de células nerviosas de la corteza cerebral de embriones de rata, se induce la muerte celular por tratamientos con la proteína β amiloide; esta muerte se bloquea por la adición de antioxidantes como la vitamina E (Behl *et al.*, 1994). Por otro lado, la degeneración, *in vitro*, de células de la corteza en cultivos primarios de tejidos de pacientes con el síndrome de Down, se evita por la adición de catalasa, de vitamina E o de NAC (Busciglio y Yanker, 1995). Se ha asociado también, al estrés oxidativo provocado por mutaciones en la enzima superóxido dismutasa Cu/Zn (CuZnSOD), con el síndrome de la esclerosis amiotrófica lateral, la cual se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras. En cultivos de estas células mutantes, se evita la muerte celular por la sobreexpresión de CuZnSOD (Wiedau-Pazos, *et al.*, 1996).

c) En el desarrollo embrionario. Utilizando a células troncales derivadas de la masa celular interna de embriones de ratón, se encontró que el ácido retinoico, induce apoptosis *in vitro*. La muerte se evita por la adición de agentes antioxidantes como la catalasa, la SOD o el fenol

(Castro-Obregón y Covarrubias, 1996). Estos resultados sugieren que durante el desarrollo embrionario la muerte celular puede ser regulada por EOR.

d) Células vegetales. Plantas mutantes de *Arabidopsis*, como la *lsd1*, al ser expuestas a compuestos químicos que provocan estrés oxidativo, presentan una muerte celular acelerada, comparadas con plantas con genotipo silvestre. El incremento en la muerte puede ser evitado por la inoculación con SOD (Jabs *et al.*, 1996).

Por otro lado, existe evidencia adicional de que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en el control de la muerte celular. Algunas moléculas implicadas en el control de la muerte celular *in vivo*, se ha encontrado que participan en la regulación del estado redox intracelular. Por ejemplo, el proto-oncogene *bcl-2* se conoce ampliamente por su actividad antiapoptótica en diferentes tipos celulares (Korsmeyer, 1992). La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en animales transgénicos, provoca la acumulación de células debido a una disminución en la muerte (McDonnell *et al.*, 1989). Por el contrario, en ratones deficientes del gen *bcl-x*, que es un miembro de la familia de *bcl-2* presentan muerte masiva de células de la línea hematopoiética y de neuronas (Motoyama *et al.*, 1995). Sin embargo, la evidencia más importante a favor de que posiblemente Bcl-2 participa en una vía antioxidante es aportada por la disrupción génica de *bcl-2*, en donde los ratones tenían pelo gris, lo que parece explicarse por un aumento en la oxidación de los precursores de la melanina del pelo (Nakayama *et al.*, 1994). Algunos grupos han propuesto que la actividad antiapoptótica de Bcl-2, reside parcialmente en que tiene actividad antioxidante, ya que protege a linfocitos pro-B de murino FL5.12 *in vitro* del los efectos letales del peróxido de hidrógeno, y evita la peroxidación de lípidos (Hockenbery *et al.*, 1993a). De manera adicional, la sobreexpresión *bcl-2*, en células neurales provoca un cambio en su potencial redox hacia un estado más reducido, sin afectar mayormente la actividad de las principales enzimas antioxidantes celulares, pero si de moléculas como los piridin nucleótidos y de las posas de glutatión (Ellerby *et al.*, 1996). Por otro lado, otros grupos han propuesto que Bcl-2 es en realidad una molécula prooxidante que genera estados parciales o temporales de estrés oxidativo, que no son suficientes para activar la apoptosis, pero si para inducir la expresión de moléculas antioxidantes (Steinman, 1995). Independientemente del mecanismo por medio del cual Bcl-2 provoca un cambio en el estado redox intracelular, los reportes antes mencionados, apoyan la hipótesis de que, el estado redox y/o las EOR, participan en el control de la apoptosis de manera natural.

Otro grupo de evidencia a favor del papel que juegan las EOR en la muerte celular, son los reportes de los mecanismos mediante los cuales

inducido depende del estadio del desarrollo de los embriones (Sulik *et al.*, 1988; Alles y Sulik 1989).

Evidencia reciente sugiere que el mecanismo de control de la muerte mediada por retinoides es a través de la interacción de estos ligandos con sus receptores. A pesar de que el receptor RAR β se expresa ampliamente en el tejido interdigital durante el desarrollo de las extremidades del ratón, precisamente en las regiones en que ocurre la muerte celular en abundancia (Dollé *et al.*, 1989), la expresión de este receptor en estas regiones obedece más a que el receptor RAR β , presenta regiones responsivas al ácido retinoico en su promotor y es posible que el ácido retinoico sea producido localmente, y no parece estar relacionado con el control de la muerte en este tejido (Niederreither *et al.*, 1997). Particularmente interesante es el hecho de que *in vitro*, los retinoides que activan preferentemente a los receptores RAR α y el RAR γ , inducen apoptosis y en los ratones que tienen mutados ambos receptores así como al receptor RRX α , presentan una regresión interdigital y muerte celular muy limitada, que provoca una deficiente separación de los dedos (Kastner *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1998).

Por otro lado, estudios previos en el laboratorio, utilizando como modelo a las células troncales embrionarias, en condiciones de cultivo que inducen la formación de cuerpos embrioides, mostraron que al incubarlos en presencia de ARtt se induce un incremento en la muerte. La muerte observada esta asociada a un incremento en la formación de EOR, además la muerte inducida por ARtt puede ser prevenida por la adición de agentes antioxidantes (Castro-Obregón y Covarrubias, 1996). Estos resultados nos llevó a proponer que la muerte celular que ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario, es inducida por el ácido retinoico, y que las EOR funcionan como un mediador de la señal del AR para iniciar el programa de muerte.

EL DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES

Estructura general de las extremidades.

Las extremidades en el embrión de ratón, se forman a partir de protuberancias que se proyectan de los costados de la pared lateral del cuerpo. Consisten básicamente de células mesenquimáticas envueltas por una capa de ectodermo. En esta estructura básica, existen regiones que regulan tanto el crecimiento, como la diferenciación, la muerte y la formación de patrones de las extremidades. Las regiones mejor caracterizadas se han denominado como, la cresta ectodérmica apical, la zona de progresión y la zona con actividad polarizante (Figura 5a) (Tickle y Eichele 1994).

En la inducción de la formación de las extremidades participan varias señales, como el ácido retinoico (Stratford *et al.*, 1996) y diferentes

miembros de la familia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF). Inicialmente se reportó que FGF-1, FGF-2 y FGF-4 al ser administrados por medio de implantes en el flanco de embriones de pollo generan extremidades extras (Cohn *et al.*, 1995). Parece sin embargo que los miembros de los FGFs involucrados en la inducción de la formación del miembro, tanto en pollos y como en ratones son el FGF-8 (Mahmood *et al.*, 1995; Crosley y Martin, 1995) y el FGF-10 (Ohuchi *et al.*, 1997), y los que mantienen el crecimiento proximo-distal son el FGF-8 (Mahmood *et al.*, 1995; Crosley y Martin, 1995) y el FGF-4 (Niswander *et al.*, 1993).

Cabe resaltar el hecho de que el ácido retinoico parece participar en diferentes eventos durante el desarrollo embrionario, no solo durante la inducción de la formación de las extremidades y la muerte interdigital como se mencionó anteriormente. Parecen participar además en el desarrollo de los elementos esqueléticos mediado por la interacción con diferentes RARs y RRXs (Kastner *et al.*, 1997).

Formación de la Cresta Ectodérmica Apical (CEA) y su interacción con la zona de progresión.

El mesodermo de la región en que se formarán las extremidades, induce la formación de la estructura denominada CEA (Saunders y Reuss, 1974; Carrington y Fallon, 1984) (Fig. 5), la cual esta formada por un epitelio engrosado (Todt y Fallon, 1984). Existen dos "compartimentos" ectodérmicos en la región en que se formarán las extremidades, uno dorsal y otro ventral; ambos

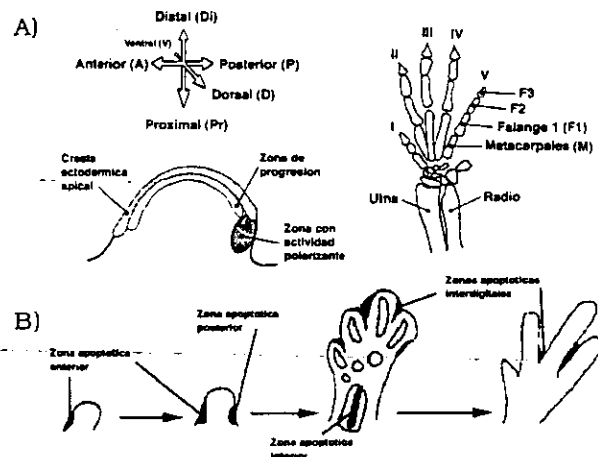


Figura 5.- a) Estructura general de la extremidades. Se muestran los tres ejes que presenta, las principales regiones que regulan el crecimiento, la diferenciación y la formación de patrones de las extremidades, y los elementos esqueléticos que presentan las extremidades anteriores. b) Principales regiones de muerte descritas por otros autores (citado en Gilbert, 1994). Se cambió el nombre de zonas "necróticas" por zonas apoptóticas.

"compartimentos" contribuyen a la formación de la CEA, con células que migran a partir de ellos para originar la cresta (Altabel *et al.*, 1997). La existencia de los compartimentos dorsal y ventral, sugieren que existe una región límite en la cual se forma la CEA (Laufer *et al.*, 1997b, Rodríguez-Esteban *et al.*, 1997).

Existe una interdependencia entre la CEA y la zona de progresión. Si la CEA es removida, el mesodermo subyacente (o zona de progresión), deja de proliferar y no se determinan los componentes distales de las extremidades (Rowe, Cairns y Fallon, 1982). Sin embargo, esta interacción es reciproca, debido a que las células de la CEA mueren cuando un mesodermo que normalmente no da origen a las extremidades es implantado debajo de la cresta o la CEA es cultivada en ausencia de mesodermo de extremidades (Searls y Zwillig, 1964; Zwillig, 1964).

La muerte celular en el desarrollo de las extremidades

La muerte celular juega un papel fundamental durante la morfogénesis de estructuras embrionarias (Saunders, 1966). En particular el desarrollo de las extremidades en tetrápodos, es un modelo clásico para el estudio de la muerte. Este proceso se ha observado en las extremidades en las siguientes regiones: las zonas "necróticas" anterior y posterior, la zona "necrótica" interna y las zonas "necróticas" interdigitales (Gilbert, 1994) (Fig. 5b). El término de zonas necróticas se respetó solo por motivos históricos, ya que recientemente varios grupos han verificado que la muerte que ocurre en estas regiones es por apoptosis y no por necrosis (Zakeri *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1995).

A pesar de que se conocen a detalle las regiones en que ocurre la muerte celular en las extremidades, se sabe poco de los mecanismos que controlan a este proceso durante el desarrollo embrionario. Se ha observado en las extremidades, que la CEA de la región de los interdigitos degenera, precisamente cuando comienza la muerte celular en los interdigitos, sin embargo, permanece durante más tiempo en la región de los digitos durante la formación de los elementos más distales de los dedos (Mendelsohn *et al.*, 1992).

A continuación se detalla las características que presentan las extremidades que lo hacen un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos que controlan el proceso de la muerte celular.

El desarrollo embrionario de las extremidades de ratón como modelo de estudio

La morfogénesis de las extremidades del ratón, es un modelo que presenta características ideales para el estudio de los mecanismos que controlan procesos celulares como la muerte. En primer lugar, se puede acceder a ellas con gran

facilidad, lo cual permite su manipulación experimental (Zwillig, 1972). En segundo lugar, presentan una regionalización conspicua, además de que se conoce en gran parte los patrones de expresión de diferentes genes, tanto en el espacio como en el tiempo, por lo que los procesos celulares pueden correlacionarse con la expresión de genes específicos (Tabin, 1991). En tercer lugar, se pueden obtener una buena cantidad de tejidos, ya que son cuatro por cada embrión. Finalmente tienen un desarrollo *in vitro* comparable al desarrollo *in vivo* (Salas-Vidal *et al.*, 1998; la presente tesis). Debido a lo anterior se ha seleccionado a este órgano como modelo básico en el presente trabajo, para estudiar el papel de las especies de oxígeno reactivas y el ácido retinoico en el desarrollo embrionario de las extremidades del ratón.

2. HIPOTESIS

HIPOTESIS GENERAL DEL PROYECTO

La gran cantidad de evidencia a favor de que las EOR participan en la regulación de la muerte celular (mencionada en la introducción), y en particular el trabajo iniciado en el laboratorio del Dr. Luis Covarrubias por la Dra. Susana Castro, en donde se encontró que el programa de muerte en células troncales *in vitro*, es inducido por el ácido retinoico, y la activación es mediada por un incremento en EOR (Castro-Obregón y Covarrubias, 1996). En el presente proyecto se propone que las especies de oxígeno reactivas participan en el proceso de activación de la apoptosis que ocurre en las regiones interdigitales de las extremidades del ratón durante su desarrollo embrionario. Proponemos además, que el ácido retinoico inicia el proceso de muerte celular y posiblemente las EOR funcionan como segundo mensajero para transducir su señal para disparar el proceso de apoptosis (Fig. 6).

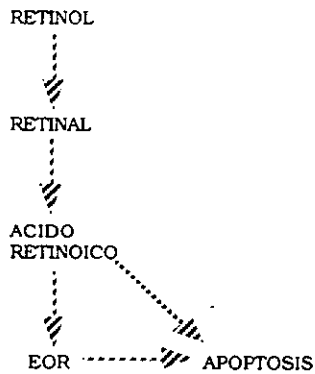


Figura 6.- Esquema general de la hipótesis del proyecto. Las flechas no se presentan con un trazo sólido debido a que se desconoce si las vías señaladas ocurren *in vivo* durante la regresión y muerte en el tejido interdigital.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del proyecto es, determinar si el incremento en EOR participa en el control de la MCP que ocurre en las regiones interdigitales durante el desarrollo embrionario de las extremidades del ratón. Por otro lado, es importante determinar si los retinoides participan en el control de la muerte interdigital, y su señal es mediada por las EOR.

OBJETIVOS PARTICULARES

Con base en el objetivo general se plantea cumplir los siguientes objetivos particulares:

a) Hacer en un estudio morfológico detallado del patrón de desarrollo que presentan las extremidades del ratón CD1.

b) Determinar el patrón del desarrollo del esqueleto de las extremidades del ratón.

c) Determinar los patrones de muerte celular programada durante el desarrollo de las extremidades del ratón, en imágenes bidimensionales y tridimensionales.

d) Determinar las regiones en estrés oxidativo *in situ*, durante el desarrollo de las extremidades del ratón.

e) Estudiar el efecto de diferentes agentes antioxidantes en la apoptosis y en el desarrollo de las extremidades del ratón.

f) Estudiar si existe una correlación entre la apoptosis y el estrés oxidativo durante el desarrollo embrionario del ratón CD1, en otras regiones en donde ocurre MCP aparte de las extremidades.

g) Estudiar el efecto del ácido retinoico y su precursor el retinol en la apoptosis en el desarrollo de extremidades del ratón.

h) Determinar el efecto de diferentes inhibidores de la biosíntesis del ácido retinoico, sobre la muerte y el desarrollo de las extremidades *in vitro*.

i) Determinar si los retinoides alteran los patrones de estrés oxidativo durante el desarrollo de extremidades del ratón.

sensible que será descrito más adelante, para visualizar en una misma preparación a las células que están muriendo y las que se encontraban en estrés oxidativo. En la tabla 1 se muestran las longitudes de onda de absorción y de emisión de los diferentes fluorógenos.

TUNEL.

Como se describió en la introducción, en las células que están muriendo el ADN nuclear se fragmenta, la cual puede ser visualizada por la técnica de TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992).

Extremidades de ratón control o tratadas, fueron previamente procesadas para su inclusión en parafina (Técnica que se describe a detalle más abajo). Se obtuvieron cortes de histológicos de 10 μm , y la técnica fue realizada con un módulo de TUNEL de Boehringer Mannheim, en la cual fundamentalmente lo que se hizo fue adicionar dUTP fluoresceinado, en los extremos del ADN fragmentado, utilizando terminal transferasa (Fig. 3). Los controles de la reacción se realizan con la enzima o la dUTP fluoresceinada sola.

Análisis histológico.

Sobre tejidos procesados para histología de parafina o microscopía de alta resolución (incluidas en EPON) se realizó un análisis para detectar las células en proceso de muerte, al utilizar los criterios morfológicos descritos en la introducción. Las técnicas de tinción utilizadas son descritas en los apartados correspondientes.

HISTOLOGIA, INCLUSION EN PARAFINA

Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 hr a 4°C. Se lavaron en agua corriente 30 min y fueron deshidratados en alcoholes graduales (50, 70, 80, 90 y 100%) 30 min cada uno. Posteriormente los tejidos se pasaron por las soluciones siguientes: alcohol:xilol (1:1) durante 1 hr, xilol puro 1 hr, xilol:parafina (1:1) 1 hr a 60°C (los siguientes pasos son a esta temperatura), xilol:parafina (1:2) 1 hr, parafina pura toda la noche. Posteriormente fueron incluidos en parafina y se obtuvieron cortes seriados en un microtomo Reichert (a temperatura ambiente), y se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Las laminillas con cortes fueron desparafinadas a 60°C, con dos cambios de xilol de 10 min cada uno. Fueron rehidratados con alcoholes decrecientes (100, 90, 80, 70, 50%) 10 min cada uno, y el tratamiento posterior dependió de la técnica de análisis que se utilizó, TUNEL o tinción hematoxilina eosina.

TRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS CON POLI L-LISINA

1. Se disolvieron 25 mg de hidrobromuro de poli-L-lisina (PM 350.000, Sigma, P-1524) en 5 ml de agua tratada con DEPC. Se hicieron alícuotas de 1 ml de solución y se guardaron a

-20°C.

2. Al utilizar cada alícuota, se descongeló y se diluyó en 50 ml de agua tratada con DEPC, para obtener una solución al 0.1%.

3. Se sumergieron los portaobjetos previamente horneados de 4 a 12 hr a 180°C, en la solución. Se dejaron secar las laminillas en posición vertical. Posteriormente las laminillas tratadas se almacenaron a 4°C o a -20°C, hasta que fueron utilizadas.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los tejidos fueron fijados en solución de Karnovsky (1965), postfijados en una solución de tetróxido de osmio al 1% en buffer Zetterqvist (1956) y posteriormente incluidos en EPON 812. Se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicrotomo III 8800LKB, fueron teñidos en azul de toluidina al 0.5%, se lavaron en agua destilada y se destiñó el exceso en etanol absoluto, para después ser montados en portaobjetos y analizados por microscopía de luz convencional. Los cortes finos fueron montados en rejillas de cobre, contrastados 5 minutos con acetato de uranilo al 2.5% en agua destilada y 1 minuto con citrato de plomo alcalino. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico (EM900, Zeiss, Alemania) y el análisis de los resultados se realizó sobre las micrografías electrónicas tomadas.

DETECCION DE EOR IN SITU

Para la detección de especies de oxígeno reactivas (EOR) *in situ*, las extremidades de embriones de ratón, o bien, embriones completos de diferentes dpc, fueron incubados con dos colorantes redox sensibles diferentes, inmersos en la solución de tinción o bien flotando sobre un filtro de policarbonatos (Costar, U.S.A.), en condiciones de cultivo de tejidos. Se utilizó la sal tetrazólica MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma] a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio de cultivo McCoy 5a modificado durante 2 a 8hr de incubación. El MTT ha sido utilizado para la detección de superóxido (Burdon *et al.*, 1993), ya que genera un precipitado de color púrpura, denominado formazán. La reacción de una sal tetrazólica con el superóxido para dar el precipitado formazán se presenta en la figura 8.

Se utilizó por otro lado, la tinción con otro colorante redox sensible que da un producto fluorogénico detectable por microscopía de fluorescencia, y también con microscopio confocal (descrito más abajo), el DCDHF-DA y el 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate bis(9 acetoxymethyl) éster (Molecular Probes) (Figura 9). Estos fluorógenos se utilizaron a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PBS durante 45 min en condiciones de cultivo de tejidos.

HISTOQUIMICA PARA LA DETECCION DE CARTILAGO

Se utilizó una aglutinina de cacahuete para la detección de formación de precartilago por la técnica previamente descrita por Hurlé *et al.* (1989). Brevemente, los tejidos fueron fijados en una solución de ácido acético:etanol (1:1) durante 1 hr a 40°C. Posteriormente fueron deshidratados e incluidos en parafina por la técnica previamente descrita. Los cortes de tejido de 16µm de grosor, obtenidos en microtomo, fueron desparafinados y posteriormente se incubaron en una solución de aglutinina de cacahuete acoplada a isotiocianato de fluoresceína, a una concentración de 20 µg/ml en solución amortiguadora de HEPES, pH 7.5, NaCl 0.15 M. Posteriormente las laminillas fueron lavadas en PBS y montadas en glicerol al 50% en PBS. Las muestras fueron analizadas al microscopio confocal por la técnica descrita.

También se utilizó una técnica para analizar la formación de cartilago en "whole mount" por la técnica previamente descrita por Wallin *et al.* (1994). Las extremidades de ratón fueron fijadas en etanol absoluto durante 24 hr. Posteriormente fueron tratadas en acetona por 24 hr con agitación constante. Una vez que las muestras fueron fijadas y permeabilizadas, fueron teñidas en una solución de: 1 volumen de azul alciano (Sigma) al 0.3% (p/v) en etanol al 70%, 1 volumen de rojo alizarin S (Sigma) al 0.1% en etanol al 96%, 1 volumen de ácido acético glacial y 17 volúmenes de etanol al 70%. Se incubó en esta solución a 37°C durante 4 hr con agitación constante y posteriormente a temperatura ambiente durante una noche, también con agitación constante. Debe tenerse precaución de que la agitación sea suave para evitar que se destruya o maltrate el tejido que se está teñendo. Finalmente las muestras fueron lavadas en agua destilada y aclaradas en una solución de hidróxido de potasio al 1% en glicerol al 20% en agua, durante 24 hr a temperatura ambiente. Si se desea almacenar los tejidos por largo tiempo se pueden deshidratar en glicerol crecientes al 50%, 80% y 100%.

INMUNOHISTOQUIMICA CON EL ANTICUERPO F4/80, PARA LA DETECCION DE MACROFAGOS

Tejidos teñidos con el colorante redox sensible MTT, por la técnica anteriormente descrita, fueron congelados inmediatamente después de terminar la tinción, en medio de inclusión CRYO-M-BED (Bright, England) en hielo seco. Posteriormente los bloques fueron cortados en un crióstato a -20°C y las secciones montadas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Los cortes se dejaron secar 30 min. a temperatura ambiente (t.a.) y si no eran utilizados el mismo día, se guardaron a -20°C. Las laminillas se dejaron a t.a. y se rehidrataron con PBS. Se fijaron los cortes durante un minuto con

paraformaldehído al 4% en PBS (preparar fresco) y se lavaron 3X con PBS. Se incubaron posteriormente 30 min. con peróxido de hidrógeno al 0.25% en PBS a t.a. y se lavaron 3X con PBS. Se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS o con leche 5% en PBS una hora a t.a. Se incubaron 2 hr a t.a. con el anticuerpo primario rata-anti antígeno de ratón F4/80 (MCAP497; Serotec, England), diluido 1/100 en PBS. Antes de poner el anticuerpo se centrifugó a 14,000 r.p.m. en una centrifuga eppendorf. Se puso como control cortes sin anticuerpo primario. Se lavaron 3x 10 min con PBS. Se incubaron con anticuerpo secundario diluido 1/100 en solución de bloqueo durante una hora. Nuevamente se lavaron 3X durante 10 min. c/u. Se reveló durante 2 hr. en una solución de diaminobenzidina 6mg, en 10 ml de amortiguador Tris 0.05 M (pH 7.6) con peróxido de hidrógeno al 3%. Se detuvo la reacción en PBS y se montaron las laminillas en glicerol al 50% en PBS y se revisaron al microscopio de luz.

USO DE CELULAS LC3, PARA EL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS *IN VIVO* DE ACIDO RETINOICO EN EXTREMIDADES EMBRIONARIAS DE RATON

Las células LC3 congeladas que contienen al gene reportero lacZ bajo un promotor inducible por ácido retinoico, (amablemente proporcionadas por el Dr. LaMantia), congeladas y contenidas en un vial de criopreservación, fueron puestas en un vaso de precipitado de 50ml, con agua previamente calentada a una temperatura entre 39 y 40°C. La alícuota descongelada, fue diluida en 9ml de medio de cultivo completo [D-MEM (GIBCO, USA) con suero bovino fetal (SBF) al 10%, l-glutamina y penicilina estreptomycin].

Fueron posteriormente centrifugadas 5 min a 4,000 r.p.m. en una centrifuga clínica. El pellet se resuspendió en 5ml de medio de cultivo completo. Se verificó la viabilidad con azul tripan y se calculó la densidad para hacer el cultivo correspondiente.

Las células LC3 fueron crecidas en medio de cultivo completo con selección del gene reportero, con G418 a una concentración final de 40 mg/ml, se subcultivaron al llegar a confluencia por los métodos convencionales.

Las células fueron sembradas en alta densidad durante 24h en el medio de cultivo descrito, solo que el SBF fue tratado previamente con carbón activado por 30 min en un baño María a 45°C.

Explantos de extremidades embrionarias fueron puestas sobre la monocapa de células LC3, e incubadas por 20 a 24 hr, en el tratamiento correspondiente: medio control, medio con citral, medio con nerol, medio con retinol, medio con citral-retinol, medio con nerol-retinol.

Las cajas con células fueron fijadas con paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0.1% en PBS, 30 min sobre hielo. Posteriormente

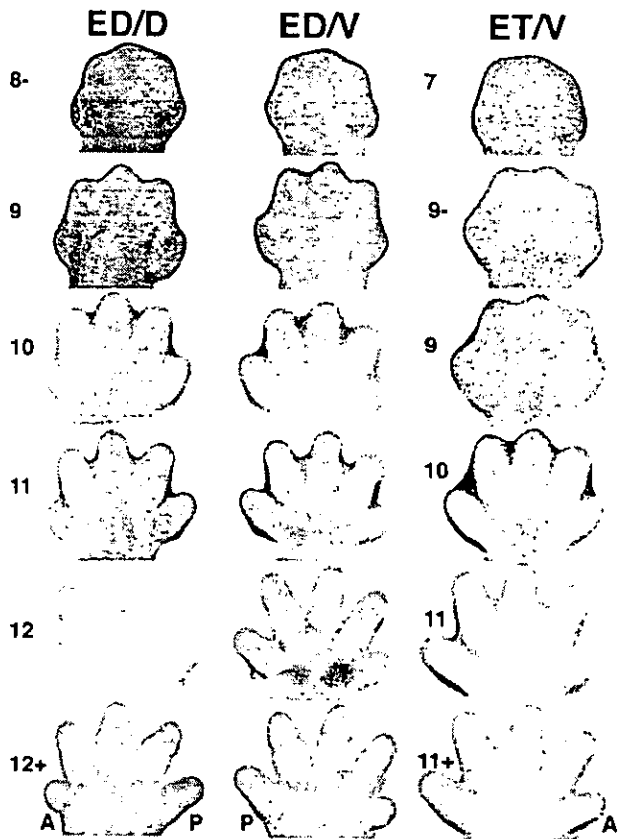


Figura 10.- Distribución de la muerte celular en el desarrollo de las extremidades. 7 al 12+, estadios del desarrollo según Wanek *et al* (1989). ED, extremidad delantera. ET, extremidad trasera. D, vista dorsal. V, vista ventral. A, anterior. P, posterior. Filas horizontales son de un mismo embrión.

En el presente proyecto se adaptó un sistema de cultivo organotípico previamente descrito por Taketo y Koide (1981), con ligeras modificaciones, para realizar las manipulaciones experimentales. La razón principal por la que se decidió realizar los experimentos *in vitro*, es por que en éstas condiciones se pueden controlar de manera muy estricta, tanto el desarrollo de las extremidades que se utilizan (que sean de la misma etapa), como las concentraciones de los fármacos que se aplican.

En las extremidades incubadas *in vitro*, se encontró que el desarrollo es más lento (Fig. 1, publicación 1) pero muy similar al desarrollo normal que sucede *in vivo* (comparar la Fig. 1, de la publicación 1, con la Fig. 10). Es importante hacer notar, que *in vitro* la regresión del interdígito ocurre normalmente, pero la elongación de los dígitos es limitada (Fig. 1, publicación 1), a diferencia de lo que ocurre *in vivo*, en donde tanto la regresión como la elongación de los dígitos, participan en la separación de los dedos (Fig. 11 y 14).

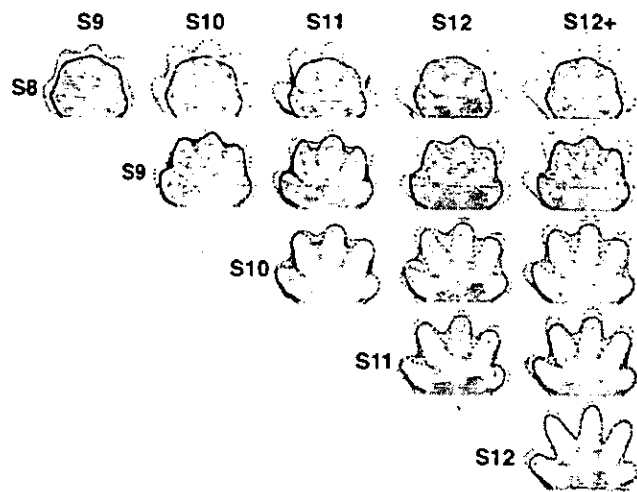


Figura 11.- Análisis de imágenes de la regresión interdigital y crecimiento de los dígitos en extremidades de ratón. Imágenes del estadio señalado (izquierda) fueron sobrepuestas por la técnica descrita (Salas-Vidal *et al.*, 1998), en imágenes de edad más avanzada (arriba), y la opacidad de la imagen sobrepuesta fue reducida al 50% para poder observar la imagen subyacente.

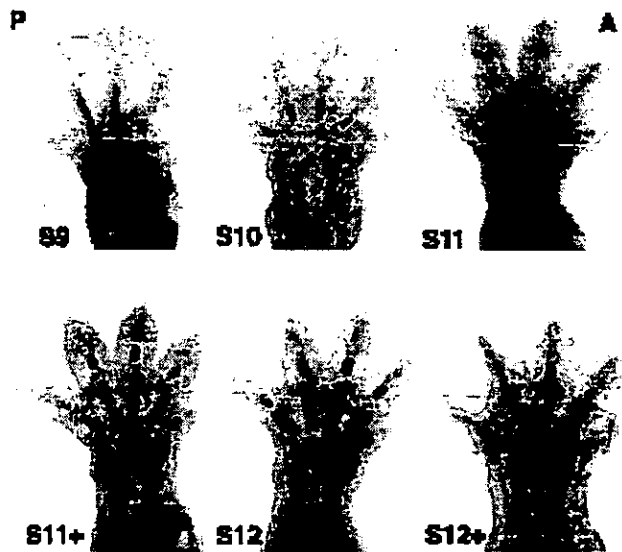


Figura 12.- Desarrollo *in vivo* del esqueleto en extremidades de ratón. Extremidades teñidas con azul alciano.

Desarrollo del esqueleto de las extremidades del ratón *in vivo* e *in vitro*.

Se realizó adicionalmente un estudio del desarrollo de los elementos esqueléticos, y su correlación con la regresión del interdígito (Fig. 12 y 13). Se utilizó el colorante azul alciano el cual es afín a proteoglicanos altamente sulfatados, los cuales son abundantes en el cartilago (Leonard, *et al.*, 1989). Se verificó la identidad del cartilago, al realizar algunos controles de tinción

estaban en proceso de muerte, utilizando criterios histológicos y de fragmentación del ADN (Fig. 2 y 3, publicación 1).

El análisis de los resultados obtenidos a partir de los diferentes modelos analizados mostraron lo siguiente:

1) Los patrones de muerte celular cambian durante el desarrollo, y parecen seguir gradientes orientados con respecto a los ejes principales del cuerpo: antero-posterior, dorso-ventral y disto-proximal (Fig. 10 y 16). El patrón de algunos gradientes semejan las llamadas "olas" descritas previamente por Saunders (1966). Particularmente notoria durante la regresión de los interdigitos entre los 13-14 dpc, comenzando en la región más distal del mesénquima, extendiéndose conforme avanza el desarrollo a zonas más proximales (Fig. 10, 13 y 14).

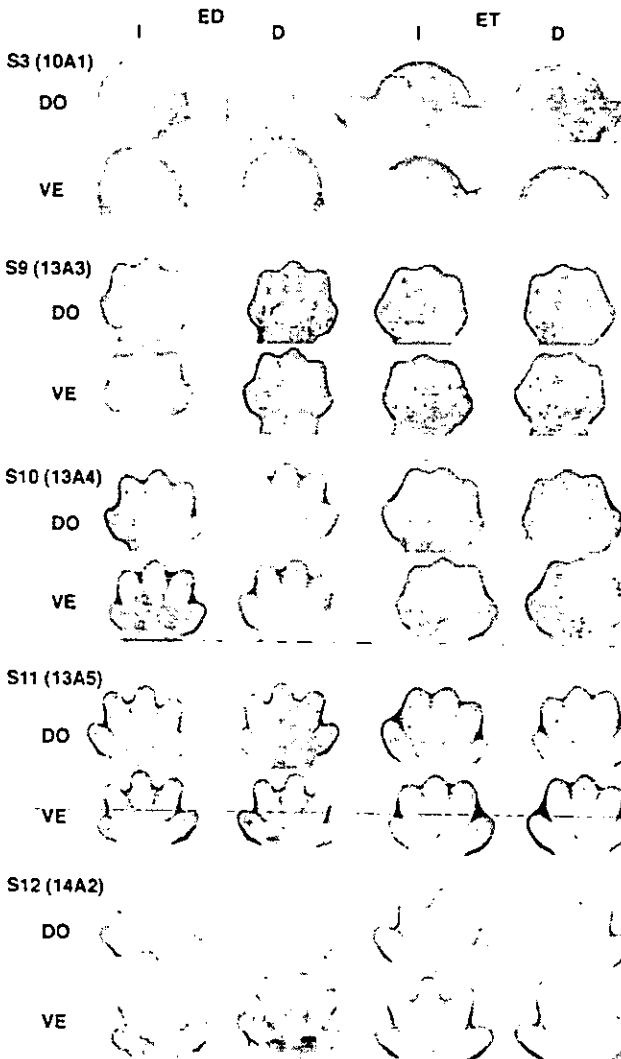


Figura 16.- Patrones de muerte en extremidades de ratón de 10 (S3), 13 (S9, S10 y S11) y 14 (S12) dpc. I, izquierda. D, derecha. ED, extremidad delantera. ET, extremidad trasera. DO, vista dorsal. VE, vista ventral.

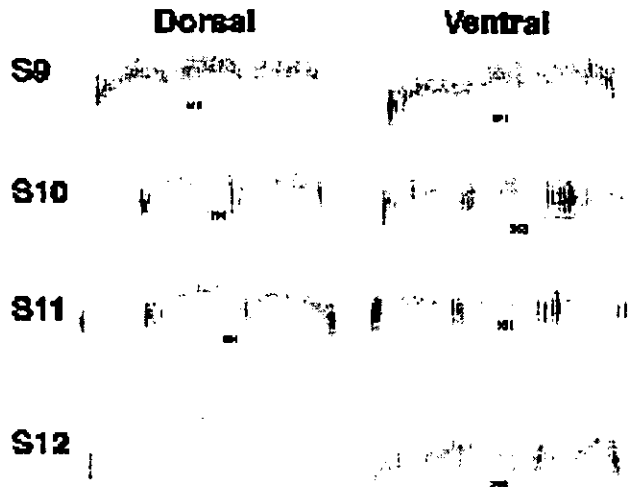


Figura 17.- Cortes ópticos sagitales, generados a partir de las reconstrucciones tridimensionales presentadas en la figura 4, publicación 2. Sorprendentemente se observa que las interdigitaciones son más marcadas en el lado dorsal que en el lado ventral, a pesar de que la muerte es más abundante en el lado ventral, ver fig. 10.

2) Nuevas regiones de muerte aparentemente no descritas anteriormente fueron detectadas, dos bandas ventrales y proximales en forma en delta en extremidades de embriones de 10 dpc (Fig. 16). Regiones anteriores y posteriores de la base de las extremidades que persisten a lo largo del desarrollo de las extremidades hasta los 13-14 dpc (datos no mostrados).

3) En etapas tempranas del desarrollo de las extremidades (10 dpc) la primera región de muerte aparece en la región anterior más proximal de la base de la extremidad y más adelante en el desarrollo en la región posterior más proximal de la base de la extremidad (datos no mostrados). Son interesantes estos resultados puesto que durante el desarrollo de otros órganos, como el rombencéfalo, la muerte ocurre primero en regiones más anteriores (el rombómero 3) y más adelante en el desarrollo en regiones posteriores (rombómero 5) (Graham, *et al.*, 1993). Este patrón antero-posterior de muerte, ocurre también durante el desarrollo tardío de los somitas y las arrugas del paladar (Salas-Vidal, Cuervo y Covarrubias resultados sin publicar).

4) No se encontraron diferencias notables en el desarrollo y patrón de muerte al comparar las extremidades del lado izquierdo con el derecho (Fig. 16).

5) La separación de los dígitos, no solo es debida a la muerte que ocurre en el tejido interdigital entre los 13 y 14 dpc. Buen porcentaje de esta separación ocurre también debido a que los dígitos se elongan en el eje proximo-distal a diferencia del interdígito que deja de crecer desde el S9 previo al inicio de la muerte

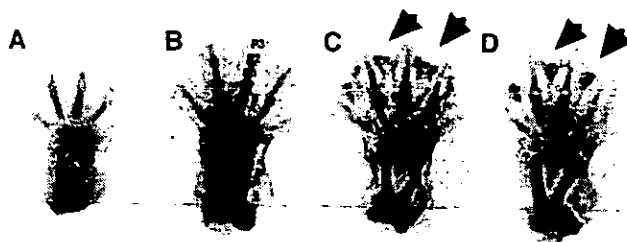


Figura 19.- Extremidades incubadas con agentes antioxidantes durante 12hr y teñidas con azul alciano. a, Esqueleto al inicio del cultivo. b, Esqueleto a las 12hr de cultivo en medio control. c, Esqueleto incubado con fenol al 0.075%. d, Esqueleto incubado en presencia de DMSO al 3%. Condrogénesis interdigital, flechas oscuras.

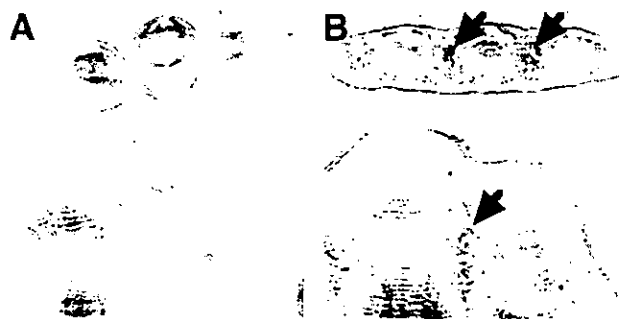


Figura 20.- Condrogénesis interdigital (flechas oscuras) en extremidades incubadas 12hr *in vitro*, detectada con aglutinina de cacahuate fluoresceinada. A, Tejido control. B, Incubadas en medio con DMSO al 3%.

Es interesante que en cultivos más cortos de 12hr en presencia de fenol o de DMSO, se observó la tinción de los tejidos interdigitales tanto con el colorante azul alciano (Fig. 19c y d) como con la aglutinina de cacahuate (Fig. 20). Datos similares se observaron al hacer las tinciones en órganos cultivados a las 24hr, pero no se observaron en tejidos incubados por solo 6 hr (Tabla 2).

A pesar de el tejido interdigital fue positivo con los dos marcadores de condrogénesis, azul alciano y aglutinina de cacahuate, este tejido no presentó otro marcador de condrogénesis típico de cartilago, la colágena de tipo II, ya que al hacer hibridación *in situ*, solo se observó señal en las falanges y metacarpales (datos no mostrados).

Los resultados anteriores son indicativos del potencial condrogénico del tejido interdigital, que sobrevivió al ser tratado con los agentes antioxidantes. Como se menciona en el artículo 1, el epitelio no se observó alterado con los tratamientos, por lo que la sobrevivencia y la condrogénesis observada en el tejido interdigital, no se debió a la ausencia de este tejido, el cual es fundamental para que se lleve a cabo la regresión (Hurle y Gañán, 1986).

| Concentración de antioxidante (v/v) | AA/# extremidades teñidas (***) | Permanencia interdigital | | Condrogénesis interdigital | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------|----------------------------|-----|------|------|
| | | 6hr | 12hr | 24hr | 6hr | 12hr | 24hr |
| 0 (Control) | *** | 12/12 | * 8/8 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| 0.075% (Fenol) | * | 12/12 | ** 6/6 | 3/3 | 0/3 | 2/3 | 2/3 |
| 3% (DMSO) | ** | 11/12 | *** 7/8 | 3/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 |

Tabla 2. Efecto de los antioxidantes sobre la muerte interdigital, medida con base en la tinción con el colorante anaranjado de acridina (AA), y su relación con la formación ectópica de cartilago, en extremidades de embriones de ratón *in vitro*. *, abundancia relativa.

Determinación de regiones en estrés oxidativo *in situ*, durante el desarrollo de las extremidades del ratón.

Los resultados obtenidos con los tratamientos con antioxidantes, son evidencia que apunta a favor, de que la muerte celular está regulada por EOR durante la regresión del interdigital. Sin embargo, obtuvimos evidencia adicional de su participación.

Se realizó, un análisis del incremento de especies de oxígeno reactivas *in toto*, utilizando la sal de tetrazolica redox-sensible MTT, para teñir a extremidades en diferentes etapas del desarrollo. El MTT es un colorante soluble en agua de color amarillento, que es reducido intracelularmente a formazán, el cual es un precipitado de color púrpura (Freshney, 1994); el formazán se genera principalmente al reaccionar con el superóxido (Burdon *et al.*, 1993) (Fig. 8). También utilizamos el colorante DCDHF-DA que es convertido al fluorógeno dichlorofluoresceína (DCF) en presencia de EOR (Haughland, 1996). Se encontró que las extremidades teñidas con estos colorantes presentaron patrones similares a los que se observaron con la tinción con el indicador de muerte, el AA (Fig. 5, artículo 1), lo cual es una evidencia correlativa, de que el estrés oxidativo participa en el control de la muerte interdigital.

La apoptosis y el estrés oxidativo en el desarrollo embrionario del ratón CD1 y en el desarrollo temprano en pollo.

Por otro lado, nos interesó saber si el estrés oxidativo participa en el control de la muerte que ocurre en otras regiones embrionarias. Así que se estudiaron los patrones de tinción con los colorantes redox sensibles en embriones completos de ratón, y su coincidencia con el patrón de muerte celular. Se encontró una alta coincidencia entre los dos procesos a lo largo del desarrollo del ratón (Fig. 7, artículo 1). Es interesante que esta evidencia correlativa se encontró en otros sistemas de estudio como la *Drosophila* (datos no mostrados) y en el desarrollo temprano del pollo.

En el pollo (Fig. 21) es interesante que el colorante redox sensible Rodamina 123, tiñe toda

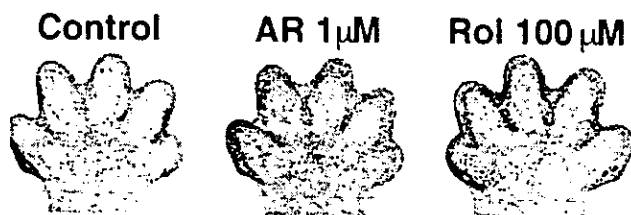


Figura 22.- Extremidades de ratón, teñidas con AA, incubadas previamente durante 18hr *in vitro*, en medio control, o en presencia de ácido retinoico (AR) o retinol (ROL).

adicional el trabajo de Castro-Obregón y Covarrubias (1996), sugiere que la señal generada por el ácido retinoico, induce la formación de ERO, y por medio de estas moléculas induce la muerte celular. Con base en este reporte se propuso estudiar si el ácido retinoico participa en el control de la muerte celular que ocurre en el tejido interdigital en extremidades de ratón.

AR y ROL inducen apoptosis en extremidades de embrión de ratón *in vitro*.

Reportes previos han demostrado que el AR es capaz de inducir un incremento en muerte celular en ratones en desarrollo, tanto *in vivo* como *in vitro* (Sulik *et al.*, 1988; Alles y Sulik 1989).

Por lo anterior primero verificamos si el ácido retinoico incrementa la muerte en las extremidades en desarrollo *in vitro*. Además estudiamos también si el precursor natural del AR el retinol (ROL), también incrementa la muerte en extremidades en desarrollo *in vitro*. Encontramos que el patrón de la distribución de la muerte celular inducida por estos tratamientos, es similar en ambos casos (Fig. 22), lo cual indica que: 1) en las extremidades en desarrollo existe las rutas metabólicas necesarias para convertir el ROL en AR; 2) los tejidos blancos son los mismos para el ácido retinoico, como para el producto del metabolismo del ROL (presumiblemente el AR); 3) ambas moléculas son capaces de inducir muerte en extremidades en desarrollo *in vitro*.

El incremento en la muerte provocado por los tratamientos con AR, se encontró que fueron muy marcados a concentraciones entre 0.1 y 1-µM, el efecto más notorio fue a 1 µM, desde las 6 hr de cultivo. En cambio los tratamientos con retinol, requirieron realizarse a concentraciones más altas, entre 50 y 100 µM, además de que los efectos en la muerte fueron observados claramente hasta las 16 o 18 hr de cultivo *in vitro* (Fig. 22).

Inhibidores de la biosíntesis del AR reducen la muerte celular y la regresión interdigital, en extremidades de embrión de ratón *in vitro*.

A pesar de que el AR así como su precursor el ROL, incrementan *in vitro* la muerte

celular, estos resultados no demuestran si los retinoides endógenos participan en el control de la muerte de manera natural.

Se ha descrito que la ruta de biosíntesis prevaeciente *in vivo*, del AR y de otros retinoides, es a través de la bioconversión de la vitamina A o ROL a retinal, mediada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), y posteriormente por la conversión de retinal al AR por una aldehído deshidrogenasa (ALDH), (Fig. 4) (Connor y Smith, 1987; Connor 1988).

Por otro lado, se conocen diferentes fármacos que bloquean la biosíntesis del ácido retinoico, y que afectan la actividad de alguna de la enzimas mencionadas, como se muestra en la Tabla 3.

El 4-metilpirazol es un inhibidor competitivo de todas las alcoholes deshidrogenasas descritas (Rognstad y Grunnet, 1979). El citral por su parte, es un aldehído que inhibe tanto a la ADH como a la ALDH (Connor, 1988), y el nerol es un compuesto control del citral, ya que tiene la misma estructura, pero el grupo aldehído fue modificado por un grupo alcohol y su actividad inhibidora a concentraciones equimolares con respecto al citral es prácticamente despreciable (Schuh, *et al.*, 1993) (Tabla 3). Se encontró que tanto el 4-metilpirazol como el citral, redujeron la cantidad de muerte que ocurre en el tejido interdigital, así como en las regiones anterior y posterior de las palmas, sin embargo, el compuesto control, el nerol, a concentraciones equimolares no tuvo efecto notable sobre la muerte (Fig. 23). Debido a que tanto el citral como el nerol son aceites esenciales (Diliberto *et al.*, 1988), fueron disueltos previamente en etanol absoluto, por lo que se probó el efecto del etanol a la concentración final utilizada cuando se disolvió el citral y el nerol. De manera adicional se incluyó un control del efecto de un aldehído a concentraciones equimolares a las utilizadas de el citral y no se encontraron efectos de estos tratamientos en la muerte celular (Fig. 23).

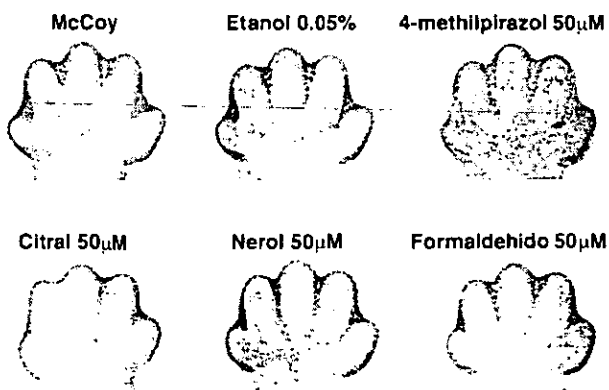


Figura 23.- Efecto *in vitro* de inhibidores de ADH y ALDH sobre la muerte celular en extremidades incubadas por 6hr.

| Compuesto | ADH | ALDH |
|----------------|-----|------|
| 4-metilpirazol | - | = |
| Citral | - | - |
| Nerol | = | = |

Tabla 3.- Efecto de diferentes fármacos sobre la actividad de alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH). - inhibidor, = sin efecto.

| | Control | Nerol | Citral |
|---------|---------|-------|--------|
| Control | = | = | - |
| AR | + | + | + |
| Retinol | + | + | - |

Tabla 4. Efectos sobre la muerte celular en extremidades *in vitro*, con tratamientos dobles. =, sin efecto. +, incremento en la muerte. -, decremento en la muerte.

Inhibidores de la biosíntesis del AR, compiten con los efectos provocados por el retinol, pero no con los efectos del AR *in vitro*.

Para verificar que el efecto de los tratamientos con los inhibidores de la biosíntesis del AR fueron específicos, realizamos dos pruebas adicionales.

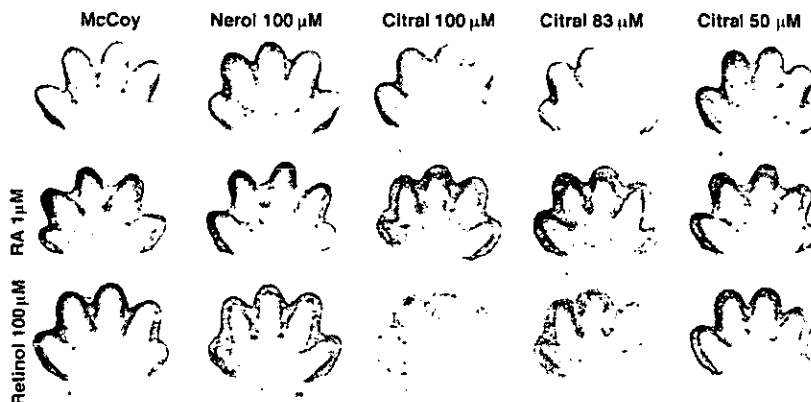
En primer lugar realizamos competencias entre tratamientos con retinol y ácido retinoico, contra citral y nerol (Fig. 24). Encontramos que en cultivos por 18 hr en el medio control (McCoy), la mayor parte de la regresión y la muerte interdigital se lleva a cabo en este tiempo de incubación. Observamos que en el compuesto control Nerol, la muerte interdigital es más notoria que cuando las extremidades son tratadas con el inhibidor citral, con el cual se encontró que la muerte interdigital aún a estos tiempos prolongados de cultivo, se reduce. El efecto sobre la muerte se va perdiendo conforme se utilizaron concentraciones más bajas de citral. Tanto el AR como el retinol incrementaron la muerte y presentaron un patrón similar. En ambos tratamientos, tanto con el AR como con el retinol, al incubarlos en presencia de nerol (compuesto control) el efecto de los retinoides no fue inhibido por lo que la muerte se incrementó. Sin embargo, cuando se realizaron incubaciones en presencia de retinol y de citral, se observó un descenso en el efecto sobre la muerte dado por el retinol, lo que indica que el citral está afectando la conversión de retinol al ácido retinoico. Como es de esperarse en un efecto específico, el citral no redujo la muerte inducida por el AR, el cual se espera que tenga un efecto directo sobre la muerte y no requiera de su

bioconversión dependiente de ADH o de ALDH. Se observaron resultados equivalentes en dos experimentos independientes, con un total de 7 repeticiones en ambos experimentos (resultados no mostrados).

Los efectos observados en los experimentos de competencia descritos son resumidos en la tabla 4.

Por otro lado se utilizó una línea celular LC3, que expresa al gen reportero beta-galactosidasa, bajo un promotor que contiene regiones responsivas al AR, por lo que la expresión del gene reportero es dependiente de la presencia de AR en el medio de cultivo. Este tipo de construcciones han permitido en trabajos previos, demostrar la biosíntesis de ácido retinoico de manera tejida específica durante el desarrollo embrionario en ratón (Colbert *et al.*, 1993). Encontramos que al incubar extremidades de embriones de ratón sobre la línea celular LC3, se genera un halo de expresión del gene reportero, en las regiones distales de las extremidades, y este patrón de expresión se ve muy incrementado cuando se incuban en presencia de retinol (Fig. 25). Estos resultados refuerzan la idea de que en las extremidades en desarrollo, se encuentran las enzimas necesarias para realizar la conversión del retinol, al producto el ácido retinoico.

Figura 24.- Competencia de los efectos *in vitro* entre el AR y ROL con los inhibidores de ADH y ALDH, sobre la muerte celular en extremidades incubadas por 18hr.



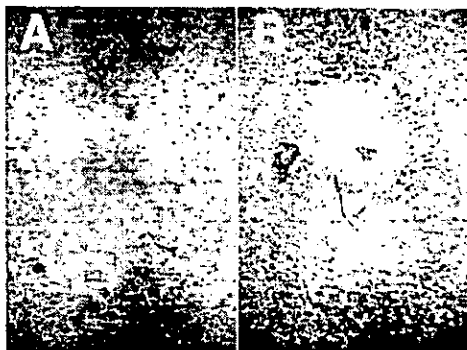


Figura 25.- Inducción de lacZ en células LC3, por retinoides endógenos (A) y producidos por conversión de retinol (B) en extremidades de embrión de ratón.

Efecto del ácido retinoico sobre el estado de estrés oxidativo en extremidades de ratón en desarrollo *in vitro*.

Consideramos importante el intentar verificar si el tratamiento *in vitro* de extremidades con ácido retinoico, es capaz de inducir la muerte oxidativa media *in vivo* el efecto del ácido retinoico. celular mediada por estrés oxidativo. Sin embargo, ha sido más difícil de lo que originalmente se previó el obtener resultados convincentes en este aspecto. Desafortunadamente, al incubar las extremidades *in vitro*, aún sin dar ningún tratamiento, la tinción con cualquiera de los colorantes redox sensibles disminuye, por lo que no fue posible evaluar con certeza si el AR es capaz o no, de alterar el estado redox celular. A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos sobre el efecto de los inhibidores de la biosíntesis del ácido retinoico en la muerte interdigital, son la primera evidencia experimental de que el ácido retinoico endógeno participa en el control de la muerte en el desarrollo embrionario. Queda para el futuro el continuar explorando si el estrés

6. DISCUSION

Trabajos previos han demostrado que el estrés oxidativo participa en el control de la muerte de diferentes tipos celulares (ver introducción). Sin embargo, en la presente tesis y en el artículo incluido (Salas-Vidal *et al.*, 1998), se presenta la primera evidencia a favor de que el estrés oxidativo participa de manera natural, en la fase de activación del proceso de la muerte celular programada que ocurre durante el desarrollo embrionario en el ratón.

EOB EN EL CONTROL DE LA MUERTE CELULAR

El efecto de antioxidantes en el desarrollo de las extremidades *in vitro*.

Los efectos teratogénicos del colorante verde Janus sobre el desarrollo embrionario en el pollo, se conocen desde hace muchos años (Saunders, 1966; Pautou, 1976; Fernández-Teran y Hurlé 1984). Principalmente nos interesó saber por que altera el desarrollo de las extremidades posteriores, e inducir malformaciones. Los efectos del verde Janus se han dividido en dos fases diferentes. En la primera fase, que es temprana, se disminuye la muerte celular y la regresión del tejido interdigital causando sindactilia (i.e. dígitos no individualizados). En la segunda fase, la cual es de efecto tardío, se bloquea el crecimiento apical de los dígitos por lo que se produce hipofalangia (reducción en el número de falanges) (Pautou, 1976). Los resultados obtenidos con los tratamientos *in vitro* con los antioxidantes DCDHF-DA, fenol y DMSO muestran similitudes muy notorias. A las 6 hr *in vitro*, se observó un efecto temprano que se caracteriza por una disminución en la muerte interdigital, lo que trajo como consecuencia, que se observaran diferentes grados de sindactilia en las extremidades tratadas (Fig. 1 a 4, artículo 1). La fase tardía previamente reportada para el verde Janus (hipofalangia), fue observada a las 96 hr de los tratamientos en la presente tesis, y se caracterizó por la ausencia de la falange 3 (datos no mostrados). Interpretamos la falta de la falange 3 como resultado del incremento en muerte observado en las regiones distales de los dígitos desde las 12 hr de cultivo (Fig. 1, artículo 1).

El verde Janus es un colorante vital, que es redox sensible (Bowen y Bowen, 1990). Anteriormente se ha utilizado para observar gradientes redox durante el desarrollo embrionario en erizos de mar (Horstadius, 1952). Por lo que es muy posible que el verde Janus actúe como antioxidante y disminuya la muerte por un mecanismo similar a los antioxidantes utilizados en la presente tesis.

El efecto de los antioxidantes son evidencia a favor de que el estrés oxidativo participa en la inducción de la muerte interdigital. De manera adicional obtuvimos evidencia correlativa de que existen estados redox diferentes

entre las regiones digitales e interdigitales (Fig. 5, artículo 1): las células mesenquimáticas del interdígito y de las regiones anterior y posterior mostraron un estado de estrés oxidativo (Fig. 6, artículo 1). Los resultados tomados en conjunto, sugieren que los efectos observados con los tratamientos con fenol, DMSO y DCDHF-DA, son mediados por su capacidad como antioxidantes, posiblemente reaccionando con diferentes EOR o bien bloqueando sus efectos sobre las moléculas blanco. Más adelante en la discusión se mencionaran otras estrategias que se están realizando en el laboratorio y algunas propuestas adicionales, para evaluar el papel de las EOR en la apoptosis que ocurre en el desarrollo embrionario.

Identidad de las células en estrés oxidativo.

Los datos presentados en el artículo adjunto, muestran que las células en estrés oxidativo son por lo menos de dos tipos diferentes: células mesenquimáticas y macrófagos (Fig. 6c, artículo 1). Los patrones de tinción con los colorantes redox sensibles (Figuras 5 y 6, Tabla 1; Artículo 1) en conjunto con la protección contra la muerte celular observada por los tratamientos con antioxidantes sugieren que las células mesenquimáticas destinadas a morir, presentan un estado de estrés oxidativo temporal previo al inicio del proceso de muerte, de lo contrario no serían protegidos por los agentes antioxidantes. Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de que los macrófagos activados que entran en estado de estrés oxidativo, puedan participar en la inducción del proceso apoptótico. Se ha reportado que los macrófagos son necesarios para iniciar la muerte celular que ocurre en el desarrollo embrionario del ojo (Lang y Bishop, 1993; Lang *et al.* 1994), sin embargo, en este sistema no se ha explorado si el estrés oxidativo participa en el control de la muerte. Una posibilidad sería utilizar una estrategia similar a la reportada en estos trabajos, en los cuales se eliminaron los macrófagos en embriones de ratón. Esto se logró al generar ratones transgénicos que expresaban en las células blanco, en este caso macrófagos, la cadena A de la toxina de difteria, dirigiendo su expresión bajo un promotor específico de esta línea celular, en particular utilizaron al promotor del factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y de macrófagos (Lang y Bishop, 1993). Una estrategia de este tipo podría funcionar para eliminar a los macrófagos o bien a sus precursores en el desarrollo embrionario temprano, para verificar si aún en ausencia de macrófagos ocurre la muerte celular en el mesénquima de los interdigitos, así como en otras regiones en donde ocurre la muerte. Sin embargo, esta estrategia presenta algunos posibles problemas que deben señalarse. La toxina podría ser tóxica para otros tipos celulares que no la expresan, por lo que se ha optado por reducir su

expresión al modificar el promotor bajo el cual se dirige su expresión (Lang y Bishop, 1993). Otro problema muy importante es que este promotor no se expresa en precursores de estas líneas celulares (Lang *et al.*, 1987). Por lo tanto, sería adecuado poder encontrar un promotor que se exprese en precursores de macrófagos durante el desarrollo embrionario.

Es importante señalar que observamos también células en estrés oxidativo en otras regiones en donde ocurre apoptosis, tanto en embriones de pollo (Fig. 21) como de ratón (8.5 dpc y Fig. 7, artículo 1), en etapas en las que se ha reportado que todavía no se diferencian macrófagos, los cuales son claramente distinguibles entre los 9 y 11 dpc en ratón (Dzierzak y Medinsky, 1995; Takahashi *et al.*, 1989). Sin embargo, existe la posibilidad de que las células observadas en estrés oxidativo, no presenten inmunoreactividad con el anticuerpo F4/80, que sean macrófagos embrionarios, o bien sean macrófagos inmaduros que todavía no tienen todos los antígenos de superficie, que se diferencian completamente al avanzar el desarrollo. Esta posibilidad queda aún por explorar.

EOR en el control de la muerte celular.

La reducción de las sales tetrazólicas como el MTT o el NBT, forman un precipitado de color púrpura denominado formazán (Fig. 8). Esta reacción se ha utilizado ampliamente como un indicador de sobrevivencia celular o como un indicador de actividad metabólica. Como un indicador de sobrevivencia se ha utilizado porque sólo las células vivas, son capaces de reducir el colorante (Freshney, 1994). Como indicador metabólico se ha utilizado para mostrar actividad de las deshidrogenasas *in vivo* (Hammar y Mottet, 1971), o bien para medir la llamada explosión respiratoria en fagocitos (neutrófilos y en monocitos/macrófagos) (Rice-Evans, Diploc y Symons, 1991).

Por lo tanto, es de esperarse un nivel basal de tinción (precipitación de formazán) con el colorante MTT, debido a que la mayoría de las células de las extremidades en desarrollo y de otras regiones en el embrión, están vivas (Fig. 5 y 7, artículo 1). Sin embargo, fue muy sorprendente el encontrar a células con un marcaje muy intenso y fácilmente reconocibles (Fig. 5 a 7, artículo 1). Como ya fue mencionado las células muertas no son capaces de reducir el MTT (Freshney, 1994), por lo que el incremento en tinción no se debe a la muerte de estas células, y el incremento en EOR no parece ocurrir como consecuencia del proceso de muerte, de lo contrario se acumularía el precipitado en las células que presentaron también marcaje para muerte con el colorante anaranjado de acridina, lo cual no ocurrió (Tabla 1, artículo 1). Por otro lado, la intensidad de la señal observada en los interdigitos con los colorantes redox sensibles, así como en las

regiones anteriores y posteriores de las extremidades, parece que no se debe a un incremento en la actividad de las deshidrogenasas, ya que otros autores han reportado una mayor actividad por lo menos de la succinato deshidrogenasa en los dígitos, comparada con los interdígitos, utilizando en su bioensayo al NBT y succinato de sodio como sustrato para la reacción en el medio de incubación (Hammar y Mottet, 1971).

A pesar de que la reducción del MTT o del NBT no son marcadores específicos de la producción de superóxido, la generación del precipitado formazán, se ha reportado que se genera preferentemente por la presencia de superóxido (Rice-Evans, *et al.*, 1991). Así que la fuerte tinción que observamos en el tejido interdigital, y en otras regiones en donde ocurre la muerte celular, claramente indican que las células en estos tejidos se encuentran en un estado metabólico diferente, el cual nosotros interpretamos como un estado de estrés oxidativo. Esta interpretación se ve reforzada por los patrones de tinción observados con otro colorante redox sensible el C-DCDHF-DA (Fig. 5, 6 y 7, artículo 1), y por la protección de la muerte en el interdígito por los tratamientos con los diferentes antioxidantes (Fig. 1, 2 y 3, artículo 1).

Parecería entonces que el estrés oxidativo participa en la fase de activación de la apoptosis. Las EOR no parecen participar como parte de la maquinaria de ejecución, ya que si la muerte fuera debida a un daño provocado por la oxidación de los diferentes componentes celulares, muy probablemente este proceso sería irreversible y no sería posible proteger de la muerte por los tratamientos con antioxidantes.

Queda aún por estudiar cual o cuales son los blancos de las EOR y por medio de qué mecanismos modulan la muerte celular. Diferentes EOR se han reportado que funcionan como segundos mensajeros en la transducción de las señales (Khan y Wilson, 1995) responsables de diferentes procesos, no solo durante la muerte celular, sino también parecen participar en la diferenciación celular (Suda *et al.*, 1993; Clair *et al.*, 1994), en la quimiotaxis, en la proliferación (Sundaresan *et al.*, 1995) y en el envejecimiento (Edgington, 1994).

Otros mecanismos por medio de los cuales parecen también modular las EOR sus efectos, son la fosforilación de las tirosinas en las vías de transducción de las señales dependientes de este proceso (Lander *et al.*, 1995; Monteiro y Stern, 1996). De manera adicional afectan la afinidad de unión al ADN de diferentes activadores transcripcionales (Sun y Oberley, 1996). En particular es interesante el factor de transcripción p53; residuos de cisteína participan en la regulación de la capacidad de unión al ADN por parte de la proteína p53, y la regulación se debe a cambios conformacionales que son redox dependientes (Rainwater *et al.*, 1995). La

actividad *in vitro* de p53 parece ser modulada tanto por la tioredoxina (Pearson y Merrill, 1998) como por la proteína Ref-1 (Jayaraman, *et al.*, 1997), por vías redox dependientes. Ref-1 cataliza la reparación de lesiones oxidativas en el ADN, pero adicionalmente estimula la actividad de unión al ADN de factores de transcripción como AP-1 y p53 por cambios en el estado redox de cisteínas específicas (Jayaraman, *et al.*, 1997). Estos reportes pueden sugerir varias posibilidades de mecanismos de regulación: a) que p53 es un posible blanco de las EOR, los cuales modifiquen directamente el estado oxidado o reducido de las cisteínas redox sensibles; b) que las EOR disminuyan las posas de glutatión reducido que dan poder reductor a la célula y modifiquen el estado redox intracelular, y mediante este mecanismo indirecto, alteren la actividad de moléculas como las tioredoxinas o Ref-1; y los cambios redox en estas moléculas a su vez podrían afectar la actividad de p53; esto implicaría una especie de cascada de oxidorreducción iniciada por las EOR que alteran la afinidad de factores de transcripción y de esta manera podrían modificar los patrones de expresión de genes participantes en el control de la muerte.

Sin embargo, existe aún otra posibilidad y es que las EOR se encuentren debajo de la cascada de activación de p53. Se sabe que p53 regula la transcripción de varios genes que participan en el control del estado redox intracelular (Johnson *et al.*, 1996; Polyak *et al.*, 1997), algunas de las proteínas que codifican participan en la formación de EOR. Es posible que estas EOR producidas tengan otro blanco sobre el cual actúen y así modulen el proceso de muerte.

Sin embargo es importante señalar que ratones deficientes en la expresión de p53, se desarrollan normalmente, y solo son más susceptibles en la formación de tumores espontáneos (Donehoffer *et al.*, 1992)

De manera adicional se ha reportado que el incremento en la expresión de *ref-1* en el cerebro correlaciona con las regiones en donde se expresan tanto *fos* como *jun* (revisado en Jayaraman, *et al.*, 1997). Debido a que al menos la expresión de *fos* se estimula por el estrés oxidativo (Cerutti *et al.*, 1989; Shibamura *et al.*, 1990); es posible que la correlación en la expresión entre *ref-1* y *fos* quiera decir que en las regiones en que se expresan se encuentran en estado de estrés oxidativo, y estos genes se expresan en respuesta a este proceso.

Sería muy interesante verificar a detalle el orden que sigue la cascada de regulación p53 o alguno de sus homólogos, *ref-1*, EOR y la muerte celular *in vivo* durante el desarrollo embrionario; como p53 tiene la capacidad de regular la transcripción de genes relacionados en la producción de EOR, y además su actividad de unión al ADN es regulada por el estado redox de cisteínas presentes en la proteína, posiblemente

existe un circuito de regulación, en donde p53 induce la producción de EOR, estos a su vez modifican el estado redox de p53 y así provocan que ya no se produzcan más EOR. Este podría ser el mecanismo responsable de que ocurran picos transitorios de acumulación de EOR al inicio del proceso de muerte, ya que si la acumulación continuara aún después de la fase de activación, esto potencialmente tendría la capacidad de inhibir la muerte, ya que parte de las moléculas efectoras (las caspasas) de los cambios que ocurren durante la apoptosis, son sensibles al estado redox de las cisteínas que se encuentran en su sitio activo, que cuando se encuentran en estado oxidado pierden actividad (Nobel *et al.*, 1997).

¿La evidencia a favor de que las EOR participan en el control de la muerte celular es conclusiva?

La evidencia presentada a favor de que las EOR participan en la muerte celular no es completamente concluyente. Esta afirmación se basa en que algunos autores (como Slack, 1995) han propuesto que para tener una evidencia clara a favor de que un factor inductor es responsable del proceso biológico que se estudia, se necesita cumplir al menos con tres grupos de criterios, los cuales se discuten a continuación:

1) El criterio de expresión: el factor debe expresarse o estar presente en el lugar en donde ocurre el evento que se estudia. En este caso tenemos evidencia de una producción de EOR acentuada en las regiones interdigitales en donde ocurre la muerte; faltarían definir los mecanismos que promueven su síntesis o acumulación (ver más adelante).

2) El criterio de inhibición: en donde la inhibición específica del factor debe prevenir que ocurra el proceso que presuntamente induce *in vivo*. En este sentido tenemos evidencia parcial debido a que los tratamientos con antioxidantes disminuyeron la muerte celular. En el laboratorio se están siguiendo alternativas experimentales para verificar estos resultados. Se pretende dirigir la expresión de diferentes enzimas como SOD o catalasa, que metabolizan EOR, o bien la expresión de Bcl-2 la cual como se mencionó anteriormente, altera el potencial redox intracelular volviéndolo más reductor (Hockenbery, 1993) a tejidos en donde ocurre la muerte. Se piensa dirigir la expresión al tejido interdigital utilizando parte del promotor del receptor del ácido retinoico RAR β , el cual se expresa en este tejido de manera muy abundante (Dollé *et al.*, 1989). Por otro lado, se pretende hacer un estudio del patrón de expresión y la actividad de algunas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de las EOR mejor conocidas como la catalasa, la SOD y las peroxidasas.

3) El criterio de activación: en este criterio se propone que al provocar la síntesis o al añadir al presunto factor inductor se debe iniciar el proceso biológico esperado. En este sentido en

parte de la tesis se intentaron 2 estrategias:

a) adicionar peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo de extremidades ya que se ha reportado que promueve la muerte en otros sistemas (Hockenbery *et al.*, 1993). Se encontró que la adición de peróxido de hidrógeno, no fue capaz de incrementar la muerte interdigital, incluso lo que se observó fue una disminución, y en los interdigitos se formaron condensaciones de cartilago que se asemejan mucho a falanges extras (resultados no mostrados). Estos resultados pueden interpretarse de varias formas. Por un lado pueden ser evidencia en contra de que las EOR participan en el control de la muerte. Sin embargo, consideramos que este no es el caso, principalmente debido a los resultados en que se observó una tinción intensa en los interdigitos con los colorantes redox sensibles y por la protección contra la muerte por los antioxidantes argumentan a favor del papel de las EOR en el control de la muerte. Sin embargo, no se puede descartar completamente esta posibilidad. Consideramos otras explicaciones alternativas al efecto del peróxido de hidrógeno sobre la muerte y la diferenciación interdigital. Por un lado en la tesis hemos hablado de manera genérica, refiriéndonos a las EOR, debido a que desconocemos si existe una EOR particular o bien si son un conjunto de EOR las responsables del control de la muerte, ya que *in vivo* muchas de estas moléculas se interconvierten rápidamente a otras y su metabolismo es muy complejo (Ullah y Wilson, 1995), lo que dificulta la identificación de la EOR responsable de un proceso determinado. Por otro lado, como se mencionó anteriormente las EOR se han relacionado con el control de otros procesos celulares, así que todavía queda por explorar si diferentes EOR intervienen en procesos específicos (muerte, diferenciación, migración, etc.), o bien si las mismas moléculas son capaces de inducir procesos diferentes, pero que esto dependa de la concentración de la EOR responsable y que la respuesta sea iniciada al rebasar concentraciones críticas. Además, pueden afectar otro tipo de señales que recibe la célula y/o el estado metabólico y fisiológico de ésta; esto puede provocar que la célula integre la información con respuestas diferentes.

b) el AR incrementa la producción de EOR y es capaz de inducir muerte celular en cuerpos embrioides, pero esta muerte puede ser prevenida por tratamientos con diferentes antioxidantes (Castro-Obregón y Covarrubias, 1996), se ha intentado verificar si el AR participa en la vía de inducción de la muerte y si ésta es EOR dependiente. Este punto se discutirá a fondo más adelante en el apartado correspondiente al AR.

A pesar de que la evidencia presentada no es completamente concluyente sobre la función de las EOR en el control de la muerte, los resultados justifican el continuar explorando por medio de estrategias alternativas si las EOR cumplen los tres criterios para afirmar que son factores que

participan en los mecanismos que activan la apoptosis en el desarrollo embrionario.

El papel fundamental de las mitocondrias en el control de la muerte celular.

Las EOR pueden producirse no sólo en la cadena respiratoria de las mitocondrias, existen vías enzimáticas descritas en otros compartimentos celulares que provocan una reducción parcial del oxígeno, como en el retículo endoplasmático, en los peroxisomas, en la membrana nuclear, en el citoplasma y en la membrana plasmática (Fisher, 1987). Sin embargo, se piensa que las mitocondrias son el sitio principal en el que se producen la mayor cantidad de EOR.

Se ha observado en varios modelos de muerte celular dependientes de EOR, que tanto su acumulación como el proceso de apoptosis requieren de la cadena respiratoria mitocondrial funcional para que se lleve a cabo la muerte (Schulze-Osthoff *et al.*, 1993; Quillet-Mary *et al.*, 1997). Utilizando a la ceramida como inductor de muerte en la línea celular U937 de leucemia humana, se ha observado un incremento en la generación de EOR, así como de la muerte. Al utilizar una línea U937 modificada que es deficiente en la cadena respiratoria, ya que presentan una eliminación de ADN mitocondrial y una actividad muy disminuida del complejo III de la cadena respiratoria, y ser tratada con ceramida no se observa la producción de EOR, lo cual sugiere un papel fundamental del complejo III en la producción de EOR en la muerte inducida por ceramida. De manera adicional tratamientos con inhibidores de la cadena respiratoria, como la rotenona que inhibe al complejo I, el TFA que inhibe al complejo II, se provoca una inhibición casi completa de la formación de EOR inducida por ceramida, pero si los tratamientos con ceramida son simultáneos con un inhibidor del complejo III, la antimicina A, se incrementa la producción de EOR en más de 2 veces. Es importante señalar que de manera adicional se observo una disminución en la cantidad de células apoptóticas, inducidas por la ceramida, con los inhibidores de los complejos I y II, pero una clara potenciación del efecto de la ceramida en la muerte, con el inhibidor del complejo III (Quillet-Mary *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que cambios en la transferencia de electrones cercanos o a nivel del complejo III podrían ser las responsables de la generación de EOR y del inicio del proceso de muerte. En este sentido estudios recientes sugieren que la liberación del citocromo c de la mitocondria al citoplasma induce las fases iniciales de la muerte (Liu *et al.*, 1996), parece que el citocromo c lo que favorece es la unión de Apaf-1 (presunto homólogo de CED-4 de *C. elegans* en mamíferos) con la caspasa-9, lo que provoca la activación de la caspasa-9, la cual a su vez activa a la caspasa-3. Esto implicaría que la liberación del citocromo c al

citoplasma participa en la activación de la caspasa-9 y en el inicio de la cascada de las proteasas que provocan la muerte celular (Li *et al.*, 1997). Diferentes tipos de estudios han demostrado que la mayor parte de la proteína Bcl-2 se encuentra principalmente localizada en la membrana de mitocondrias (Hockenbery *et al.*, 1990) así como en otras membranas como el retículo endoplasmático y la membrana nuclear (Chen-Levy *et al.*, 1989; Monaghan *et al.*, 1992). Se ha reportado que Bcl-2 actúa en las mitocondrias y evita que el citocromo c sea liberado al citoplasma y que éste a su vez inicie la activación de las caspasas (Yang *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997). Potencialmente la misma liberación del citocromo c (que transfiere electrones al complejo III) de la mitocondria, debe provocar un rompimiento del flujo electrónico en la cadena respiratoria, debajo de la ubiquinona, lo cual en principio puede ser la responsable del incremento en la producción de EOR (Mignotte y Vayssiere, 1998). Esto sugiere que de alguna manera el citocromo c es una de las blancas de las señales que inducen la muerte celular, por lo que deberían caracterizarse los mecanismos que provocan que Bcl-2 libere al citocromo de las mitocondrias.

Quedaría por demostrar si un proceso similar ocurre durante la muerte celular en el desarrollo embrionario, y ésta no es únicamente una respuesta que ocurre en sistemas *in vitro*. Así mismo queda aún por contestar si las EOR tienen blancos específicos por medio de los cuales regulan su actividad proapoptótica, o bien si actúan de manera indirecta, como por ejemplo bajando las posas de agentes reductores como el glutatión, y si esta disminución es la que modifica el estado redox de diferentes componentes, como factores de transcripción, promoviendo así el proceso de muerte celular.

EOR en el desarrollo embrionario.

El estado redox intracelular y/o las EOR podrían participar en otros procesos además de la muerte celular durante el desarrollo embrionario. En algunos modelos *in vitro* se ha observado que las EOR, además de participar en el control de la muerte celular (Greenlund *et al.*, 1995; Goossens *et al.*, 1995; Castro-Obregón y Covarrubias, 1996; Jabs *et al.*, 1996), participan en la diferenciación celular (Suda *et al.*, 1993; Clair *et al.*, 1994), en la quimiotaxis, en la proliferación (Sundaresan *et al.*, 1995) y en el envejecimiento (Edgington, 1994) de diferentes tipos celulares. Por otro lado, se han reportado cambios en el estado redox en el desarrollo embrionario temprano en diferentes organismos, como es el caso de la fertilización en erizos de mar, en donde se producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno por una actividad de tipo oxidorreductasa. El peróxido de hidrógeno funciona como sustrato para la ovoperoxidasa para formar parte de la envoltura de fertilización.

la cual es una barrera que participa en evitar la poliespermia durante la fertilización (Heinecke y Shapiro, 1989). Es interesante que en embriones de ratón se han reportado también actividad de oxidasas (NADH)-dependientes, en células del trofoblasto durante la implantación del embrión en el útero (Gagioti *et al.*, 1995). Estos reportes sugieren entonces que el estrés oxidativo participa potencialmente en la regulación de otras respuestas celulares aparte de la muerte durante el desarrollo embrionario. De ser así se puede predecir que al modificar el estado redox se encontrarían efectos en diferentes procesos como la proliferación, la diferenciación, la migración y el envejecimiento. Aun cuando no evaluamos ninguno de estos procesos en las extremidades incubadas con antioxidantes sería interesante buscar los métodos más adecuados para estudiar a fondo sus efectos. Sin embargo, los resultados obtenidos con el tratamiento con el peróxido de hidrógeno sobre las extremidades embrionarias de ratón, arriba mencionados, podrían representar un caso en el cual las EOR participan en la diferenciación del interdígito. Faltaría caracterizar este efecto a fondo para definir que mecanismos están disparándose al hacer los tratamientos con el peróxido de hidrógeno.

El control del estado redox en el desarrollo embrionario.

Los reportes mencionados en el apartado anterior, así como las tinciones de embriones de ratón con los colorantes redox sensibles (Fig. 5 a la 7, artículo 1), sugieren que durante el desarrollo embrionario, ocurre un control muy fino de los patrones espaciales y temporales de generación/degradación de EOR *in vivo*. Es muy posible que durante el desarrollo embrionario se regule el estado redox intracelular, tanto a nivel de la producción y el metabolismo de las EOR, así como de la síntesis de otras moléculas participantes en el control redox intracelular (glutación, tioredoxina, Ref-1), en donde el balance neto de estas actividades, darían como resultado estados redox específicos para cada linaje celular, que adicionalmente generarían respuestas diferentes dependiendo del tipo celular en el que ocurra, de la intensidad en el cambio en el estado redox y de otras señales que este recibiendo la célula blanco en ese momento.

Con respecto a la generación de EOR parecen existir mecanismos especializados para su producción. La explosión respiratoria mejor caracterizada es la que ocurre en macrófagos (Morel *et al.*, 1991; Rice-Evans *et al.*, 1991), sin embargo durante el desarrollo embrionario también parecen ocurrir eventos de explosión respiratoria, como los mencionados en el apartado anterior. Sería muy interesante caracterizar a futuro si en las células mesenquimáticas observadas en estrés oxidativo (Fig. 6, artículo), la vía responsable de los cambios redox observados es por medio de oxidasas (NADH)-dependientes o

bien se debe a un incremento en la producción de EOR dependiente de la actividad mitocondrial.

Por otro lado varios mecanismos parecen participar en el metabolismo de EOR durante el desarrollo embrionario. Se ha reportado que en embriones de ratón previo al nacimiento, ocurre un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en los pulmones, lo cual se ha interpretado como una preparación de este tejido para enfrentar a la respiración. Sin embargo, reportes recientes muestran que ocurre un incremento en la actividad de superóxido dismutasa Cu/Zn y de la glutatión peroxidasa previa al nacimiento en otros órganos, y no únicamente en los pulmones como se había reportado (de Haan *et al.*, 1994). De manera adicional resultados obtenidos en el laboratorio por el Dr. Luis Covarrubias, la Dra. Hilda Lomeli, Denhi Schnabel y Rodrigo Cuervo (resultados sin publicar), sugieren cambios en los patrones de actividad de peroxidases en el desarrollo de las extremidades de ratón, precisamente han encontrado actividad de este tipo en el tejido correspondiente a los dígitos, en los momentos en que los interdígitos presentan una fuerte tinción con los colorantes redox sensibles. Por su parte la proteína Bcl-2 se ha reportado que se expresa preferentemente en los dígitos durante el desarrollo de las extremidades del ratón (Novak y Korsmeyer, 1994). Estos reportes y los resultados de la presente tesis sugieren varias cosas. En primer lugar que durante el desarrollo tardío (S8-S12) de las extremidades, las diferencias en la actividad antioxidante de las peroxidases y posiblemente la actividad antioxidante de Bcl-2, participan en reducir las EOR en los dígitos, y que la ausencia de estas actividades en los interdígitos podría ser en parte responsable de la acumulación de EOR. Adicionalmente, si en los interdígitos existe una actividad generadora de EOR (podría ser NADPH oxidasa dependiente o bien mediado por la liberación del citocromo c de la cadena respiratoria), la cual no sea activa en los dígitos, esta actividad combinada potenciaría las diferencias en estados redox entre dígitos e interdígitos. Otra posibilidad es que exista una actividad generadora de EOR homogénea en toda la extremidad, pero que la actividad antioxidante diferencial sea la única responsable de generar los patrones dígito-interdígito en las extremidades y los patrones redox complejos observados en otros órganos (Fig. 7, artículo 1). En este sentido resulta muy importante caracterizar si existen patrones de expresión diferenciales de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, peroxidases) y de las moléculas que regulan el estado redox intracelular como glutatión, tioredoxina, Ref-1, Bcl-2, etc., y el como se relaciona la expresión de los genes de estas moléculas, así como las actividades, con los estados redox en diferentes tejidos. Los resultados preliminares obtenidos por compañeros del laboratorio son muy prometedores y son buenos argumentos a favor de caracterizar

con mayor detalle esta posibilidad. Nuevamente el desarrollo de las extremidades podría ser un modelo adecuado para comenzar esta caracterización.

Diferenciación a cartilago de las células interdigitales sobrevivientes.

Algunos de los componentes de la matriz extracelular que son sintetizados por el cartilago, son las colágenas (como la tipo II) y los proteoglicanos (Chen *et al.*, 1995). La expresión de sus ARNs mensajeros o la acumulación de las proteínas codificadas por estos mensajeros, se han utilizado como marcadores para la detección del proceso de condrogénesis (Hurle *et al.*, 1989; Fernandez-Teran y Hurle, 1984). Los resultados obtenidos en la presente tesis, muestran que cuando la muerte interdigital es inhibida por la adición de agentes antioxidantes, las células "rescatadas" inician aparentemente el proceso de condrogénesis en el interdígito (determinado por la tinción con azul alciano y por el marcaje con aglutinina de cacahuete fluoresceïnada, Fig. 19 y 20). Sin embargo, cabe mencionar que la diferenciación hacia cartilago no es completa, debido a la ausencia de expresión de ARN mensajero de la colagena tipo II (datos no mostrados). Es posible que algunos factores no presentes en los interdígitos, son requeridos para que se forme cartilago maduro; o bien alguna actividad inhibidora en esta región bloquea las fases finales de la condrogénesis. Algunos grupos de investigación han sugerido que el ectodermo interdigital, tiene actividad inhibidora de la condrogénesis sobre el mesénquima del interdígito (Hurle *et al.*, 1989). Es importante señalar que aún después de la incubación de las extremidades con los antioxidantes el epitelio permanece histológicamente intacto en nuestros experimentos, por lo que la disminución en la cantidad de muerte interdigital no se debe a la ausencia del ectodermo (Fig. 3, artículo 1), a pesar de esto es posible que la condrogénesis no se complete debido a que los factores que naturalmente inhiben este proceso en el tejido interdigital continuaron evitando la diferenciación completa de las células localizadas en estas regiones.

— En el nemátodo-*C. elegans*, las mutaciones en los genes *ced-3* o *ced-4* permiten sobrevivir a las células que normalmente están destinadas a morir (Ellis y Horvitz, 1986). Las células que sobreviven se diferencian en los fenotipos predecidos para los linajes celulares a los que pertenecen. Incluso se ha observado en otros tipos celulares en los cuales se ha prevenido la muerte, que son capaces de diferenciarse (Fairbairn *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1993). La expresión de diferentes marcadores de condrogénesis en el tejido interdigital sobreviviente en los tratamientos con antioxidantes, revela el potencial condrogénico en esta línea celular, normalmente comprometida a

morir. Acorde con estos resultados, otros grupos han observado el potencial condrogénico del tejido interdigital, cuando se cultivan *in vitro* explantes de estas regiones (Lee *et al.*, 1994) y en interdígitos de extremidades traseras de pollo, a las cuales se les ha removido el tejido epitelial (Hurle y Gañán, 1986). Es interesante el hecho de que en los embriones de pollo tratados con verde Janus, también se ha reportado que ocurre condrogénesis interdigital (Fernandez-Teran y Hurle, 1984), sin embargo en estos reporte sólo se ha verificado la condrogénesis por tinciones similares a las que utilizamos en la presente tesis (como el azul alciano), y no utilizaron otros marcadores moleculares como el de la colágena tipo II.

Es posible que antes de que se definan las regiones que formarán a los dígitos y de que comience la regresión interdigital, el mesénquima de las regiones digitales e interdigitales sean hasta cierto punto equivalentes, y la muerte celular que ocurre en el interdígito es el resultado de la acción de señales que promueven la sobrevivencia de las células digitales y de las señales que promueven la muerte en las regiones interdigitales, posiblemente por alguno de los mecanismos propuestos en secciones anteriores de la tesis.

LOS RETINOIDES EN EL CONTROL DE LA MUERTE CELULAR

El ácido retinoico en el control de la muerte celular durante el desarrollo embrionario.

Se ha reportado que el ácido retinoico es un agente teratogénico muy potente, ya que al ser administrado por vías diversas a ratones hembras gestantes induce malformaciones en los embriones; además algunos grupos han observado un marcado incremento en la muerte celular en diferentes órganos dependiendo del estadio embrionario en el que fueron expuestos al AR (Sulik *et al.*, 1988). Particularmente interesante es el hecho de que en los apéndices de embriones tratados se incrementa la muerte celular (Alles y Sulik, 1989). Por otro lado, diferentes grupos han reportado expresión del receptor de ácido retinoico RAR β en los interdígitos en las etapas en que ocurre muerte celular (Fig. 26) (Dollé *et al.*, 1989), lo que ha llevado a proponer que el ácido retinoico posiblemente es una de las moléculas involucradas en el control de la muerte que ocurre en los interdígitos. Sin embargo, no existe evidencia experimental directa de que el AR endógeno participa de manera natural en el control de este proceso.

En la literatura hemos encontrado reportado que las enzimas que participan en la biosíntesis del ácido retinoico, se expresan en las extremidades en desarrollo, precisamente en las etapas en que ocurre la muerte celular (Fig. 26). Se ha observado que con el uso de genes reporteros cuya expresión se encuentra regulada

bajo el promotor de la alcohol deshidrogenasa 3 de humano, se puede dirigir su expresión al ectodermo apical distal en las etapas en que se inicia el proceso de muerte (Zgombic-Knight, 1994). Por otro lado, la enzima aldehído deshidrogenasa tipo 2 se ha reportado recientemente que se expresa en los interdigitos previo a la expresión del RAR β (Niederreither *et al.*, 1997), precisamente en las mismas etapas. Los resultados presentados en las figuras 22 a 24 y en la tabla 3, son la primera evidencia experimental *in vivo* de que el ácido retinoico que se produce endógenamente en las extremidades participa en el control de la muerte interdigital. Se comprobó la especificidad de este efecto sobre la muerte, de lo contrario las competencias mostradas en la fig. 24, hubieran mostrado un efecto inhibitorio de la muerte por citral, aún en presencia del ácido retinoico. Como era de esperarse en un efecto específico, el citral redujo la muerte provocada solo por el retinol y no por el ácido retinoico (ver Fig. 24 y 27).

Mecanismos de inducción de apoptosis por el AR.

Se planteó como hipótesis (Fig. 6 y Fig. 27) la posibilidad de que la muerte inducida por el AR fuera mediado por EOR. Principalmente esto

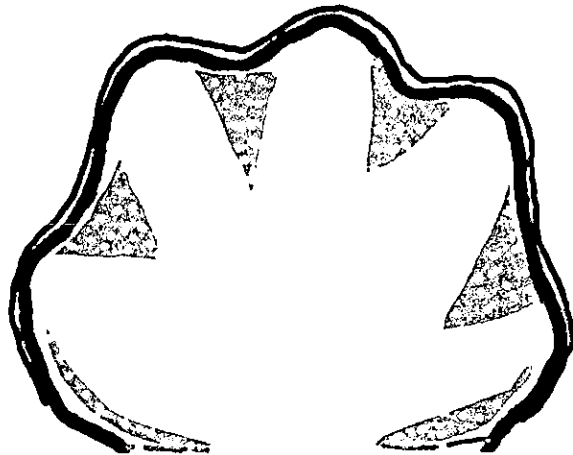


Fig. 26.- Patrones de expresión de ADH (línea azul), ALDH-2 (morado claro), RAR β (puntos azul claro) y de transglutaminasa (morado claro y puntos azul claro).

se basó en los resultados reportados previamente en el laboratorio, en donde se encontró que la muerte celular puede ser inducida por AR en cuerpos embrioides, y esta es precedida por un incremento en EOR; de manera adicional se observó que la muerte podía ser evitada por el tratamiento simultáneo con agentes antioxidantes (Castro-Obregón y Covarrubias, 1996). Sin embargo en la presente tesis no ha sido posible demostrar si las EOR median la muerte inducida por el AR en las extremidades en desarrollo. Existe la posibilidad de que a los tiempos observados (6 y 12 hr) no se sean los adecuados para detectar picos de producción de EOR, y que estos se generen a tiempos de incubación más cortos, debido a que en otros sistemas el estrés oxidativo ocurre alrededor de las 3 h de la señal que induce la muerte celular. Esta posibilidad sigue abierta para ser explorada a fondo. De manera adicional sería interesante poner a competir el efecto del AR con antioxidantes y ver si de esta forma se evita la muerte.

Sin embargo existe otra posibilidad, y es el que la vía de muerte inducida por el AR sea independiente de la generación de EOR, y que estas moléculas funcionen *in vivo*, como un evento que refuerza al proceso de inicio de la apoptosis en conjunción con la vía del AR, como fue sugerido en la discusión de la publicación 1.

El AR es capaz de inducir la expresión de la transglutaminasa (Zhang *et al.*, 1995), la cual se ha reportado que su sobre expresión incrementa la muerte celular en una línea de neuroblastoma de humanos (Melino *et al.*, 1994), por lo que ésta podría ser una vía que inicia la muerte y no requiera de manera directa la formación de EOR; a menos de que los derivados del oxígeno aparezcan o funcionen debajo de la cascada iniciada por la transglutaminasa. También se ha observado que el AR es capaz de suprimir la expresión de *bcl-2* (Okazawa *et al.*, 1996), lo cual sugiere que esta sería una forma de aumentar la sensibilidad a la muerte por el AR, y quedaría por definir si esta disminución en la síntesis de *bcl-2* afecta a la muerte por una vía redox dependiente o independiente. Sería muy interesante verificar si esto ocurre durante los tratamientos con el AR en las extremidades del ratón, o bien si los retinoides endógenos regulan de manera natural la expresión de *bcl-2*.

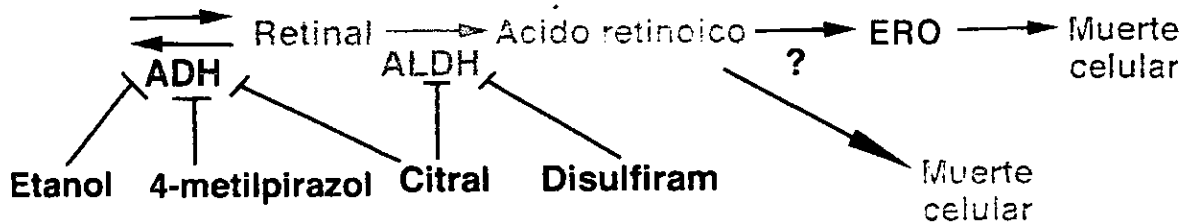


Figura 27.- Puntos de inhibición de la síntesis del AR por diferentes agentes.

Finalmente, la muerte inducida por el AR puede ser regulada a nivel de la transcripción de muchos genes aparte de los ya mencionados arriba. La regulación transcripcional mediada por los diferentes receptores a retinoides es muy compleja (Nagy *et al.*, 1998). Sólo algunos receptores están relacionados con el control de la muerte en el desarrollo de las extremidades, como los receptores RAR α y el RAR γ , que al hacer "knock out" de sus genes, se provoca sindactilia parcial, solo al combinar las mutaciones se provoca un fenotipo más penetrante (Kastner *et al.*, 1997). El RAR β a pesar de que se expresa específicamente en los interdigitos (Dollé *et al.*, 1989), la disrupción génica de este receptor, no provoca efectos sobre la muerte o regresión del tejido interdigital (Mendelsohn *et al.*, 1994). Solo tiene efectos la disrupción génica de RAR β en combinación con la mutación de otros receptores, RAR γ , y la combinación de AR α y RAR γ (Kastner *et al.*, 1997). Sin embargo queda aún mucho por explorar sobre el papel de los receptores y los genes blanco, en la regulación de la muerte inducida por el AR.

Requerimiento del ectodermo para el control de la muerte celular.

Se ha propuesto que el tejido ectodérmico produce factores difundibles que inhiben la condrogénesis (Solursh, 1984). Cuando se remueve el ectodermo de los espacios interdigitales en ciertas etapas del desarrollo de las extremidades en pollo, se generan formaciones ectópicas de cartilago o dígitos extras en los espacios interdigitales, aunque de tamaño muy reducido (Hurle, *et al.*, 1989) en las extremidades de ratón de etapas del desarrollo equivalentes hemos observado un efecto similar (datos no mostrados, generados por nosotros). Se ha determinado que en parte el efecto en el interdígito se debe a la disminución en apoptosis de este tejido (Hurle-y-Gañán, 1986). Sin embargo, si la remoción del ectodermo se realiza en etapas del desarrollo posteriores, cuando comienza de manera notoria la muerte celular interdigital, no se llega a formar estas condensaciones (Hurle *et al.*, 1989). Lo anterior sugiere que el ectodermo en etapas críticas del desarrollo interviene en dirigir la regresión del tejido interdigital; proponemos que este proceso es mediado porque en la parte del ectodermo correspondiente a la CEA se lleva a cabo la primera etapa de la biosíntesis del AR, la conversión del retinol al retinal. Sería muy interesante verificar esta posibilidad de la siguiente manera. Si la ADH responsable de la conversión del retinol a retinal se encuentra en la región correspondiente a la CEA que se remueve, entonces al quitar la CEA, si el efecto del retinol añadido al cultivo es específico, no debería el retinol de incrementar la muerte en las extremidades en cultivo, y se observaría la

formación de condensaciones de cartilago interdigital. Por el contrario sus derivados como el retinal y el AR deberían provocar la regresión del interdígito y evitar la formación de cartilago interdigital. Solo si el epitelio aporta factores o señales adicionales estrictamente indispensables para que se lleve a cabo la muerte, seguirían formándose las condensaciones de cartilago.

Requerimiento del ectodermo para la proliferación celular en la zona de progresión.

El epitelio correspondiente a la CEA además de jugar un papel en la regresión del interdígito, en etapas más tempranas también participa en la proliferación del mesénquima subyacente (llamado zona de progresión Fig. 4) lo que permite el crecimiento de las extremidades en el eje proximo-distal (Rowe, *et al.*, 1982), esta proliferación es promovida por factores de crecimiento como el FGF8 y FGF4 (Crossley y Martin 1995, Mahmood *et al.*, 1995) que se expresan en la CEA. Diferentes FGFs pueden sustituir la deficiencia de la CEA en la promoción del crecimiento en el eje proximo-distal en las extremidades (Niswander *et al.*, 1993; Mahmood *et al.*, 1995). Se ha observado además que los FGFs regulan también la expresión de dos genes con caja homeótica *Msx-1* y *Msx-2* (Robert *et al.*, 1991; Sumoy *et al.*, 1995; Wang y Sassoon, 1995), los cuales se ha propuesto que participan en la proliferación y en procesos de regeneración en las extremidades del ratón (Regnelli *et al.*, 1995). Al menos se ha comprobado que los factores de crecimiento FGF-2 y FGF4 mantienen la expresión de *Msx-1* en extremidades de ratón y de pollo en desarrollo (Watanabe e Ide, 1993; Fallon *et al.*, 1994; Wang y Sasson, 1995). Evidencia adicional en sistemas *in vitro* muestran que al provocar la sobreexpresión de *Msx-1* en la línea celular de mioblastos F3, se induce la transformación y se evita la diferenciación de esta línea celular (Song *et al.*, 1992).

Curiosamente la expresión de los genes *Msx*, se ha correlacionado también con la apoptosis que ocurre en el desarrollo del rombencéfalo (Graham *et al.*, 1993) y en los interdigitos (Davidson, 1995). Por otro lado, el proto-oncogene *c-fos*, que codifica para una proteína reguladora de la expresión génica, al sobreexpresarse en algunos tipos celulares provoca su proliferación (Sylvester *et al.*, 1998). Sin embargo, durante el desarrollo embrionario del ratón, se ha reportado que su expresión correlaciona con regiones donde ocurre apoptosis (Smeyne *et al.*, 1993) aún cuando la muerte celular puede ocurrir en su ausencia (Gajate *et al.*, 1996). Finalmente ya se mencionó que la expresión de *c-fos* es alterada dependiendo del estado redox intracelular (Shibanuma *et al.*, 1990; Cerutti *et al.*, 1989), lo cual sugiere que su expresión, al menos en las zonas de muerte en el desarrollo de las extremidades, responde al estado redox de esta región, pero no participa en

el mecanismo de control de la muerte celular. Es entonces importante a futuro, el determinar como interaccionan estas diferentes señales para dar origen a cada una de las respuestas (proliferar o morir), dependiendo del tipo celular y su localización espacial y temporal; o bien sería importante determinar si cada una de estas señales actúa de manera independiente, simplemente al reforzar el proceso en el que participan. Sin embargo, parecería que estos procesos interactúan debido a que por lo general cuando se inhibe la muerte celular interdigital también se ha observado que se afecta el crecimiento de los dígitos y en ocasiones se provoca hipofalangia (Yokouchi *et al.*, 1996; Zou y Niswander 1996; Salas-Vidal *et al.*, 1998).

La CEA y su interacción con la zona de progresión.

Existe una interdependencia entre los diferentes componentes de las extremidades, si la CEA es removida, el mesodermo subyacente deja de proliferar y ya no se determinan los componentes distales de las extremidades (Rowe, Cairns y Fallon, 1982), sin embargo es recíproca esta interacción, debido a que las células de la CEA mueren cuando mesodermo que normalmente no da origen a extremidades es implantado debajo de la cresta o la CEA es cultivada en ausencia de mesodermo (Searls y Zwilling, 1964; Zwilling, 1964).

La CEA aparece en el desarrollo de las extremidades de ratones hasta el estadio 3, y comienza la regresión, a partir del estadio 7 y desaparece en su mayor parte en el estadio 8, según Wanek *et al.* (1989), es precisamente en el estadio 9, en que comienza la muerte celular en las regiones interdigitales. Sin embargo, es importante hacer notar que estudios previos han sugerido que la CEA desaparece primero de los interdígitos y permanece mayor tiempo presente en la región correspondiente a los dígitos (Milaire y Rooze, 1983). De manera adicional, se ha observado que la expresión de los genes *Msx-2* y *4* continúa en el mesénquima de los dedos mientras que en el interdígito ocurre la regresión del tejido (Reginelli *et al.*, 1995) lo que podría en parte explicar el que sigan creciendo los dígitos. Sería interesante el verificar que los marcadores moleculares que participan en la promoción de la proliferación de la zona de progresión como FGF-8 y FGF-4, se expresan en el remanente de la CEA que permanece en la punta de los dígitos, en las etapas en que ocurre la regresión los interdígitos, lo que indicaría que la CEA continúa activa en la promoción del crecimiento de la punta de los dígitos.

Otras señales involucradas en el desarrollo de las extremidades.

Otras señales que participan en el desarrollo de las extremidades son la generadas por los genes *Bmp*. Los *Bmp* codifican para

proteínas que originalmente fueron identificadas en extractos de huesos de bovinos, los cuales son capaces de inducir la formación de cartilago ectópico al ser implantados subcutáneamente en ratas. Existen reportados al menos quince proteínas BMP diferentes, que por la secuencia que presentan se han clasificado como miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento TGF- β . Únicamente la proteína BMP-1, presenta una estructura diferente y se ha propuesto que esta proteína posiblemente participa en la activación proteolítica de las otras BMPs (Reddi, 1998).

Por lo menos BMP-2 y BMP-4 se expresan desde muy temprano en el desarrollo de las extremidades de pollo, desde el estadio de Hamburger y Hamilton (H-H) 16-17. El BMP-4 se expresa en todo el mesénquima como en el ectodermo, y posteriormente en la CEA. En estadios más avanzados SH-H 20-24, se expresa tanto en el mesénquima anterior y posterior de manera pronunciada, y en el mesénquima subyacente a la CEA (Francis *et al.*, 1994). Algunas regiones de expresión de BMP-4 en estas etapas, coinciden con regiones en donde hemos observado muerte celular en las extremidades de ratón de estadios equivalentes del desarrollo, como en las regiones anterior y posterior (Fig. 10). Por su parte el BMP-2 se expresa también en la CEA (SH-H 16-17) pero en el mesénquima en la región más posterior, y así se mantiene hasta el estadio SH-H 25. Ya en etapas más avanzadas se observan tanto BMP-2 como BMP-4 en las regiones interdigitales, así como en las regiones anterior y posterior del margen de la palma de las patas, precisamente en las regiones en las que ocurre la muerte celular (Francis *et al.*, 1994).

Estos patrones de expresión son interesantes debido a que en el desarrollo en el rombencéfalo se ha correlacionado la expresión de BMP-4 con el control de la muerte en las células de la cresta neural, como se mencionó anteriormente (Graham *et al.*, 1994).

En las extremidades recientemente se ha obtenido evidencia de que la muerte interdigital también es mediada por los BMPs. Se ha reportado que BMP-2 y BMP-4, son capaces de interactuar con los receptores a BMPs tipo I y tipo II. El receptor tipo I forma un complejo con el ligando BMP-2 o BMP-4, este se asocia al receptor tipo II, el cual tiene actividad de cinasa constitutiva, por lo que fosforila al receptor tipo I, activando su función como cinasa, iniciando así la transducción de la señal. Utilizando un receptor BMP-2/-4 tipo Ia o tipo Ib dominante negativo (dn), se encontró que estos receptores dn reducen la muerte que ocurre en las zonas "necroticas" anterior, posterior, interna e interdigitales en el desarrollo de las extremidades en pollos (Yokouchi *et al.*, 1996; Zou y Niswander, 1996). Incluso la disminución de la actividad de estos receptores, cambia la expresión de diferentes genes, y depende del tipo de receptor utilizado.

En el receptor dn tipo la encontraron que se incrementa la expresión de *Bmp-4* en las células sobrevivientes, pero no cambia la expresión de *Msx-1* ni *Msx-2* (Yokouchi *et al.*, 1996). Sin embargo, en el dn lb encontraron en las células sobrevivientes expresión tanto de *Bmp-4* como de *Msx-2* (Zou y Niswander, 1996). Es importante el hecho de que en ambos trabajos encontraron que los tratamientos con los receptores dn, truncan la formación de los elementos más distales de las extremidades. Además en las extremidades de patos en donde la muerte celular es muy limitada (Zou y Niswander, 1996), se ha reportado que se expresan de manera significativa los *Bmp*, por lo que la ausencia de muerte en las extremidades posteriores de estos organismos no se debe a la ausencia de expresión de estas señales y deben responder a la ausencia de otra señal (Laufer *et al.*, 1997a). Por otro lado implantes en las regiones interdigitales con TGF β -1 y TGF β -2, disminuyen la proliferación y la muerte en este tejido; se induce la formación de cartilago ectópico, solo si se realiza en la etapa inmediata previa a la muerte masiva en el interdígito en pollos (SH-H 29). En este último caso se altera la expresión de diferentes genes; por ejemplo se induce la expresión de uno de los marcadores de condrogénesis reportados *ck-erg*, y se disminuye la expresión de *Msx-1*, *Msx-2* y *Bmp-4* (Gañán *et al.*, 1996). Es interesante la inducción de condrogénesis promovida por TGF β s debido a que la condrogénesis *in vitro*, e interdigital *in vivo* solo puede ocurrir si existe una cantidad crítica de células precursoras (Cottrill *et al.*, 1987; Hurler, Gañan y Macias, 1989). Por el contrario al implantar esferas con BMP-4 se aumenta la muerte interdigital solo en las células indiferenciadas, las que ya presentan una diferenciación hacia cartilago no son afectadas. De manera adicional los implantes con BMP-4 inducen la expresión de los genes *Msx-1* y *Msx-2* (Gañán *et al.*, 1996).

Finalmente al implantar esferas que contienen FGF-2 se observó que se inhibió el efecto en la inducción de condrogénesis por el TGF β , y se inhibió el aumento en la muerte inducido por el BMP-4 (Gañán *et al.*, 1996).

Los BMPs parecen promover la expresión *Msx-1* y *Msx-2* y a su vez la muerte celular, posiblemente de manera similar a como es promovida la muerte en el desarrollo del rombencéfalo. Por su parte, los FGFs funcionan como una señal que promueven también la expresión de *Msx-1* y *Msx-2*, pero en este caso esta expresión, participa en promover la proliferación celular en el mesénquima. Entonces solo cuando se encuentra presente los FGFs se evitaría la muerte celular, por lo que estarían funcionando como factores de sobrevivencia. Es posible que el ectodermo distal en los dígitos mantenga el CEA, y promueva la proliferación y la elongación en el eje próximo-

distal de los dígitos; como la CEA desaparece primero en los interdígitos la ausencia de los FGFs, sería en parte la responsable de iniciar el proceso apoptótico masivo en los interdígitos. Factores adicionales, como el estrés oxidativo y la síntesis de AR, promoverían la muerte celular, sin embargo falta estudiar a fondo como interactúan estos factores entre sí para dar como resultado la muerte celular. Sería importante definir si funcionan como señales independientes, que simplemente refuerzan el proceso de muerte, o bien existe una interacción entre estos factores para que se lleve a cabo el proceso. De manera adicional es importante recordar que hay factores presentes exclusivamente en los dígitos, que promueven la supervivencia de estas células, como podrían ser la actividad de *bcl-2*, el cual se expresa en los dígitos precisamente cuando esta ocurriendo la muerte interdigital (Novak y Korsmeyer, 1994).

ANÁLISIS DE IMÁGENES Y LA GENERACION DE MODELOS EN EL ESTUDIO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS EXTREMIDADES DEL RATON

Análisis de imágenes y bases de datos.

El desarrollo embrionario es un proceso altamente complejo, durante el cual ocurren interacciones dinámicas a nivel molecular y celular. El lograr comprender como se coordinan estas actividades, para dar lugar al organismo adulto, parece una tarea prácticamente imposible de lograr. Sin embargo, en años recientes se han propuesto nuevas alternativas para integrar toda la información que se genera de los procesos del desarrollo que se estudian. Estas alternativas se basan en el uso de herramientas computacionales de análisis de imágenes, por medio de las cuales se pueden generar bases de datos de la estructura histológica, de los patrones de expresión génica (de los patrones de síntesis de proteínas) y de los patrones de diferenciación celular. Así han surgido varios proyectos que intentan definir la distribución de estos procesos tomando como modelos el desarrollo embrionario en diferentes organismos, como el ratón y la mosca de la fruta (Ringwald *et al.*, 1994; Hartenstein *et al.*, 1995). Estas bases de datos permitirán llevar el análisis del desarrollo embrionario a simulaciones del proceso, más cercanas a la forma natural en que ocurre el desarrollo, y no como normalmente se estudia, utilizando estadios discretos y en imágenes bidimensionales. Lo anterior quiere decir que se generarán simulaciones de los procesos en tres dimensiones y de manera dinámica, ya que la estructura cambia constantemente durante el desarrollo y parece no ocurrir de manera cuántica o equivalente a la existencia de estadios discretos.

Por otro lado, es importante señalar que los proyectos del desarrollo embrionario no han considerado aún el incluir

otros procesos, que aún cuando aumentarán el nivel de complejidad del análisis, llevarán a que los modelos del desarrollo propuestos, sean más cercanos a la realidad. Así se han dejado a un lado los patrones de eventos celulares como la migración, la proliferación y la muerte celular, así como la caracterización de las vías metabólicas y estados fisiológicos que se presentan en diferentes tejidos. Los primeros procesos (migración, proliferación y muerte) son relativamente más fáciles de caracterizar, debido a que existen herramientas experimentales convencionales para su análisis. Sin embargo, para definir los estados metabólicos y fisiológicos que ocurren en los diferentes linajes celulares, se requiere hacer un análisis muchos más complejo, que simples patrones de expresión de genes aislados; se requieren caracterizar cadenas metabólicas, y cómo se integran éstas durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, sería importante definir los estados fisiológicos diferentes que potencialmente se pueden encontrar en diferentes tipos celulares, un ejemplo importante es el estado redox intracelular. Estas definiciones y las herramientas experimentales quedan como propuestas a explorar en el futuro.

Modelos del desarrollo de las extremidades en vertebrados.

A continuación se presentará un resumen del desarrollo de las extremidades del ratón, en el cual se incluye la información obtenida a partir de la revisión bibliográfica así como los resultados generados en la presente tesis. A partir de esta información, surgió la idea de realizar un mapa de la distribución de la muerte celular durante el desarrollo embrionario, el cual ayudará a iniciar un proceso de integración de la información que se tiene del desarrollo a diferentes niveles. Se propone además, iniciar este mapa de muerte utilizando como modelo de estudio el desarrollo de las extremidades del ratón. La primera descripción del proyecto formal se presenta en la Publicación 2 que se anexa al final de la tesis. Esta información nos permite sugerir algunos modelos de como se lleva a cabo el desarrollo de las extremidades y como se controlan algunos procesos implicados.

Esta información se integrará no solo para señalar lo que se conoce, sino para proponer estrategias experimentales a seguir en trabajos futuros del proceso del desarrollo embrionario de las extremidades del ratón.

Inicio de la formación de las extremidades.

Como se mencionó en la introducción, las extremidades en el embrión de ratón se forman a partir protuberancias que se proyectan de los costados de la pared lateral del cuerpo, y consisten básicamente de células mesenquimáticas envueltas por una capa de ectodermo (Tickle y Eichele 1994).

Es interesante el hecho de que la protrucción inicial de la extremidad en formación, no se debe a un incremento en la proliferación celular de estas regiones, si no a una disminución selectiva de la proliferación de los tejidos que rodean a las futuras extremidades (Searls y Janners, 1971), este mecanismo posiblemente participa también en el proceso más tardío de la definición de las regiones que dan origen a los dígitos e interdígitos. Nosotros observamos que parte de la separación de los dedos en el eje proximo-distal, se debe a un crecimiento en los dígitos (Fig. 11 y 14), y solo aproximadamente la mitad de la separación se debe a la muerte que ocurre en el interdígito (Fig. 13 y 14). Este mecanismo parece ser similar en el eje dorso-ventral (Fig. 17). Los resultados se resumen en los modelos presentados en la figura 28. Es interesante el hecho de que el crecimiento deja de ocurrir en los interdígitos en el estadio 9 (ver contornos Fig. 14), precisamente cuando comienza la muerte en el margen más distal (se ve claramente en la Fig. 13). En cambio en los dígitos el crecimiento continúa ocurriendo hasta el estadio 12 (Fig. 11 a 14). Mori y colaboradores (1995) reportaron que las células de los interdígitos, dejan de proliferar previo a la aparición de muerte intensa, utilizando la técnica de marcaje con 5-bromodesoxiuridina, y que en los dígitos continúan la proliferación celular, lo que permite su crecimiento en tamaño. Es muy interesante el hecho de que la muerte celular en la separación de los dígitos, solo ocurre en reptiles, aves y mamíferos (Fallon y Cameron, 1977), en anfibios no ocurre, y la formación de dedos individualizados solo se debe a una tasa de crecimiento y proliferación diferencial entre la región de los dígitos contra los interdígitos (Cameron y Fallon, 1977). Los resultados presentados en las figuras 11 a 14 y 17, sugieren que un mecanismo similar opera en la formación de los dedos en el desarrollo de las extremidades en mamíferos, y la muerte celular solo participa en la regresión del interdígitos de forma parcial. Queda entonces abierta la pregunta de por qué surgió la muerte interdigital como un mecanismo que participa en la separación de los dígitos en los amniotas, si potencialmente puede ocurrir por crecimiento diferencial de tejidos.

¿Quién controla los gradientes de muerte disto-proximal y dorso-ventral en el desarrollo de las extremidades?

A pesar de la discusión presentada en el apartado anterior, es un hecho el que la muerte es altamente controlada durante la regresión del interdígito. Como se muestra en la figura 10 y 13, la muerte se inicia en la parte más distal de las extremidades en el estadio 9, y se extiende proximalmente hacia las regiones más profundas de los interdígitos (Fig. 10 y 13). Este gradiente es similar al que se observa de estrés oxidativo, ya que al teñir con los colorantes redox sensibles

encontramos, que se presentaron primero células en estrés, en las regiones más distales y posteriormente en el desarrollo se observaron en regiones más proximales (Fig. 5, artículo 1). Pensamos que posiblemente el gradiente disto-proximal puede ser establecido en parte, por la forma en que se lleva a cabo la biosíntesis del ácido retinoico. Como ya se mencionó parece que la actividad de alcohol deshidrogenasa se encuentra en la región más distal del epitelio, correspondiente a la CEA (Zgombic-Knight *et al.*, 1994), en cambio la enzima aldehído deshidrogenasa en la región correspondiente a los interdigitos (Niederreither *et al.*, 1997) (ver modelo Fig. 26 y 29). Conforme a los patrones de expresión de estas enzimas, se puede proponer que el retinol, llega a la extremidad en desarrollo vía sanguínea. Ya en la extremidad se convertiría a retinal, en la región que expresa a la alcohol deshidrogenasa. El retinal difundiría formando un gradiente disto-proximal de esta molécula, y como en el interdígito se expresa la aldehído deshidrogenasa, el retinal se convertiría a ácido retinoico en esta región, pero con un patrón en gradiente debido a que su precursor, el retinal se encuentra potencialmente en gradiente (Fig. 29). El ácido retinoico induciría la muerte por vías redox dependientes o bien por otras como la inducción de la transglutaminasa. Posiblemente el AR provocaría la disminución de la transcripción de *bcl-2*, lo que haría más sensibles a las células de los interdigitos a los inductores de muerte, o bien la ausencia de *Bcl-2* provocaría que disminuyera el poder reductor en esta región. Sería interesante ver si existe además algún mecanismo de regulación de la transcripción de los genes de enzimas antioxidantes como peroxidasa, catalasa o SODs, y que esta fuera vía AR. La presencia más prolongada de la CEA en los dígitos y posiblemente de la expresión de FGF-8, podrían participar como factores de sobrevivencia que su vez pueden participar en promover el crecimiento de los dedos que se observa en etapas posteriores (ver modelo presentado en la fig. 29).

Es importante el llegar a caracterizar como interactúan estas diferentes señales y como esta información es integrada por las células que se encuentran localizadas en las diferentes regiones de la extremidad, para provocar su proliferación, su diferenciación o su muerte. Consideramos que algunas de las estrategias experimentales mencionadas en la presente tesis, aunado con la propuesta de generar una base de datos de los patrones de muerte celular en el desarrollo embrionario mencionada en la publicación 2, podrán permitir en el futuro, llegar a tener un nivel de comprensión más profundo de los mecanismos que controlan el desarrollo embrionario no solo de las extremidades si no de otros órganos en el embrión del ratón.

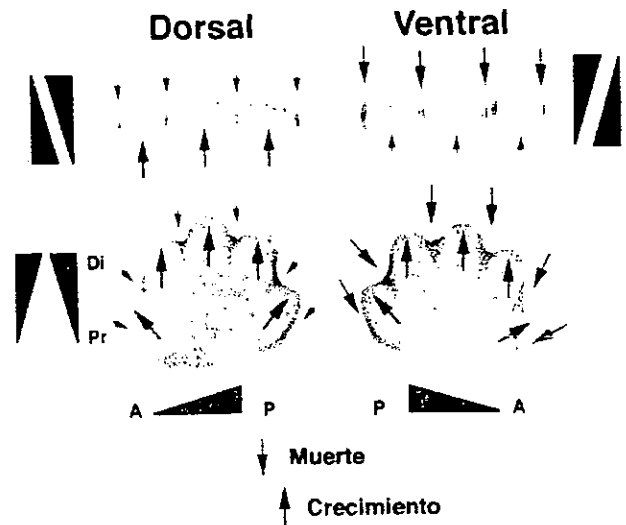


Figura 28.- Modelos donde se representa como contribuyen la muerte y el crecimiento en la separación de los dígitos. Los triángulos representan los gradientes observados de estos procesos (muerte, rojo; crecimiento, verde). La dirección de las flechas representan la dirección del gradiente, y su tamaño representa la intensidad relativa. Dorsal, vista dorsal. Ventral, vista ventral. A, anterior. P, posterior.

7. CONCLUSIONES

1.- En conjunto los datos presentados, apoyan la hipótesis de que las especies de oxígeno reactivas y el ácido retinoico, participan en la maquinaria, que de manera natural, regula el proceso de muerte celular durante el desarrollo embrionario de las extremidades de ratón. De manera adicional parece que estas moléculas participan de una forma más general en controlar este proceso a lo largo del desarrollo embrionario. Queda aún por explorar como se regula su síntesis y los blancos sobre los que actúan estas moléculas durante el proceso de muerte celular.

2.- Se encontró evidencia a favor de que en las extremidades en desarrollo existen las rutas metabólicas necesarias para la biosíntesis de ácido retinoico y además se encontró que los retinoides endógenos participan en el control de la muerte celular interdigital.

3.- El análisis de los modelos bidimensionales y tridimensionales sugieren que durante el desarrollo embrionario de las extremidades en ratón, se presentan patrones complejos de muerte celular. De manera adicional se observó que tanto la apoptosis como el crecimiento diferencial de tejidos participan en el proceso de individualización de los dígitos.

8. REFERENCIAS

- Abrahams, J.M., White, C., Fessler, L.I., and Steller, H.** (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Alberts,**
- Alles, A.J., and Sulik, K.K.** (1989). Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenic mechanism. *Teratology* **40**, 163-171.
- Altabef, M., Clarke, J.D., and Tickle, C.** (1997). Dorsal-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* **124**, 4547-4556.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.** (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7915-7922.
- Austyn, J.M., and Gordon, S.** (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* **11**: 805-8015.
- Barde, Y.A.** (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* **2**, 1525-1534.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., and Schubert, D.** (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid b protein toxicity. *Cell* **77**, 817-827.
- Black, M.J., and Brandt, R.B.** (1974). Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Analyt. Biochem.* **58**, 246-254.
- Bowen, I., and Bowen, S.** (1990). *Programmed Cell Death in Tumours and Tissues.* University Press, Cambridge, UK.
- Burdon, R.H., Gill, V., and Rice-Evans, C.** (1993). Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 369-380.
- Busciglio, J., and Yanker, B.A.** (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* **378**, 776-779.
- Büttke, T.M., and Sandstrom, P.A.** (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**, 7-10.
- Cameron, J.A., and Fallon, J.F.** (1977). The absence of cell death during development of free digits in amphibians. *Dev. Biol.* **55**, 331-338.
- Carrington, J.L. and Fallon, J.F.** (1984). The stages of flank ectoderm capable of responding to ridge induction in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **84**, 19-34.
- Castro-Obregón, S., and Covarrubias, L.** (1996). Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation. *FEBS Lett.* **381**, 93-97.
- Cathcart, R., Schwieters, E., and Ames, B.N.** (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analyt. Biochem.* **134**, 111-116.
- Cerutti, P., Larsson, R., Krupitza, G., Muehlethaler, D., Crawford, D., and Amstad, P.**

7. CONCLUSIONES

1.- En conjunto los datos presentados, apoyan la hipótesis de que las especies de oxígeno reactivas y el ácido retinoico, participan en la maquinaria, que de manera natural, regula el proceso de muerte celular durante el desarrollo embrionario de las extremidades de ratón. De manera adicional parece que estas moléculas participan de una forma más general en controlar este proceso a lo largo del desarrollo embrionario. Queda aún por explorar como se regula su síntesis y los blancos sobre los que actúan estas moléculas durante el proceso de muerte celular.

2.- Se encontró evidencia a favor de que en las extremidades en desarrollo existen las rutas metabólicas necesarias para la biosíntesis de ácido retinoico y además se encontró que los retinoides endógenos participan en el control de la muerte celular interdigital.

3.- El análisis de los modelos bidimensionales y tridimensionales sugieren que durante el desarrollo embrionario de las extremidades en ratón, se presentan patrones complejos de muerte celular. De manera adicional se observó que tanto la apoptosis como el crecimiento diferencial de tejidos participan en el proceso de individualización de los dígitos.

8. REFERENCIAS

- Abrahams, J.M., White, C., Fessler, L.I., and Steller, H.** (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Alberts,**
- Alles, A.J., and Sulik, K.K.** (1989). Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenic mechanism. *Teratology* **40**, 163-171.
- Altabel, M., Clarke, J.D., and Tickle, C.** (1997). Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* **124**, 4547-4556.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.** (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7915-7922.
- Austyn, J.M., and Gordon, S.** (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* **11**: 805-8015.
- Barde, Y.A.** (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* **2**, 1525-1534.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., and Schubert, D.** (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid b protein toxicity. *Cell* **77**, 817-827.
- Black, M.J., and Brandt, R.B.** (1974). Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Analyt. Biochem.* **58**, 246-254.
- Bowen, I., and Bowen, S.** (1990). *Programmed Cell Death in Tumours and Tissues*. University Press, Cambridge, UK.
- Burdon, R.H., Gill, V., and Rice-Evans, C.** (1993). Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 369-380.
- Busciglio, J., and Yanker, B.A.** (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* **378**, 776-779.
- Buttke, T.M., and Sandstrom, P.A.** (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**, 7-10.
- Cameron, J.A., and Fallon, J.F.** (1977). The absence of cell death during development of free digits in amphibians. *Dev. Biol.* **55**, 331-338.
- Carrington, J.L. and Fallon, J.F.** (1984). The stages of flank ectoderm capable of responding to ridge induction in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **84**, 19-34.
- Castro-Obregón, S., and Covarrubias, L.** (1996). Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation. *FEBS Lett.* **381**, 93-97.
- Cathcart, R., Schwiers, E., and Ames, B.N.** (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analyt. Biochem.* **134**, 111-116.
- Cerutti, P., Larsson, R., Krupitza, G., Muehlemaier, D., Crawford, D., and Amstad, P.**

- (1989). Pathophysiological mechanisms of active oxygen. *Mutat. Res.* **214**, 81-88.
- Chen-Levy, Z., Nourse, J., and Cleary, M.L.** (1989). The Bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphomas carrying the t(14:18). *Mol. Cell Biol.* **9**, 701-710.
- Chen, G., Johnson, D.M., Haudenschild, D.R., and Goetinck, P.F.** (1995). Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is marked for cartilage maturation. *Dev. Biol.* **172**, 293-306.
- Clair, D.K., Oberley, T.D., Muse, K.E., and St. Clair, W.H.** (1994). Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 275-282.
- Clarke, P.G.H.** (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* **181**: 195-213.
- Cohn, M.J., Ipsúa-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K. and Tickle, C.** (1995). Fibroblast Growth Factors Induce Additional Limb Development from the Flank of Chick Embryos. *Cell* **80**:739-746.
- Colbert, M.C., Linney, E., and LaMantia, A.-S.** (1993). Local sources of retinoic acid coincide with retinoid-mediated transgene activity during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6572-6576.
- Connor, M.J., and Smit, M.H.** (1987). Terminal-group oxidation of retinol by mouse epidermis: Inhibition *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J.* **244**, 489-492.
- Connor, M.J.** (1988). Oxidation of retinol to retinoic acid as a requirement for biological activity in mouse epidermis. *Cancer Res.* **48**: 7038-7040.
- Cottrill, C.P., Archer, C.W., and Wolpert, L.** (1987). Cell sorting and chondrogenic aggregate formation in micromass culture. *Dev. Biol.* **122**, 503-515.
- Coucouvanis, E., and Martin, G.R.** (1995). Signals for the death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* **83**, 279-287.
- Crossley, P.H. and Martin, G.R.** (1995). The Mouse Fgf8 gene Encodes a Family of Polypeptides and is Expressed in Regions that Direct Outgrowth and Patterning in the Developing Embryo. *Development* **121**: 439-451.
- Culotta, E., and Koshland, D.E.** (1993). p53 sweeps through cancer research. *Science* **262**, 1958-1959
- Davidson, D.** (1995). The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet.* **11**, 405-411.
- Diliberto, J.J., Usha, G., and Birnbaum, L.S.** (1988) Disposition of citral in male fischer rats. *Drug Metabolism and Disposition* **16**: 721-727.
- Dollé, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C.M., Gudas, L.J., and Chambon, P.** (1989). Differential expression of genes encoding α , β and γ retinoic acid receptors and CRABP in the mouse developing limbs in the mouse. *Nature* **342**, 702-705.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A.** (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* **356**, 215-221.
- Duester, G., Shean, M.L., McBride, M.S., and Stewart, M.J.** (1991). Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: Implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell Biol.* **11**, 1638-1646.
- Dzierzak, E., and Medvinsky, A.** (1995). Mouse embryonic hematopoiesis. *TIG* **11**: 359-366.
- Edgington, S.M.** (1994). As we live and breathe: Free radicals and aging. *Bio/Technology* **12**, 37-40.
- Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Park, S.M., Holleran, A.L., Murphy, A.N., Fiskum, G., Kane, D.J., Testa, M.P., Kayalar, C., and Bredesen, D.E.** (1996). Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J. Neurochem.* **67**, 1259-1267.
- Ellis, R.E., and Horvitz, H.R.** (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 663-698.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R.** (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 663-698.
- Emmendorffer, A., Hecht, M., Lohmann-Matthes, M.-L., and Roesler, J.** (1990). A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Methods* **131**, 269-275.
- Enokido, Y., and Hatanaka, H.** (1993). Apoptotic Cell Death Occurs in Hippocampal Neurons Cultured in a High Oxygen Atmosphere. *Neuroscience* **57**, 965-972.
- Fairbairn, L.J., Cowling, G.J., Reipert, B.M. and Dexter, T.M.** (1993). Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* **74**, 823-832.
- Fallon, J.F., and Cameron, J.A.** (1977). Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **40**, 285-289.
- Fallon, J.F., Lopez, A., Ros, M.A., Savage, M.P., Olwin, B.B. and Simandl, B.K.** (1994). FGF-2: Apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-107.
- Fernandez-Teran, M.A., and Hurle, J.M.** (1984). Syndactyly induced by Janus green B in the embryonic chick leg bud: a reexamination. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **84**, 159-175.
- Fisher, A.B.** (1987). Intracellular Production of Oxygen-Derived Free Radicals. In *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (ed. I. Halliwell). 34-39.
- Fisher, D.E.** (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* **78**: 539-542.

- Francis, P.A., Richardson, M.K., Brickell, P.M., and Tickle, C.** (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209-218.
- Freshney, R.I.** (1994). Culture of animal cells. Third edition. Wiley-Liss, N.Y.
- Fridovich, I.** (1987). *The Biology of Oxygen Radicals: General Concepts*. In: Oxygen Radicals and Tissue Injury. Proceedings of an Upjohn Symposium. 1-5.
- Gañan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A., and Hurlle, J.M.** (1996). Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349-2357.
- Gaglioti, S., Colepiccolo, P., and Bevilacqua, E.** (1995). Post-implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**: 1111-1116.
- Gajate, C., Alonso, M.T., Schimmang, T., Mollinedo, F.** (1996). C-Fos is not essential for apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 267-272.
- Garrett, I.R., Boyce, B.F., Oreffo, R.O., Bonewald, L., Poser, J., and Mundy G.R.** (1990). Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *J.Clin. Invest.* **85**, 632-639.
- Gavrieli, Y; Sherman, Y. and Ben-Sasson, A.** (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**: 493-501.
- Gilbert, S.F.** (1994). *Developmental Biology*. Fourth edition. Sinauer. Sunderland, Mass., USA.
- Glucksmann, A.** (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59-86.
- Golstein, P.** (1989). Morts cellulaires et système immunitaire. *Médecine/ sciences* **5**, 546-553.
- Goossens, V., Grooten, J., de Vos, K., and Fiers, W.** (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **92**, 8115-8119.
- Graham, A., Heyman, I., and Lumsden, A.** (1993). Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development* **119**, 233-245.
- Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., and Lumsden, A.** (1994). The signaling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* **372**, 684-686.
- Gramzinski, R.A., Parchment, R.E., and Pierce, G.B.** (1990). Evidence Linking Programmed Cell Death in the Blastocyst to Polyamine Oxidation. *Differentiation* **43** : 59-65.
- Greenlund, L.J.S., Deckwerth, T.L., and Johnson Jr., E.M.** (1995). Superoxide Dismutase Delays Neuronal Apoptosis: A Role for Reactive Oxygen Species in Programmed Neuronal Death. *Neuron* **14**, 303-315.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C.** (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. 2nd edition. Oxford University Press, Avon, U.K.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L.** (1951). *J. Morphol.* **88**, 49.
- Hammar, S.P., and Mottet, N.K.** (1971) Tetrazolium salt electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J. Cell Sci.* **8**, 229-251.
- de Haan, J.B., Tymms, M.J., Cristiano, F., and Kola, I.** (1994). Expression of Copper/Zinc superoxide dismutase and glutathione peroxidase in organs of developing mouse embryos, fetuses, and neonates. *Ped.Res.* **35**, 188-196.
- Harris, C.C.** (1993). p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* **262**, 1980-1981.
- Hartenstein, V., Lee, A., and Toga, A.** (1995). A graphic digital database of *Drosophila* embryogenesis. *Trends Genet.* **11**, 51-58.
- Haugland, R.P.** (ed.) (1996). *Handbook of fluorescence probes and research chemicals*. Sixth ed. Molecular Probes. Eugene, Or. USA.
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., and Thomson, J.N.** (1983). Mutations affecting programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **220**, 1277-1279.
- Heinecke, J.W., and Shapiro, B.M.** (1989). Respiratory burst oxidase of fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1259-1263.
- Henderson, L.M., and Chappell, J.B.** (1993). Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* **217**, 973-980.
- Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R.** (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676.
- Hockenbery, D.M., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J.** (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J.** (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251.
- Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S., and Martin, P.** (1994). Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell Sci.* **107**: 1159-1167.
- Horstadius, S.** (1952). Induction and inhibition of reduction gradients by the micromeres in the sea urching embryo. *J.Exp. Zool.* **120**, 421-436.
- Howard, M.K., Burke, L.C., Mailhos, C., Pizzey, A., Gilbert, C.S., Lawson, W.D., Collins, M.K.L., Thomas, N.S.B., and Latchman, D.S.** (1993). Cell cycle arrest of proliferating neuronal cells by serum deprivation can result in either apoptosis

- or differentiation. *J. Neurochem.* **60**, 1783-1791.
- Hurle, J.M., and Gañan, Y.** (1986). Interdigital tissue chondrogenesis induced by surgical removal of the ectoderm in the embryonic chick leg bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **94**, 231-244.
- Hurle, J.M., Gañan, Y., and Macias, D.** (1989). Experimental analysis of the *in vivo* chondrogenic potential of the interdigital mesenchyme of the chick leg bud subjected to local ectodermal removal. *Dev. Biol.* **132**, 368-374.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A.W., and Raff, M.C.** (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1443-1458.
- Ilies, A.** (1967). La topographie et la dynamique des zones necrotiques normales chez l'embryon humain. *Rev. Roum. D'Embryol. Cyt. Serie D.* **4**: 51-84.
- Ilies, A.** (1969). La topographie et la dynamique des zones necrotiques normales chez l'embryon humain de 11-30 mm. II. Systeme nerveux central et peripherique. Etude histologique et histochimie. *Rev. Roum. D'Embryol. Cyt. Serie D.* **6**: 31-44.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., and Dangl, J.L.** (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853-1856.
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C.** (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354
- Jayaraman, L., Murthy, K.G.K., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., and Prives, C.** (1997). Identification of a redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes. Dev.* **11**, 558-570.
- Johnson, T.M., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., and Finkel, T.** (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11848-11852.
- Karnovsky, M.J.** (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **27**, 137A.
- Kastner, P. Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupé, V., Grondona, J.M., and Chambon, P.** (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* **124**, 313-326.
- Kerr, J.F.R., and Harmon, B.V.** (1991). *Definition and Incidence of Apoptosis: An Historical Perspective.* In *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death* (ed. L.D. Tomei and F.O. Cope). CSHL press.
- Keston, A.S., and Brandt, R.** (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analyt. Biochem.* **11**, 1-5.
- Khan, A.U., and Wilson, T.** (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem. Biol.* **2**, 437-445.
- Kluk, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D.** (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Korsmeyer, S.J.** (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* **80**, 879-886.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C-Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A.** (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**, 368-372.
- Lander, H.M., Ogiste, J.S., Teng, K.K., and Novogrodsky, A.** (1995). p21^{ras} as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J. Biol. Chem.* **270**: 21195-21198.
- Lang, R.A., Metcalf, D., Cuthbertson, R.A., Lyons, I., Stanley, E., Kelso, A., Kannonakis, G., Williamson, D.J., Klintworth, G.K., Gonda, T.J., and Dunn, A.R.** (1987). Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of activated macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell* **51**, 675-686.
- Lang, R.A., and Bishop, J.M.** (1993). Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* **74**, 453-462.
- Lang, R., Lustig, M., Francois, F., Sellinger, M., and Plesken, H.** (1994). Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodeling. *Development* **120**, 3395-3403.
- Laufer, E., Pizette, S., Zou, H., Orozco, O.E. and Niswander, L.** (1997a). BMP expression in duck interdigital webbing: A reanalysis. *Science* **278**, 305.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O.E., Yeo, C.-Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U.K., Fallon, J.F., and Tabin, C.** (1997b). Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* **386**, 366-373
- Lee, K.K., Li, F.C., Yung, W.T., Kung, J.L. Ng, J.L., and Cheah, K.S.** (1994). Influence of digits, ectoderm and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital in culture. *Dev. Dyn.* **201**, 297-309.
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P.** (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *TIBS* **17**: 427-433.
- Leonard, C.M., Bergman, M., Frenz, D.A., Maccreery, L.A., and Newman, S.A.** (1989). Abnormal ambient glucose levels inhibit proteoglycan core protein gene expression and reduce proteoglycan accumulation during chondrogenesis: Possible mechanism for teratogenic effects of maternal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 10113-10117.
- Lev, R., and Spicer, S.S.** (1964). Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 309.
- Levi-Montalcini, R.** (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent

- formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* **86**, 147-157.
- Mahmood, R., Bresnik, J., Hornbruch, A., Mahony, C., Morton, N., Colquhoun, K., Martin, P., Lumsden, A., Dickson, C. and Mason, I.** (1995a). A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr. Biol.* **5**: 797-806.
- Martin, P.** (1990). Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int. J. Dev. Biol.* **34**, 323-336.
- Martin, S.J. and Green, D.R.** (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* **82**: 349-352.
- Marx, G.** (1976). *Memorias de un amante sarnoso*. Biblioteca Jucar. Madrid. 192pp.
- Mateos, M.** (1998). Las cenizas del chamán habitan el desierto mexicano. *La Jornada* 4954, 27.
- McCaffery, P., and Drager, U.C.** (1994). Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7194-7197.
- McConkey, D.J., and Orrenius, S.** (1994). Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell. Biol.* **4**, 370-375.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nuñez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J.** (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**, 79-88.
- McLaren, A., and Buher, M.** (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Diff. Dev.* **31**, 185-195.
- Meister, A.** (1983) Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans.* **11**, 793-794.
- Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piredda, L., Candi, E., Gentile, V., Davies, P.J.A., and Piacentini, M.** (1994). Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfections studies with human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6584-6596.
- Mendelsohn, C., Ruberte, E., and Chambon, P.** (1992). Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev. Biol.* **152**, 50-61.
- Mendelsohn, C., Mark, M., Dollé, P., Dierich, A., Gaub, M.P., Krust, A., Lampron, C., and Chambon, P.** (1994). Retinoic acid receptor β 2 (RAR β 2) null mutant appear normal. *Dev. Biol.* **166**, 246-258.
- Menkes, B., Litvac, B., and Ilies, A.** (1964). Spontaneous and induced cell degenerescence in relation to teratogenesis. *Rev.Roum. D'Embryol. Cyt. Serie D.* **1**: 47-60.
- Menkes, B., Deleanu, M., and Ilies, A.** (1965). Comparative study of some areas of physiological necrosis at the embryo of man, some laboratory-mammals and fowl. *Rev.Roum. D'Embryol. Cyt. Serie D.* **2**: 161-171.
- Mignotte, B., and Vayssiere, J.-L.** (1998). Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **252**, 1-15.
- Milatre, J., and Rooze, M.** (1983). Hereditary and induced modifications of the normal necrotic patterns in the developing limb buds of the rat and mouse: Facts and hypotheses. *Arch. Biol.* **94**, 459-490.
- Milligan, C.E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L.C., Tomaselli, K.J., Oppenheim, R.W., and Schwartz, L.M.** (1995). Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons *in vivo* and *in vitro*. *Neuron* **15**, 385-393.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A.S., Dyer, M.J.S., Mason, D.Y., and Greaves, M.F.** (1992). Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J.Histochem.Cytochem.* **40**, 1819-1825.
- Monteiro, H.P., and Stern, A.** (1996). Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Rad. Biol. Med.* **21**: 323-333.
- Morel, F., Doussiere, J., and Vignais, P.V.** (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **201**, 523-546.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., and Shiota, K.** (1995) Programmed cell death in the interdigital tissue. *Anat. Rec.* **242**, 103-110.
- Motoyama, N., et al.** (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* **267**, 1506-1510.
- Nagy, L., Thomazy, V.A., Heyman, R.A., Davies, P.J.A.** (1998). Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues. *Cell Death Diff.* **5**, 11-19.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., and Loh, D.Y.** (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3700-3704.
- Nataraj, A., Pathak, S., Hopwood, V., McDonnell, T., and Ananthaswamy, H.** (1994). bcl-2 oncogene blocks differentiation and extends viability but does not immortalize normal human keratinocytes. *Int. J. Oncology* **4**, 1211-1218.
- Nicoletti, L., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C.** (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271-279.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Draggr, U.C., Chambon, P., Dollé, P.** (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* **62**, 67-78.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., and Martin, G.R.** (1993). FGF-4 replaces the

- apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-589.
- Nobel, C.S., Kimland, M., Nicholson, D.W., Orrenius, S., and Slater, A.F.** (1997). Disulfiram is a potent inhibitor of proteases of the caspase family. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1319-1324.
- Novak, D.V., and Korsmeyer, S.J.** (1994). Bcl-2 protein expression during murine development. *Am.J.Pathol.* **145**, 61-73.
- Ohuchi, H. et al.** (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* **124**, 2235-2244.
- Okazawa, H., Shimizu, J., Kamei, M., Imafuku, I., Hamada, H., Kanazawa, I.** (1996). Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. *J. Cell Biol.* **132**, 955-968.
- Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J.** (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**: 189-192.
- Oppenheim, R.W.** (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 453-501.
- Pautou, M.-P.** (1976). La morphogenèse du pied de l'embryon de poulet étudiée à l'aide de malformations provoquées par le vert Janus. *J.Embryol. Exp. Morphol.* **35**, 649-665.
- Pearson, G.D., and Merrill, G.F.** (1998). Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J.Biol.Chem.* **273**, 5431-5434.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-305.
- Quillet-Mary, A., Jaffrézou, J.-P., Mansant, V., Bordier, C., Naval, J., and Laurent, G.** (1997). Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 21388-21395.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D.** (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* **262**:695-700.
- Rainwater, R., Parks, D., Anderson, M.E., Tegtmeyer, P., and Mann, K.** (1995). Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3892-3903.
- Ratan, R. R., Murphy, T.H., and Baraban, J.M.** (1994). Macromolecular Synthesis Inhibitors Prevent Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Embryonic Cortical Neurons by Shunting Cysteine from Protein Synthesis to Glutathione. *J. Neuroscience.* **14**: 4385-4392.
- Reddi et al.**, (1998). *Nature Biotech.* **16**, 247-252.
- Reginelli, A.D., Wang, Y.-Q., Sassoon, D., and Muneoka, K.** (1995). Digit tip regeneration correlates with regions of *Msx-1 (Hox7)* expression in fetal and newborn mice. *Development* **121**, 1065-1076.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., and Symons, M.C.R.** (1991) "Techniques in Free Radical Research". Elsevier Science Publishers BV Amsterdam.
- Ringwald, M., Baldock, R., Bard, J., Kaufman, M., Eppig, J.T., Richardson, J.E., Nadeau, J.H., Davidson, D.** (1994). A database for mouse development. *Science* **265**, 2033-2034.
- Robert, B., Lyons, G., Simandl, B.K., Kuroiwa, A., and Buckingham, M.** (1991). The apical ectodermal ridge regulates Hox-7 and Hox-8 gene expression in developing chick limb buds. *Genes Dev.* **5**, 2363-2374.
- Rognstad, R., and Grunnet, N.** (1979). Enzymatic pathways of ethanol metabolism. In: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*. Vol. 1. (Majchrowicz, E., and Noble, E.P., ed.). Plenum Press, New York. pp 65-85.
- Ross, C.A.** (1993). Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid binding proteins. *FASEB J.* **7**:317-327.
- Rotello, R.J., Fernandez, P.A. and Yuan, J.** (1994). Anti-apoptosis and anti-engulfment: monoclonal antibodies reveal specific antigens on apoptotic and engulfment cells during chicken embryonic development. *Development* **120**,1421-1431.
- Rothe, G., Emmendorffer, A., Oser, A., Roesler, J., and Valet, G.** (1991). Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J.Immunol.Methods* **138**, 133-135.
- Rowe, D.A., Cairns, J.M., and Fallon, J.F.** (1982). Spatial and Temporal Patterns of Cell Death in Limb Bud Mesoderm After Apical Ectoderm Ridge Removal. *Dev. Biol.* **93**: 83-91.
- Royal, J.A., and Harry, I.** (1993). Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H2O2 in cultured endothelial cells. *Arch.Biochem.Biophys.* **302**, 348-355.
- Royall, J.A., and Ischiropoulos, H.** (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H2O2 in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **302**, 348-355
- Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D., and Covarrubias, L.** (1998). Reactive oxygen Species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell Res.* **238**, 136-147.
- Sandstrom, P.A., Mannie, M.D., and Buttke, T.M.** (1994). Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J.Leuk.Biol.* **55**, 221-226.
- Saunders, J.W.** (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604-612.
- Saunders, J.W. and Reuss, C.** (1974). Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo. *Dev. Biol.* **38**, 41-50.
- Schuh, T.J., Hall, B.L., Kraft, J.C., Privalsky,**

- M.L., and Kimelman, D.** (1993). v-erbA and citral reduce the teratogenic effects of all-trans retinoic acid and retinol, respectively, in *Xenopus* embryogenesis. *Development* **119**: 785-798.
- Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Vandevoorde, V., Haegeman, G. and Fiers, W.** (1993). Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.* **12**, 3095-3104.
- Scott, W.J., Collins, M.D., Ernst, A.N., Supp, D.M. and Potter, S.S.** (1994). Enhanced expression of limb malformations and axial skeleton alterations in *legless* mutants by transplacental exposure to retinoic acid. *Dev. Biol.* **164**: 277-289.
- Searls, R.L. and Janners, M.Y.** (1971) The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev. Biol.* **24**, 198-213.
- Searls, R.L. and Swilling, E.** (1964). Regeneration of the apical ectodermal ridge of the chick limb bud. *Dev. Biol.* **9**, 38-55.
- Shibanuma, M., Kuroki, T., and Nose, K.** (1990). Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. *Oncogene* **5**, 1025-1032.
- Singh, A.K., Dhaunsi, G.S., Gupta, M.P., Orak, J.K., Asayama, K., and Singh, I.** (1994). Demonstration of glutation peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch.Biochem.Biophys.* **315**, 331-338.
- Slack, J.M.W.** (1995). Inducing factors in *Xenopus* early embryos. *Curr. Biol.* **4**: 116-126.
- Smeyne, R.J., Vendrel, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T., and Morgan, J.I.** (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* **363**, 166-169.
- Solursh, M.** 1984. Ectoderm as a Determinant of early Tissue Pattern in the Limb Bud. *Cell Differ.* **15**:17-24.
- Song, K., Wang, Y and Sassoon, D.** (1992). Expression of Hox-7.1 in myoblast inhibits terminal differentiation and induces cell transformation. *Nature* **360**, 477-481.
- Steinman, H.M.** (1995). The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J.Biol.Chem.* **270**, 3487-3490.
- Steller, H.** (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449.
- Stratford, T., Horton, C., and Maden, M.** (1996). Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Current Biology* **6**, 1124-1133.
- Suda, N., Morita, I., Kuroda, T., and Murota, S.-i.** (1993). Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1157**, 318-323.
- Sulik, K.K., Cook, C.S., and Webster, W.S.** (1988). Teratogens and craniofacial malformations: Relationships to cell death. *Development* **103** suppl., 213-232.
- Sumoy, L., Wang, C.-K.L., Lichtler, A.C., Pierro, L.J., Kosher, R.A., and Upholt, W.B.** (1995). Identification of a spatially specific enhancer element in the chicken *Msx-2* gene that regulates its expression in the apical ectodermal ridge of the developing limb buds of transgenic mice. *Dev. Biol.* **170**, 230-242.
- Sun, Y., and Oberley, L.W.** (1996). Redox regulation of transcriptional activators. *Free Rad. Biol. Med.* **21**: 335-348.
- Sundaresan, M., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T.** (1995). Requirement for the generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296-299.
- Sylvester, A.M., Chen, D., Krasinski, K., and Andres, V.** (1998). Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Clin. Invest.* **101**, 940-948
- Tabin, C.J.** (1991). Retinoids, homeoboxes, and growth factors: Toward molecular models for limb development. *Cell* **66**, 199-217.
- Takahashi K; Yamamura F; and Naito, M.** (1989) Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* **45**: 87-96.
- Taketo, T., and Koide, S.S.** (1981). In vitro development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* **84**, 61-66.
- Tata, J.R.** (1994). Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem. Cell Biol.* **72**, 581-588.
- Thaller, C. and Eichele, G.** (1987). Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* **327**: 625-628.
- Tickle, C. and Eichele, G.** (1994). Vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 121-152.
- Todt, W., and Fallon, J.F.** (1984). Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **80**, 21-41.
- Tomei, L.D., and Cope, F.O.** (1991). Introduction. In: *Apoptosis: The molecular basis of cell death.* (ed. Tomei, L.D., and Cope, F.O.) p.1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Toussaint, O., Houbion, A., and Remacle, J.** (1993). Relationship between the critical level of oxidative stress and the glutathione peroxidase activity. *Toxicology* **81**, 89-101.
- Ullah, A., and Wilson, T.** (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem.Biol.* **2**, 437-445.
- van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M.-G., Kyewski, B., and Ruther, U.** (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant *Fused toes* (Ft). *Development* **120**, 2601-2607.
- Vaux, D.L., Haecker, G., and Strasser, A.** (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* **76**: 777-779.
- Wallin, J., Wilting, J., Kosei, H., Fritsch, R., Christ, B., and Balling, R.** (1994). The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development*

120: 1109-1121.

- Wanck, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R., and Bryant, S.V.** (1989). A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* **249**, 41-49.
- Wang, Y., and Sassoon, D.** (1995). Ectoderm-mesenchyme and mesenchyme-mesenchyme interactions regulate *Msx-1* expression and cellular differentiation in the murine limb bud. *Dev. Biol.* **168**, 374-382.
- Watanabe, A., and Ide, H.** (1993). Basic FGF maintains some characteristics of the progress zone of the chick limb bud in cell culture. *Dev. Biol.* **159**, 223-231.
- Well, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S.R., Davies, T.J., Gardener, R.L., Raff, K.D., and Raff, M.C.** (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* **133**, 1053-1059.
- Weil, M., Jacobson, M.D., and Raff, M.C.** (1997). Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr. Biol.* **7**: 281-284.
- White, K., Grether, M.E., Abrahams, J.M., Young, L., Farrel, K., and Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-683.
- Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J.A., Lee, M.K., Valentine, J.S., and Bredesen, D.E.** (1996). Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**, 515-518.
- Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W., and Goeddel D.V.** (1989). Manganous Superoxide Dismutase is Essential for Cellular Resistance to Cytotoxicity of Tumor Necrosis Factor. *Cell* **58**: 923-931.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.-I, Jones, D.P., and Wang, X.** (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J.-i., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N., and Kuroiwa, A.** (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* **122**, 3725-3734.
- Zakeri, Z., Quaglino, D., Latham, T., and Lockshin, R.A.** (1993). Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J.* **7**, 470-478.
- Zakeri, Z., Quaglino, D., and Ahuja, H.S.** (1994). Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant. *Dev. Biol.* **165**, 294-297.
- Zetterqvist, H** (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph.D. Thesis Karolinska Institutet. Stockholm, Sweden.
- Zgombic-Knight, M., Satre, M.A., and Duester, G.** (1994). Differential Activity of the Promoter for the Human Alcohol Dehydrogenase (Retinol Dehydrogenase) Gene *ADH3* in Neural Tube of Transgenic Mouse Embryos. *J. Biol. Chem.* **269**: 6790-6795.
- Zhang, L.-X., Mills, K.J., Dawson, M.I., Collins, S.J., and Jetten, A.M.** (1995). Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR α -dependent signaling in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J. Biol. Chem.* **270**, 6022-6029.
- Zou, H and Niswander, L.** (1996) Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.
- Zwilling, E.** (1964). Development of fragmented and of dissociated limb bud mesoderm. *Dev. Biol.* **9**, 20-37.
- Zwilling E.** (1972). Limb morphogenesis. *Dev. Biol.* **28**, 12-17.

Reactive Oxygen Species Participate in the Control of Mouse Embryonic Cell Death

Enrique Salas-Vidal, Hilda Lomelí, Susana Castro-Obregón, Rodrigo Cuervo, Diana Escalante-Alcalde, and Luis Covarrubias¹

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Programmed cell death or apoptosis is an essential process during the morphogenesis of a large number of structures. Evidence obtained over the past few years indicates that, in some cases, the generation of reactive oxygen species (ROS) is an important event during the course of apoptosis. Using an *in vitro* culture system in which digit individualization of developing limbs normally occurs, we assayed the effect of different antioxidants on the cell death that takes place at interdigits. The addition of phenol, dimethyl sulfoxide, or 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDHF-DA) to murine developing limbs in culture prevented digit individualization as well as the typical interdigital cell death. Two ROS-sensitive dyes, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide and DCDHF-DA, stained interdigits and the so-called "necrotic zones," implying that they contain cells under oxidative stress. Very few interdigital cells were doubly stained with the ROS probes and two cell death indicators (i.e., acridine orange and propidium iodide), suggesting that they detect a different stage during the course of apoptosis. Furthermore, we found cells stained for ROS that did not express a specific macrophage marker and in a few cases were seen surrounded by a macrophage. Surprisingly, many regions of the midgestation mouse embryo that are undergoing cell death correlated with those that have a markedly higher level of ROS. Our data suggest that the generation of oxidative stress is a common requirement for cell death that occurs during mouse embryonic development. © 1998 Academic Press

INTRODUCTION

Cell death is a ubiquitous biological phenomenon that naturally occurs during development, T and B cell negative selection, and normal cell turnover in the adult organism [45]. This naturally occurring cell elimi-

nation depends on a latent program for which a variety of signals have evolved to counteract the "death fate" [39]. The extracellular milieu (i.e., diffusible factors, cell-cell contact, or extracellular matrix) has a decisive role, contributing with survival factors or determining the internal cell state which establishes the degree of sensitivity to a given death stimulus.

One of the mechanisms thought to trigger programmed cell death is the accumulation of reactive oxygen species (ROS) [30]. The increase in ROS levels has been correlated with cell death which is caused by growth factor deprivation [13] or by killing signals such as the tumor necrosis factor [12]. Accordingly, the addition of antioxidants [30] or the overexpression of superoxide dismutase [13] have proved to protect from cell death in different systems. In fact, cell death can be induced by treating cells with low concentrations of hydrogen peroxide [28], and role of ROS, in particular superoxide, have been established in several animal diseases [4, 33, 51, 52]. It is important to note that, since cell death can occur in the absence of ROS [21, 47], it is unlikely that generation of oxidative stress is an essential event of the execution phase of the death mechanism; rather, ROS may act in the activation phase, transducing signals from the extracellular environment [20].

Programmed cell death plays an essential role during the morphogenesis of a large number of embryonic structures [11, 43]. A classic example are the so-called "necrotic zones" described in developing limbs. Among these areas of cell death, those that define the interdigits are the most obvious. Candidate factors playing a role in interdigital cell death have been inferred from their expression pattern. For instance, the retinoic acid receptor- β [31], the homeobox-containing genes *msx1* (*Hox-7*) and *msx2* (*Hox-8*) [7, 8], and several members of the bone morphogenetic protein (BMP) gene family [9] are all expressed in the interdigital regions at the time cell death is taking place. Recently, it was shown that a dominant negative mutant of the type I BMP receptor is able to greatly reduce interdigital cell death and web regression [57]. However, for most of the mole-

¹To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (52-73) 17-2388. E-mail: covs@ibt.unam.mx.

cules mentioned above there is no direct indication about their participation in the regulation of the cell death process.

In order to gain further insight into the possible mechanisms that trigger cell death during mouse development, we examined *in vitro* the effect of different antioxidants on mouse limb morphogenesis. We found that normal digit individualization can take place in our *in vitro* organ culture system, but can be blocked by treatment with antioxidants. The lack of digit individualization correlated with a decrease in the number of dying cells, although two of the antioxidants tested (phenol and DMSO) also seemed to slow down the phagocytic stage of programmed cell death. In agreement with the participation of oxidative stress in the control of cell death, levels of ROS were higher in the interdigital tissue, and other limb regions undergoing cell death, than in the digits. Many of those cells were not macrophages, as they did not express a specific marker of this cell type, and in some cases were observed surrounded by a macrophage. More importantly, we observed that high ROS levels coincided with many embryo regions undergoing cell death. Therefore, the present study provides the first evidence suggesting that cell elimination during embryo morphogenesis could frequently be mediated by ROS.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Mouse strain CD-1 was used in this study. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation at 12.5, 13.5, or 14.5 days postcoitus (dpc; day 0.5 of conception was the day at which vaginal plug was found). The embryos were removed, and the dissected forelimbs (in L15 medium; Microlab, México) were classified according to the limb bud staging system of Wanek *et al.* [50].

Limb culture. The protocol used to culture embryonic limbs was based on the one used by Taketo and Koide [49] to culture embryonic gonads. Briefly, the staged mouse embryo limbs were cultured on 0.45- μ m-pore Durapore membrane filters (Millipore) floating on McCoy's 5a modified medium (Microlab) without serum and supplemented with 200 U/ml penicillin G sodium, 200 mg/ml streptomycin sulfate, and 2 μ M glutamine (GIBCO, U.S.A.). Water-saturated phenol (Boehringer Mannheim, Germany), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, U.S.A.) or 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDHF-DA; Molecular Probes, U.S.A.) were added to the media just before culture. Cultures were maintained at intervals of 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h in a humidified 5% CO₂-95% atmospheric air incubator at 37°C.

Analysis of cell death. For vital dye stainings, regions of cell death in freshly dissected or *in vitro*-cultured embryonic tissues were visualized by staining with acridine orange (AO; Sigma) as described by Abrahams *et al.* [1]. Briefly, the tissues were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS: 0.02% KH₂PO₄, 0.115 Na₂HPO₄, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, pH 7.4), stained with 5 μ g/ml AO in PBS for 30 min at 37°C, and observed under standard fluorescence microscopy to visualize the regions undergoing cell death. For more detailed studies, the tissues were analyzed by confocal microscopy as described below. Alternatively, tissues were stained with 2.5 mg/ml propidium iodide (PdI) in PBS for 30 min at 37°C [35]. This latter staining was especially useful for the double staining with the fluorogenic redox-sensitive dye (see below).

For detection of DNA fragmentation, the TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) [10] method for detection of fragmented DNA using fluoresceinated dUTP (Boehringer Mannheim) was performed in 4% paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded 10- μ m serial sections of complete forelimbs, according to the manufacturer. The complete series was analyzed and photographed ($\times 100$ magnification). Representative prints are shown.

In situ detection of ROS. For ROS detection, limb buds or complete embryos at different stages of development were incubated with the ROS-sensitive dyes immersed or floated on a Nucleopore polycarbonate filter (Costar, U.S.A.) under tissue culture conditions. We used the tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma] at 50 μ g/ml (in McCoy's 5a modified medium), for the detection of intracellularly generated superoxide [3]; 2 to 8 h of staining was required. The fluorogenic compounds DCDHF-DA and 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate bis(acetoxymethyl)ester (Molecular Probes) at 1 μ g/ml (in PBS) were used for ROS detection, with similar results; 45 min of staining was optimal for the lowest background.

Macrophage-specific immunohistochemistry. For double detection of macrophages and ROS-producing cells, forelimbs were first stained with the redox sensitive dye, MTT, as described above. These samples were embedded in CRYO-M-BED (Bright), cryosectioned, and mounted on poly-L-lysine-treated slides. Macrophage immunohistochemistry using rat IgG anti-mouse F4/80 antigen (Serotec, England) [2, 17] was carried out on slides fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (w/v) for 1 min and blocked for endogenous peroxidase activity with 0.25% hydrogen peroxide in PBS for 30 min and for nonspecific antibody binding with 5% milk in PBS for 1 h. Incubation with the F4/80-specific antibody (1:100 dilution in PBS) was performed for 2 h and bound antibody was reacted with a sheep F(ab')₂ fragment linked to horseradish peroxidase (1:100 dilution; Amersham, U.S.A.) for 1 h. Visualization of bound secondary antibody was carried out with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) and cleared with 50% glycerol in PBS. All incubations were performed at room temperature.

Confocal laser scanning microscopy. Developing limbs were imaged with the Bio-Rad MRC-600 confocal laser scanning system equipped with a krypton/argon laser and coupled to an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) with PlanNeofluar $\times 5$ (aperture 0.15), $\times 10$ (aperture 0.30), and $\times 20$ (aperture 0.5) objectives. AO- or DCDHF-DA-stained tissues were excited with blue light (488 nm), and the red high-sensitivity filter was employed for AO fluorescence detection or the blue high-sensitivity filter for DCDHF-DA fluorescence detection. The pinhole aperture was maintained at 0.3. Serial optical sections were produced at 15 ($\times 5$ and $\times 10$) or 6 μ m ($\times 20$). To analyze whether oxidative stress and cell death occur in the same cell at the same time, double staining with DCDHF-DA and PdI was carried out and analyzed by confocal microscopy using the K1-K2 set of filters and merging the images from the two dyes (DCDHF-DA in green and PdI in red).

Light and electron microscopy. Tissues were fixed in Karnovsky's aldehyde solution [23], postfixed with 1% OsO₄ in Zetterqvist's buffer [55], and embedded in Epon 812. Semithin sections (1 μ m) were stained with toluidine blue. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a Zeiss electron microscope (EM900).

Image analysis. Confocal images were displayed on a Power Macintosh computer using the public domain NIH IMAGE 1.6 program (developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) and saved in TIFF format. Then, these images were displayed on Adobe Photoshop (version 3.02), the contours were delineated (continuous line for the image of limbs cultured for 24 h in control media, and dotted lines for treatments or other lengths of time of tissue culture in control media). Images of interest (with dotted line contour) were superimposed on the image of limbs cultured for 24 h in control media (contin-

uous line contour), and the overlying image opacity was reduced to 50%. The overlying image was then rotated and moved vertically and horizontally until wrist and middle digit were aligned with underlying image.

RESULTS

Antioxidants Prevent Interdigital Cell Death

Mouse embryo fingers and toes are initially connected by soft tissue. In the mouse, the interdigital tissue begins to degenerate at 13 dpc and digit separation is completed by 14 dpc [29, 50]. Cell death in this region proceeds through a mechanism with characteristics of apoptosis [34, 54]. We have cultured dissected forelimbs just when interdigital regression has started (limb stages 9–10 [S9–S10], according to Waneck *et al.* [50] and Mori *et al.* [34]). *In vitro*, interdigital web and skeleton develop as *in vivo* though at a slower rate [E. Salas-Vidal *et al.*, in preparation]. Limbs cultured for 96 h, for instance, exhibit both well-defined individualized digits and all skeletal elements (i.e., stage 12–13; data not shown). As expected, intense AO staining, an indicator of apoptosis [1], was restricted primarily to the interdigital regions, as well as the anterior and posterior margins of hand plate, throughout the *in vitro* limb development (Fig. 1A, Control). It is important to mention that during digit individualization, prospective digits grow and appear to separate from each other at the time web regression is taking place [50; E. Salas-Vidal *et al.*, in preparation]. Under our culture conditions digits separated as *in vivo* but growth was not observed (Fig. 1B, $t = 0$); therefore, *in vitro*, digit individualization is due mainly to web regression.

To investigate if oxidative stress plays a role in the interdigital regression, embryonic forelimbs were cultured with a variety of antioxidants (e.g., 2-mercaptoethanol, *N*-acetylcysteine, dithiothreitol, phenol, DMSO). The most pronounced effects were observed with phenol or DMSO, which clearly prevented web regression and digit individualization and, as detected by AO staining (Fig. 1) and TUNEL (Fig. 2), decreased the number of dying cells in the interdigital regions. The strength of the effect of these two compounds was dose dependent on both interdigital cell death and web regression (Figs. 1 and 2), suggesting that the antioxidants act directly on these processes. Note that even at the lowest dose tested, regression was reduced after 24 h of treatment and was accompanied by less separated prospective digits, in close similarity to the stage reached by limbs cultured for 6 h in control medium (Fig. 1B). At the highest dose shown, phenol- or DMSO-treated limbs revealed a distinct zone of cell death at the tip of digits from 12 h in culture, and a nonspecific increase in cell death was especially observed after 24 h in culture (Fig. 1). These observations could result from activation of the death program as a consequence of a redox

imbalance caused by the antioxidants, especially in rapidly growing regions such as the tip of digits.

We also found that DCDHF-DA, a reagent that is known to react with ROS (see below), was also capable of inhibiting interdigital cell death and web regression with a dose-dependent pattern (Figs. 1 and 2). These data are indicative of a role of ROS in interdigital cell death. In general, lower nonspecific effects on cell death were seen with this reagent compared to phenol or DMSO, although the effect on the tip of digits was still observed at the highest dose tested.

Histological analysis on semithin sections stained with toluidine blue and electron microscopy preparations showed no general damage to tissues by antioxidants at the low and intermediate doses and up to 24 h in culture, for DMSO and phenol, and up to 12 h for DCDHF-DA (Fig. 3). Specifically, apical, dorsal, and ventral epithelia were not apparently affected by antioxidants. However, many apoptotic bodies not contained in phagocytes were apparent after 6 h of treatment with DMSO (Fig. 3C) or phenol (not shown) but their number largely decreased after 24 h (Fig. 3D); as shown in Fig. 2, these apoptotic bodies were not detected with the TUNEL technique, indicating that DNA was completely degraded and, therefore, probably represented "aged" apoptotic bodies. These results suggest that, in addition to reducing the interdigital cell death, phenol and DMSO retarded the phagocytic process responsible for removing the apoptotic bodies present previous to the addition of antioxidants. With DCDHF-DA, dying cells or aged apoptotic bodies were not detected, although the protective effect was not maintained later than 12 h in culture (Fig. 3F); tissue architecture was obviously abnormal after 24 h of culture with this antioxidant (not shown). Therefore, within the first half of treatment, it seems that DCDHF-DA has its major effect on preventing cell death with undetectable effects on phagocytosis. At the highest doses of phenol and DMSO, and especially after 24 h in culture, cells in the interdigital tissue of treated limbs were more scattered, probably due to the deposition of extracellular matrix as suggested by the Alcian blue staining obtained of limbs treated under these conditions (data not shown); epithelium was not lost with these two reagents at any of the concentrations tested.

When antioxidants, including DCDHF-DA, were removed after 6 h (Fig. 4) of treatment, the time at which an obvious decrease in dying cells was observed, interdigital regression was restarted; therefore, an irreversible damage to cell components did not occur. Furthermore, after 12 h of culture, skeletal development was not largely affected by phenol or DMSO, but signs of chondrogenesis were observed at interdigits (data not shown). In limbs cultured with antioxidants for long periods (i.e., 96 h), all skeletal elements were

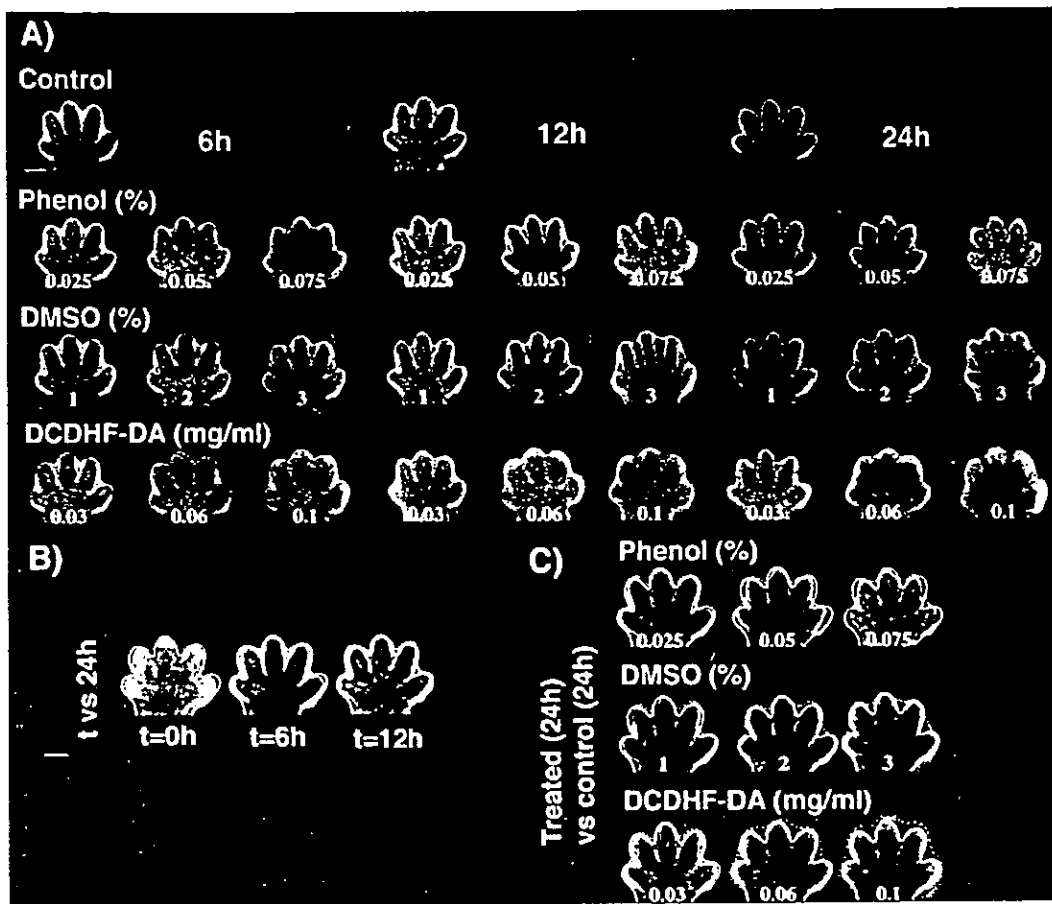


FIG. 1. (A) Effect of antioxidants on interdigital tissue regression and cell death. Forelimbs were cultured for 6, 12, and 24 h *in vitro* in control medium and in the presence of phenol, DMSO, or DCDHF-DA, at the dose indicated. Confocal images, ventral view, of AO-stained tissues are shown. Isolated mouse forelimbs (S9–S10) cultured on control medium showed a normal development, although retarded compared to *in vivo*. Addition of phenol, DMSO, or DCDHF-DA to the medium reduced regression (see also B) and cell death (indicated by AO staining) in interdigital tissue. Bar, 500 μ m. (B and C) Image analysis of interdigital regression of forelimbs cultured *in vitro*. The images of forelimbs just before culture (0 h) and cultured for 6 or 12 h in control medium (B, dotted lines) and those of forelimbs cultured for 24 h in the presence of phenol, DMSO, or DCDHF-DA at the concentration indicated (C, dotted lines) were superimposed on the image of a forelimb cultured for 24 h in control medium (continuous lines) as described under Materials and Methods. Image superimpositions of limbs cultured in control medium (B) show that most interdigital regression takes place from 6 to 24 h of tissue culture. Image superimpositions of limbs treated with antioxidants for 24 h on the image of a limb cultured for 24 h in control medium (C) show that even at the lowest concentrations assayed interdigital regression was reduced and prospective digits appear less separated. Note that digit growth did not occur under our culture conditions (B).

formed except the most distal phalanges (data not shown); this latter effect could be related to the induced cell death observed at the tip of digits described above. Nonetheless, signs of chondrogenesis were observed at interdigits.

Higher ROS Levels Are Found in the Interdigital Zones

Antioxidants could prevent interdigital cell death either by decreasing ROS concentration or by protecting intracellular targets from the action of ROS. In both cases, higher ROS levels in interdigits than in digits should be expected. To determine ROS levels *in situ*,

we used two redox-sensitive dyes: MTT and DCDHF-DA. The first preferentially detects superoxide [41], whereas the second detects several ROS [13, 15]. Freshly dissected limbs stained with either of these reagents revealed interdigits, as well as anterior and posterior margins of hand plate, as regions of the limb with a notably higher ROS level (Fig. 5). Importantly, during *in vivo* limb development, the appearance of cells with high levels of ROS closely followed the pattern observed for AO, although fewer cells were detected (Fig. 5B). These results support the participation of oxidative stress in interdigital cell death. In antioxidant-treated limbs, we did not detect an obvious decrease in interdigital ROS levels (data not shown). This

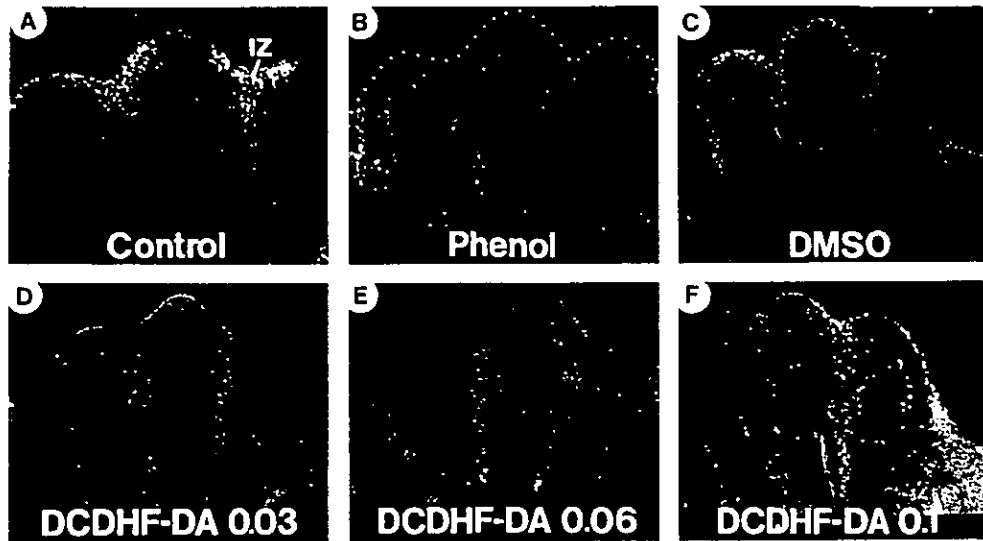


FIG. 2. Cytochemical labeling of fragmented DNA of cultured forelimbs. The TUNEL technique was performed on 10- μ m serial sections from complete forelimbs cultured for 6 h in the presence or absence of antioxidants; representative sections were selected and photographed (original magnification $\times 100$). (A) Sections of limbs cultured in control medium showed intense TUNEL staining at interdigital zones (IZ) and anterior and posterior margins of hand plate (not shown). Sections of limbs treated with 0.075% phenol (B), 3% DMSO (C), and DCDHF-DA at 0.03 mg/ml (D), 0.06 mg/ml (E), and 0.1 mg/ml (F) showed a marked reduction of TUNEL staining.

result was not unexpected since DMSO and phenol are not ROS scavengers and, therefore, they are more likely protecting from the action of ROS.

Programmed cell death proceeds gradually through different stages up to the phagocytosis by neighboring cells. To determine whether cells under oxidative stress are at a different stage of apoptosis than those stained with AO or PdI (another compound which preferentially stains dying cells), we performed a double staining with MTT and AO or with DCDHF-DA and PdI. We found that of the cells stained with MTT *in toto* or in squashed limbs, only 13 to 16% stained also with AO (Table 1). Double staining with DCDHF-DA and PdI was analyzed by confocal microscopy. The merging of images obtained with each dye shows that very few cells were stained with both DCDHF-DA and PdI (Fig. 6A; Table 1). Therefore, ROS probes and AO or PdI detect a different stage during the course of apoptosis.

Since neutrophils, a major class of phagocytes, are known to undergo oxidative burst when activated [33, 41], it is possible that cells with high concentration of ROS, and sensitive to antioxidants, represent the phagocytes responsible for eliminating the apoptotic bodies. To gain insights into the identity of the cells with high ROS levels, we visualized both ROS-positive cells and macrophages in the same slices. Staining for ROS must be performed on a fresh limb, as changes in ROS concentration would be expected due to tissue manipulations. We used MTT to detect ROS because the formazan precipitate is mostly preserved after freezing and slicing. Macrophage-specific immunohis-

tochemistry was performed on those frozen slices from the MTT-stained limbs. Results obtained following this procedure are shown in Fig. 6C. As can be seen, although some cells are doubly stained, many cells are not. In particular, some cells that stained for ROS (i.e., areas of MTT staining) were not stained for macrophages and, in addition, some ROS-stained cells were within a macrophage (Fig. 6C). Although these results did not eliminate the possibility that we are detecting some macrophages undergoing the oxidative burst, at least some cells with a high level of ROS are not macrophages and probably are committed to die, as suggested by the fact that a few of those cells seem to be in the process of being phagocytosed. In this case quantification of MTT-positive cells was not possible, as a reliable estimate was impeded by the inability to define individual MTT-stained cells within the scattered region of staining (asterisks in Fig. 6C), characteristic after freezing and sectioning, and the loss of some formazan precipitate during the immunocytochemistry procedure.

ROS Levels Are Higher in Embryo Regions That Undergo Cell Death

Cell death is essential during the morphogenesis of a large number of embryonic structures. In order to assess how extensive the role of oxidative stress could be in developmental cell death, we probed whole mid-gestation embryos with MTT or DCDHF-DA and compared the resulting staining patterns with those struc-

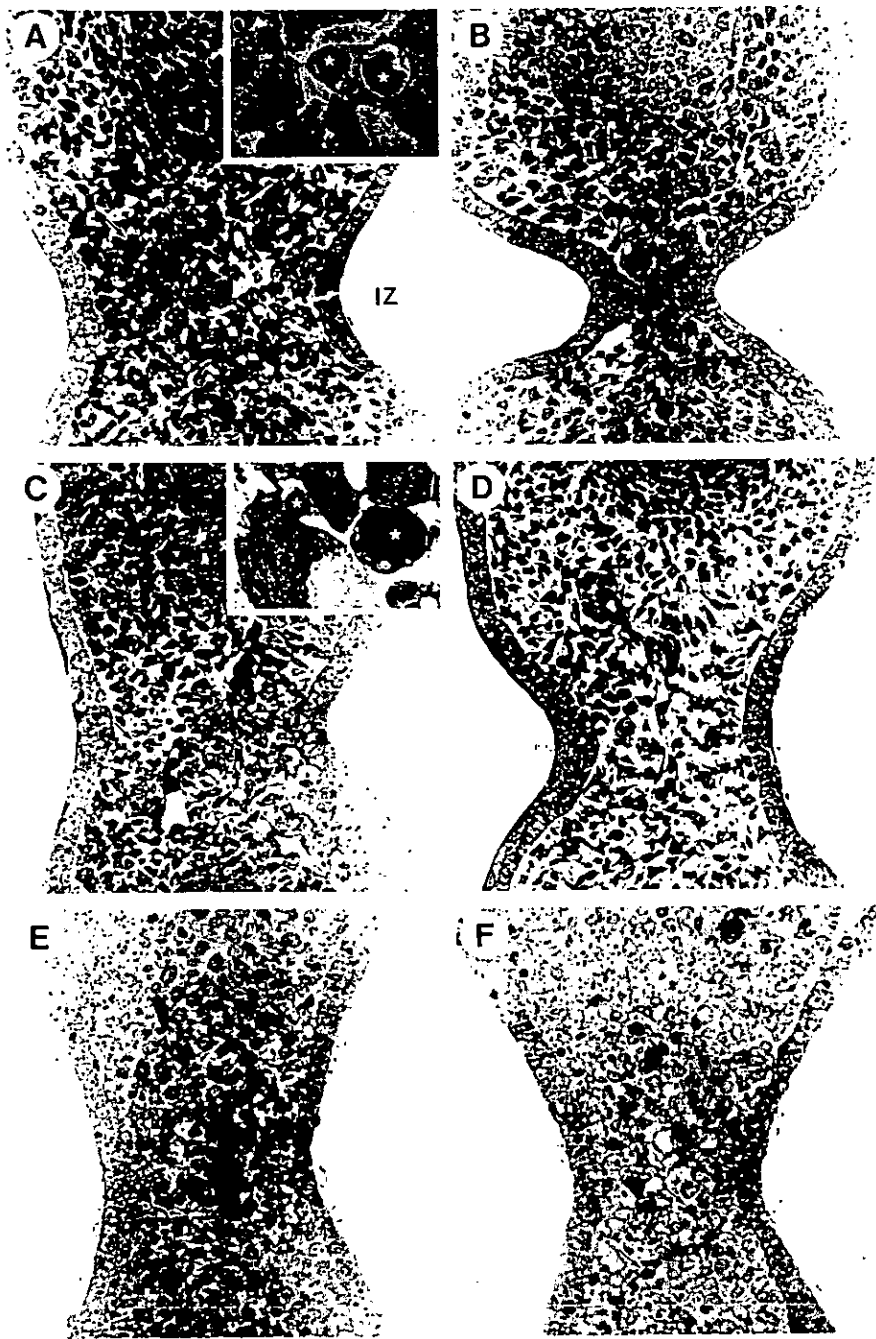


FIG. 3. Histological and cytological analysis of cultured limbs in the absence and presence of antioxidants. Stage 9 forelimbs were cultured in control medium (A and B), 3% DMSO (C and D), or 0.06 mg/ml DCDHF-DA (E and F), for 6 h (A, C, and E), 12 h (F), and 24 h (B and D), and limbs were processed for high-resolution microscopy. Representative semithin and thin cross sections obtained from the distal region of the handplate are shown (400 \times original magnification; insets, 13000 \times). Observe that, after 6 h of culture in control medium (A), apoptotic bodies (round dark spots) were apparently included in phagocytic cells (arrow), whereas when treated with DMSO (C) or phenol (not shown), they appeared in the extracellular space (arrow); location of apoptotic bodies was confirmed by electron microscopy (insets, asterisk). In general, the external apoptotic bodies found in DMSO-treated limbs were in an advanced degree of condensation and, in a few cases, structures resembling the nuclear envelope were observed (C, inset). Later in culture (24 h) with control medium (B), apoptotic bodies were not detected and regression was almost completed; in the presence of DMSO (D) very few apoptotic bodies were detected and regression was limited. In contrast with the observations in sections from DMSO-treated limbs, sections of limbs treated with DCDHF-DA for 6 h (E) show healthy interdigital cells and the absence of apoptotic bodies in the interdigital region. However, after 12 h of culture (F), cells with condensed chromatin (arrows) were found in the interdigital zone that remains unregressed. After this time tissue abnormalities became evident (not shown).

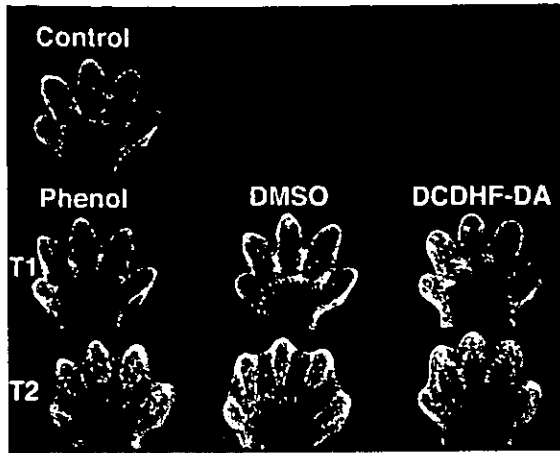


FIG. 4. Reversibility of antioxidant effect. Limbs were cultured in control medium or in the presence of 0.075% phenol, 3% DMSO, or 0.03 mg/ml DCDHF-DA. After 6 h, the time at which cell death was obviously reduced by antioxidants, medium was replaced with either fresh medium (control and T1) or medium with the corresponding antioxidant (T2). Interdigital regression of limbs of the T1 group was very similar to the control, whereas limbs of the T2 group showed limited regression.

tures undergoing cell death (visualized by AO staining). Overlapping AO and DCDHF-DA or MTT staining patterns were found in the fusion line of the developing

TABLE 1
Analysis of Doubly Stained Cells with the ROS Probes and Cell Death Indicators

| Cell death | Number of positive cells | | % ROS-positive cells doubly stained | % death-positive cells doubly stained |
|--------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | ROS | Cell death and ROS | | |
| <i>In toto</i> | | | | |
| ND (AO) | 116 (MTT) | 15 (AO and MTT) | 13% | ND |
| 719 (PdI) | 260 (DCF) | 43 (AO and MTT) | 17% | 6% |
| <i>In squashed</i> | | | | |
| ND (AO) | 220 (MTT) | 35 (AO and MTT) | 16% | ND |

Note. ND, not determined. Shown in parentheses are the dyes used: AO and PdI for cell death and MTT and DCF (DCDHF-DA) for ROS.

palate and sternum, as well as in structures such as the developing eye and ear (Fig. 7). Similar results were obtained in other regions (data not shown), including the junctional zone between neural and surface ectoderm (8.5 dpc), the groove between lateral nasal process and maxillary component of first branchial arch (10.5 dpc), and the developing follicles of vibrissae and the tip of tail (13.5–14.5 dpc). Furthermore, staining of the fusion line of the developing palate with PdI and DCDHF-DA showed, in concordance with the results obtained in interdigital regions, a low percentage of

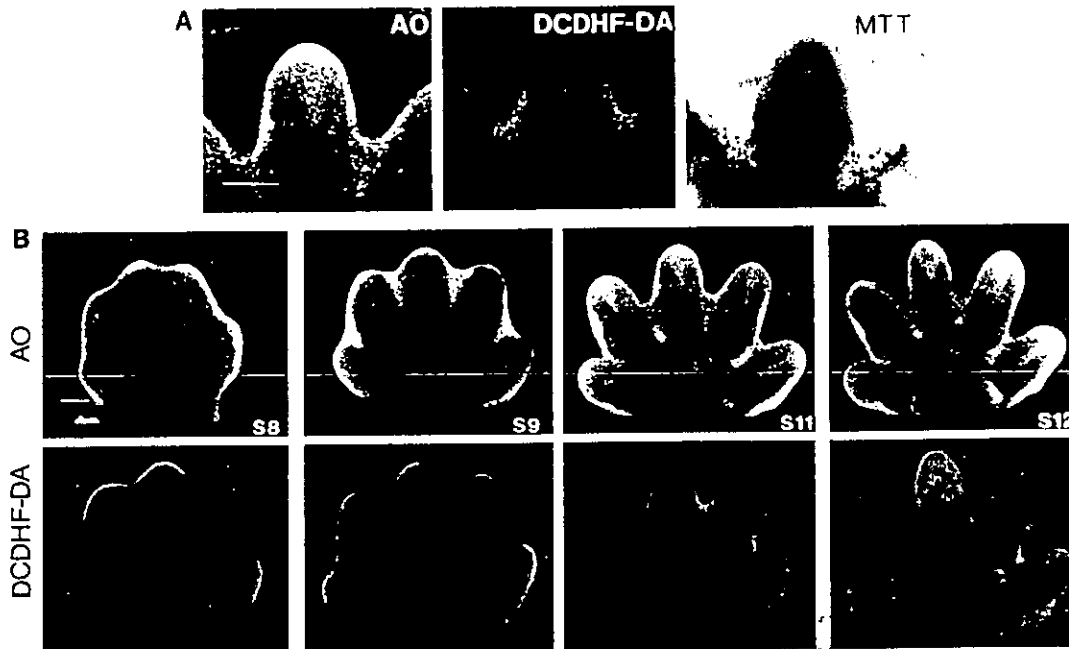


FIG. 5. *In situ* detection of ROS at interdigits. (A) Interdigital tissue of S11 forelimbs showed an intense staining with the ROS-sensitive dyes DCDHF-DA (middle) and MTT (right) coincidentally with the regions staining with AO (left); original magnification $\times 100$. Dark spots at interdigits are the purple formazan precipitate reproducibly seen in these regions; digits regularly give a light and diffuse staining. (B) Ventral view of forelimbs at different developmental stages stained with AO (top) or DCDHF-DA (bottom). Observe the resemblance in the patterns of AO and DCDHF-DA at the different developmental stages selected. Original magnification $\times 50$ (bar, 500 μm).

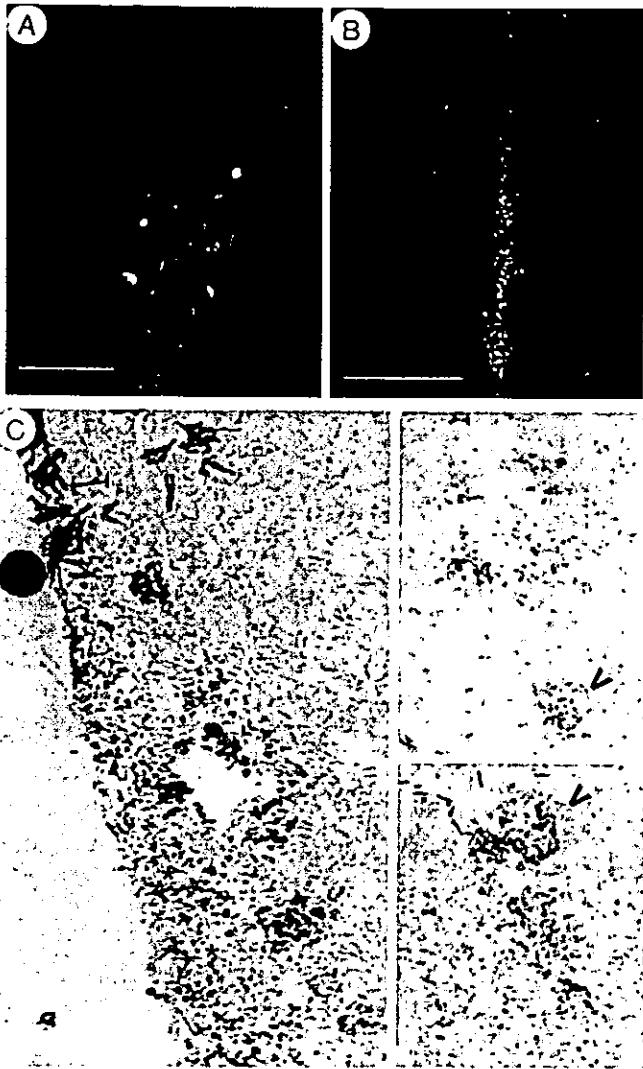


FIG. 6. (A) S11 forelimb interdigital zone double stained for ROS and for cell death. Developing limbs were simultaneously stained for ROS with DCDHF-DA and for cell death with PdI, at the time cell death was taking place. A representative confocal image after staining is shown (bar, 100 μm). Cells stained with DCDHF-DA and PdI are seen in green and red, respectively; the overlapping staining pattern appears in yellow. (B) Palatal shelves fusion line double stained for ROS and for cell death. Developing palates were processed as in A (bar, 250 μm). (C) Double detection of ROS-positive cells and macrophages in the "necrotic zones" of the limb. Cryosections of forelimbs stained with MTT (purple) were used for immunohistochemical detection of macrophage antigen F4/80 (light brown). Different patterns of staining were observed: positive cells for MTT (mesenchymal) are seen as isolated (small double arrowheads) or as within a broad region with a dispersed pattern of staining (asterisks), cells doubly stained with MTT and with antigen F4/80 (macrophages; small single arrowhead), and MTT-positive cells surrounded by F4/80 antigen-positive cells (mesenchymal cells within a macrophage; big arrowheads).

staining, were not stained with either MTT or DCDHF-DA. These results indicate that oxidative stress is a broadly occurring event in many areas of the embryo in which cell death takes place.

DISCUSSION

Although many reports have demonstrated the participation of oxidative stress in cell death, most of the data have come from studies with cell lines in culture. In this work we present evidence which suggests that the generation of oxidative stress is a widespread phenomenon associated with cell death that occurs during normal mouse development. The fact that interdigital cells survive due to the protective effect of antioxidants indicates that generation of oxidative stress is relevant for the activation of developmental cell death.

Identity of Cells under Oxidative Stress

Our data indicate that not all cells stained for ROS are macrophages since many of them were not detected with a macrophage-specific antibody. Furthermore, we and others [14] have shown that most macrophages at interdigits are associated with apoptotic bodies and, therefore, they should be positive for cell death indicators as reported by others [42]. According to the experiments described here, it is unlikely that most cells stained for ROS are macrophages, as a low percentage of the cells stained for ROS overlap with cells stained with cell death markers (Fig. 6). Therefore, mesenchymal cells at interdigits increase ROS levels during web regression; no epithelial cells at interdigits have been detected positive either for ROS probes or for cell death indicators.

Some of the antioxidant reagents used in this work (phenol and DMSO) seem to slow down the phagocytic process that takes place during apoptosis, as evidenced by the presence of free apoptotic bodies in the interdigital region of limbs treated for 6 h. These apoptotic bodies were probably derived from cells that were dying at the beginning of treatment, as intracellular integrity of most of them was completely lost (Fig. 3) and they were not detected by the TUNEL technique (Fig. 2). Nonetheless, the effect on phagocytosis cannot account for the inhibition of web regression observed in cultured limbs since, if this were the case, apoptotic bodies would be expected to accumulate along the incubation process. In contrast, after 6 h of treatment, apoptotic bodies no longer accumulated but, instead, diminished. The latter suggests that apoptotic bodies are not generated throughout the treatment, which can only be interpreted as an inhibition of cell death. Inhibition of phagocytosis do not block cell death as has been determined in *Caenorhabditis elegans* mutants [16] and directly in the interdigital tissue of limbs treated with cytochalasin B [25].

doubly stained cells (Fig. 6B). Of all analyzed regions, only the fusion line of the neural folds (8.5 dpc) and the branchial arches (10.5 dpc), which showed clear AO

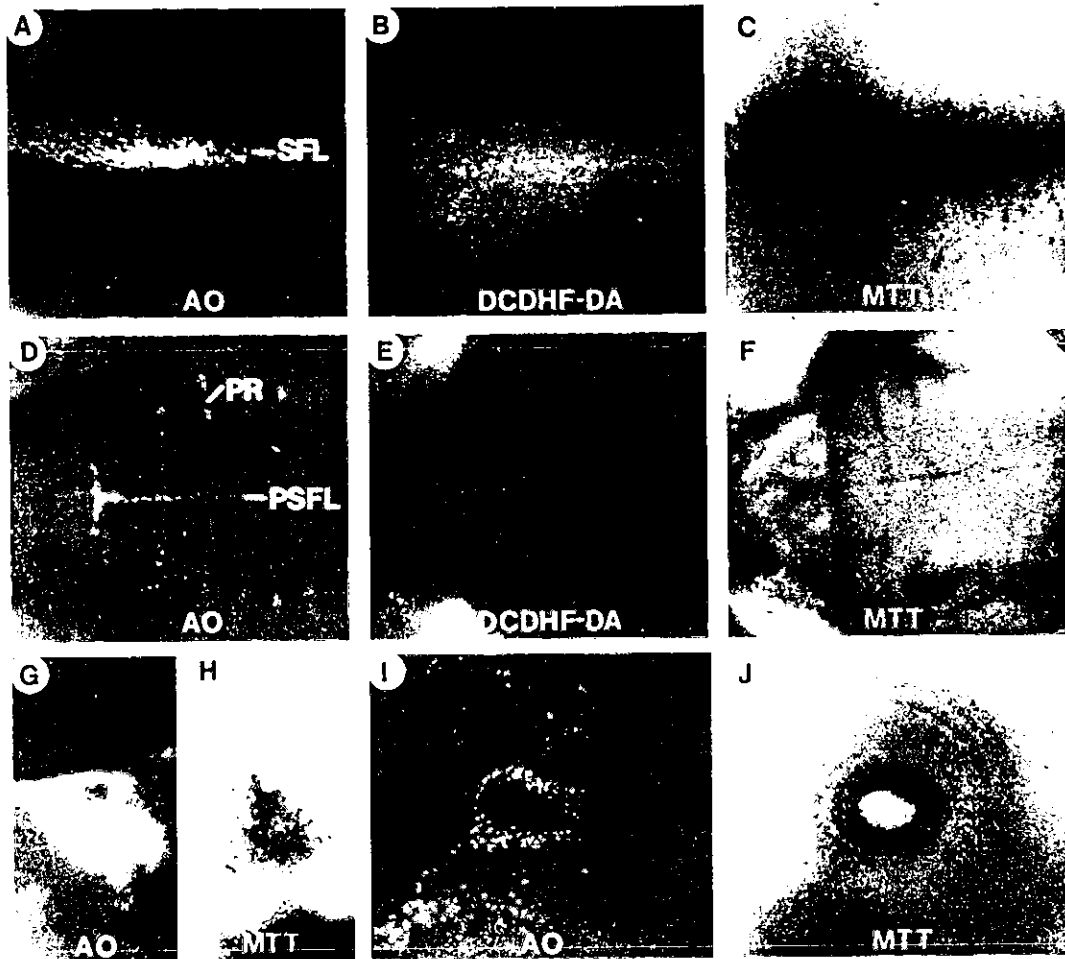


FIG. 7. *In situ* detection of ROS in developing embryos and its relationship with naturally occurring sites of cell death. Cell death was detected by AO staining (A, D, G, and I) and ROS accumulation was visualized by staining with DCDHF-DA (B and E) or MTT (C, F, H, and J). Observe the similar staining pattern obtained with AO compared with that obtained with MTT or DCDHF-DA in the sternum fusion line (SFL) of 13.5-dpc embryos (A–C), along the palatal shelves fusion line (PSFL) and the prominent rugae (PR) of 14.5-dpc embryos (D–F), in the 9.5-dpc otic vesicle (G and H), and in the 10.5-dpc developing eye (I and J). Original microscope magnifications for photographs shown were developing sternum and palate, $\times 50$; otic vesicle, $\times 100$; and developing eye, $\times 200$.

Role of ROS in Developmental Cell Death

The apoptotic process can be divided into the activation and the execution phases. It is in the execution phase that genes such as the *Ice* and the *bcl-2* family members act. Since programmed cell death has been shown to occur in the absence of ROS, and the anti-apoptotic BCL-2 protein can still be protective [21, 47], it seems that generation of oxidative stress is not an essential event for the execution phase of the death program. An alternative possibility is that ROS act as a transducing signal which could be used in certain cases for the activation phase of the death program [20]. This mechanism could be mediated by the action of ROS on specific molecules such as transcription factors [24, 32, 53] or kinases [26]. In agreement with this role, it was shown that during neuronal death caused

by nerve growth factor deprivation, the rise in ROS levels was transitory previous to the onset of cell death, and superoxide dismutase prevented death only at early stages of apoptosis [13].

In interdigits, although the staining patterns with ROS probes and AO at different stages of limb development are similar (Fig. 5), very few cells doubly stained with MTT and AO or with DCDHF-DA and PdI (Fig. 6 and Table 1). At least for PdI, which detects changes in plasma membrane permeability and accumulates bound to DNA, it is expected that the fluorescent signal lasts up to the end of apoptosis when cell components are degraded. Considering the generation of oxidative stress as a transitory event, if cells stained with PdI overlapped with those stained with the ROS probes, it would mean either that change in membrane permeability and increase in ROS concentration are events

occurring in parallel or that the latter is a consequence of the former. Therefore, the observed nonoverlapping staining suggests that the increase in ROS concentration is transitory and early (at least previous to the changes in plasma membrane permeability), as expected for a transducer that plays a role in the activation phase of apoptosis. Supporting this hypothesis, fewer cells were stained with ROS probes than with AO. Furthermore, cells with higher ROS levels were generally located close to the apical ectodermal ridge (AER) (Fig. 5), where cell death seems to start [44; E. Salas-Vidal *et al.*, in preparation]. It is possible to imagine that signals from the AER (see below) are secreted such as to promote cell death at the interdigits through generating, directly or indirectly, oxidative stress. Despite what is described above, further work is needed to establish if ROS act as a transducing signal but, if oxidative stress is a secondary event, increases in ROS should still be relevant, perhaps acting as a reinforcing signal for the efficient progress of the death program in developing cells.

In the developing limb, *bcl-2* expression is restricted to the digits [36], hence, the relatively low level of ROS observed in this region could result from the antioxidant activity proposed for BCL-2 [22]. If this is the case, all cells underneath the AER could be responding to the death signal, but BCL-2 would prevent death, allowing digit formation. In agreement with this hypothesis, we have recently detected higher peroxidase activity in digits than in interdigits (H. Lomelí *et al.*, in preparation).

Is There a Single Mechanism for the Activation of Developmental Cell Death?

Since ROS do not seem to be a component of the death machinery, our findings, showing that many regions of the mouse embryo that are undergoing cell death coincided with those under oxidative stress, are striking (Fig. 7). Generation of oxidative stress is not a general characteristic of programmed cell death, as protective effect of antioxidants has not been observed in some cell death paradigms [4, 18]. In addition, alternative transducing signals have been proposed [37, 40]. In this context, our data indicate that the generation of oxidative stress is a recurrent event during mouse development and ROS may be a major signal used to trigger embryonic cell death.

Parchment and Pierce obtained for the first time indirect data that suggest a possible role of oxidative stress in the process of cell elimination at interdigits and those with trophodermal potential in the inner cell mass (for an overview of their data, see [38]). According to their view, polyamines would be secreted by killing cells, which in turn would be catabolized by an extracellular amine-oxidase producing hydrogen

peroxide as a metabolite. Hydrogen peroxide then would "murder" sensitive cells. They propose that this model could be applied to the deaths of different cell types. The data shown in the present work agree with a role of oxidative stress in cell death and open the possibility that rise in ROS occurs inside the cells committed to die.

A common mechanism for embryonic cell death was also previously suggested from the expression of *lacZ* in many regions undergoing cell death of transgenic embryos containing the *fos* promoter-*lacZ* fusion gene [48]. Since *fos* expression is up-regulated by oxidative stress [6, 46], it is possible that within the *fos* promoter fragment used in the aforementioned transgenic mice, there are ROS-responsive elements that cause the observed *lacZ* expression pattern.

Retinoic acid (RA) receptor- β expression by interdigital cells [31] suggests that RA could participate in triggering the death process. Accordingly, RA can activate cell death in cultured interdigit explants [27]. Recently, we reported that RA activates cell death of embryoid body cells, which correlates with a significant increase in ROS levels and can be prevented by several antioxidants [5]. We have also observed a subtle increase in ROS levels in primary cultures of limb cells treated with RA (E. Salas-Vidal, unpublished results). Therefore, since RA seems to be synthesized by AER [56], it could be the signal responsible for generating oxidative stress and consequently cell death.

Production and/or accumulation of ROS was first found to be a characteristic of the aging process. Now recent evidence shows that generation of oxidative stress participates in different cellular processes. The data presented in this study are indicative of a very early ROS function during animal life, predominantly in cell death. Therefore, natural and pathological cell death can be initiated by ROS. Remarkably, ROS in plants are also involved in the initiation of cell death [19], suggesting that mechanisms of activation are conserved in these two kingdoms.

We are grateful to Drs. Jesús Aguirre and Jessica E. Swartz for their careful reading of the manuscript, to Drs. Rebeca Najera and Jesús Chimal for their technical advice, and to Elizabeth Mata, Sergio González, Graciela Cabeza, and Xochitl Alvarado for their technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN-202995).

REFERENCES

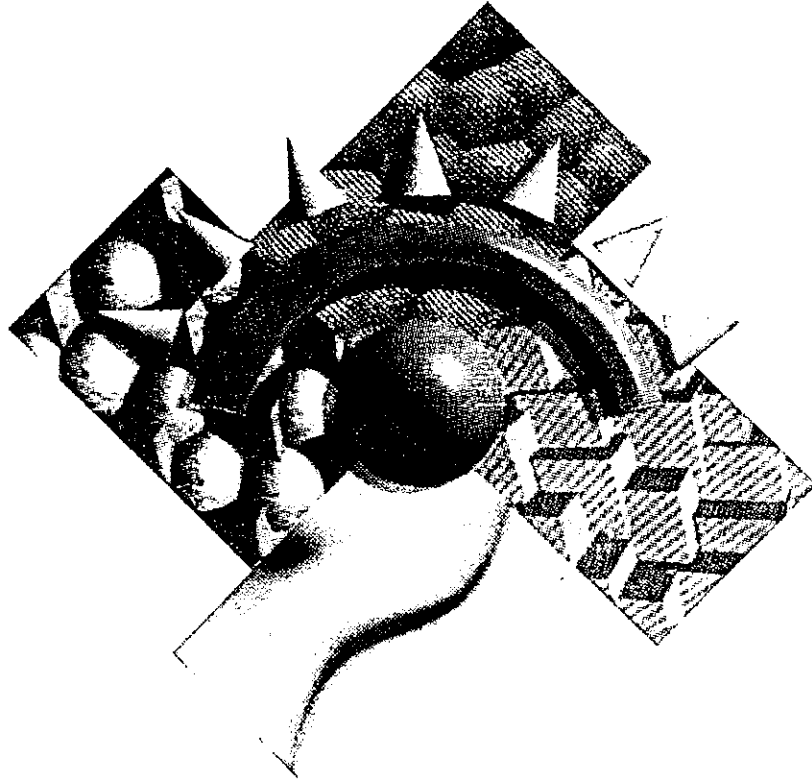
1. Abrahams, J. M., White, C., Fessler, L. I., and Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
2. Austin, J. M., and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* **11**, 805-815.
3. Burdon, R. H., Gill, V., and Rice-Evans, C. S. O. (1993). Reduc-

- tion of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radical Res. Commun.* **18**, 369–380.
4. Busciglio, J., and Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* **378**, 776–779.
 5. Castro-Obregon, S., and Covarrubias, L. (1996). Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation. *FEBS Lett.* **381**, 93–97.
 6. Cerutti, P., Larsson, R., Krupitza, G., Muehlethaler, D., Crawford, D., and Amstad, P. (1989). Pathophysiological mechanisms of active oxygen. *Mutat. Res.* **214**, 81–88.
 7. Coelho, C. N. D., Sumoy, L., Rodgers, B. J., Davidson, D. R., Hill, R. E., Upholt, W. B., and Kosher, R. A. (1991). Expression of the chicken homeobox-containing gene GHox-8 during embryonic chick limb development. *Mech. Dev.* **34**, 143–154.
 8. Coelho, C. N. D., Upholt, W. B., and Kosher, R. A. (1993). The expression pattern of the chicken homeobox-containing gene GHox-7 in the developing polydactylous limb buds suggests its involvement in the apical ectodermal ridge-directed outgrowth of limb mesoderm and in programmed cell death. *Differentiation* **52**, 129–137.
 9. Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M., and Tickle, C. (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209–218.
 10. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493–501.
 11. Glucksman, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59–86.
 12. Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8115–8119.
 13. Greenlund, L. J. S., Deckwerth, T. L., and Johnson, E. M., Jr. (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* **14**, 303–315.
 14. Hammar, S. P., and Mottet, N. K. (1971). Tetrazolium salt electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J. Cell Sci.* **8**, 229–251.
 15. Haugland, R. P., Ed. (1996). "Handbook of Fluorescence Probes and Research Chemicals," 6th ed., Molecular Probes, Eugene, OR.
 16. Hedgecock, E. M., Sulston, J. E., and Thomson, J. N. (1983). Mutations affecting programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **220**, 1277–1279.
 17. Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S., and Martin, P. (1994). Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell. Sci.* **107**, 1159–1167.
 18. Hug, H., Enari, M., and Nagata, S. (1994). No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett.* **351**, 311–313.
 19. Jabs, T., Dietrich, R. A., and Dangel, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853–1856.
 20. Jacobson, M. D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 83–86.
 21. Jacobson, M. D., and Raff, M. C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* **374**, 814–816.
 22. Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., and Bredesen, D. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274–1277.
 23. Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**, 137A.
 24. Khan, A. U., and Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem. Biol.* **2**, 437–445.
 25. Kiény, M., and Sengel, P. (1974). La nécrose morphogène interdigitale chez l'embryon de poulet: Effet de la cytochalasine B. *Année Biol.* **13**, 57–68.
 26. Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156–160.
 27. Lee, K. K., Li, F. C., Yung, W. T., Kung, J. L., Ng, J. L., and Cheah, K. S. (1994). Influence of digits, ectoderm and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital in culture. *Dev. Dyn.* **201**, 297–309.
 28. Lennon, S. V., Martin, S. J., and Cotter, T. G. (1991). Dose dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation* **24**, 203–214.
 - 29a. Martin, P. (1990). Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int. J. Dev. Biol.* **34**, 323–336.
 - 29b. Matthews, N., Neale, M. L., Jackson, S. K., and Stark, J. M. (1987). Tumor cell killing by tumor necrosis factor: Inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* **62**, 153–155.
 30. McConkey, D. J., and Orrenius, S. (1988). Signal transduction pathways to apoptosis. *T Cell Biol.* **4**, 370–375.
 31. Mendelsohn, C., Ruberte, E., and Chambon, P. (1992). Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev. Biol.* **152**, 50–61.
 32. Meyer, M., Schrenck, R., and Baeuerle, P. A. (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**, 2005–2015.
 33. Morel, F., Doussiere, J., and Vignais, P. V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **201**, 523–546.
 34. Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., and Shiota, K. (1995). Programmed cell death in the interdigital tissue. *Anat. Rec.* **242**, 103–110.
 35. Nicoletti, L., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271–279.
 36. Novak, D. V., and Korsmeyer, S. J. (1994). Bcl-2 protein expression during murine development. *Am. J. Pathol.* **145**, 61–73.
 37. Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (1995). Ceramide: A stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J. Cell Biochem.* **58**, 191–198.
 38. Parchment, R. E. (1993). The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 75–83.
 39. Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Nature* **262**, 695–700.
 40. Rajotte, D., Haddad, P., Haman, A., Cragoe, E. J., and Hoang, T. (1992). Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-

- stimulating factor and interleukin-3. *J. Biol. Chem.* **267**, 9980-9987.
41. Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., and Symons, M. C. R. (1991). "Techniques in Free Radical Research," Elsevier, Amsterdam.
 42. Rotello, R. J., Fernandez, P.-A., and Yuan, J. (1994). Anti-apoptosis and anti-engulfment: Monoclonal antibodies reveal specific antigens on apoptotic and engulfment cells during chicken embryonic development. *Development* **120**, 1421-1431.
 43. Saunders, J. W. (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604-612.
 44. Saunders, J. W., Gasseling, M. T., and Saunders, L. C. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev. Biol.* **5**, 147-178.
 45. Schwartzman, R., and Cidlowski, J. A. (1993). Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* **14**, 133-151.
 46. Shibamura, M., Kuroki, T., and Nose, K. (1990). Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. *Oncogene* **5**, 1025-1032.
 47. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1995). Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* **374**, 811-813.
 48. Smeyne, R. J., Vendrel, M., Hayward, M., Baker, S. J., Miao, G. G., Schilling, K., Robertson, L. M., Curran, T., and Morgan, J. I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* **363**, 166-169.
 49. Taketo, T., and Koide, S. S. (1981). *In vitro* development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* **84**, 61-66.
 50. Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R., and Byant, S. V. (1989). A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* **249**, 41-49.
 51. Wiedau-Pazos, M., Goto, J. J., Rabizadeh, S., Gralla, E. B., Roe, J., Lee, M. K., Valentine, J. S., and Bredesen, D. E. (1996). Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**, 515-518.
 52. Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., and Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**, 1105-1116.
 53. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.-C. E., and Curran, T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA-binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* **11**, 3323-3335.
 54. Zakeri, Z., Quaglino, D., and Ahuja, H. S. (1994). Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammetoe mutant. *Dev. Biol.* **165**, 294-297.
 55. Zetterqvist, H. (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph.D. thesis. Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
 56. Zgombic-Knigh, M., Satre, M. A., and Duester, G. (1994). Differential activity of the promoter for the human alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene ADH3 in neural tube of transgenic mouse embryos. *J. Biol. Chem.* **269**, 6790-6795.
 57. Zou, H., and Niswander, L. (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.

Received July 16, 1997

Revised version received September 18, 1997



computación
VISUAL 98

Ciudad de México, Abril 20-24, 1998

Organizado por
Facultad de Ciencias, UNAM
DGSCA, UNAM

en colaboración con
ACM/SIGGRAPH, LANIA, ITESM/CEM

Con el patrocinio
UNAM, Sociedad Mexicana de Ciencias de la Computación, Consejo Británico,
Silicon Graphics, Alias/Wavefront

Mouse Developmental Cell Death Database

Enrique Salas-Vidal, Rodrigo Cuervo, Denhí Schnabel, Xochitl Alvarado y Luis Covarrubias.

Departamento de Genética y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología, UNAM, APDO.
510-3 Cuernavaca, Morelos 62250.MEXICO Fax: (52)(73) 17-23-88. Tel: ((52-5) 622-7636/7631. e-mail: covs@ibt.unam.mx

Abstract

Computer databases are becoming essential tools for education and research in developmental biology and biomedical fields. In the present work we present a proposal for generating a cell death database, for mouse development. We present preliminary results on the analysis of mouse limb development, which in the future will be available via internet and in CD format for the general public.

1 Introduction.

Natural cell death (also known as apoptosis) has being long known to be one of the cellular processes most important in the morphogenesis of different organs and tissues during embryonic development [Glucsmann 1951; Saunders 1965, Hamburger, 1975; Clarke, 1990, White, 1995]. Large amount of data regarding the distribution of cell death have been gathered by different authors [Glucsmann 1951; Clarke, 1990], however no detailed computerized image databases and three-dimensional (3D) models of distribution of animal developmental cell death have been developed to date.

In the present project we propose to develop a digital data bank of the distribution of

cell death in the developing mouse embryo, using first the mouse limb as an starting model.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals.

Mouse strain CD-1 was used in this study. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation at 9.5 to 14.5 days post coitus (dpc, day 0.5 of coitus was the day on which vaginal plug was found). The embryos were removed, the fore and hind limbs were dissected (in L15 medium; Microlab, Mexico) and staged according to the limb bud development staging system of Wanek, et al [1989].

2.2 Analysis of cell death.

For vital dye staining, regions of cell death in freshly dissected embryonic limbs were visualized with acridine orange (AO; Sigma) by the protocol described by Abrahams et al [1993] validated to detect cell death in mouse embryos by Salas-Vidal et al. [1998] with slight modifications. Briefly, the tissues were rinsed in phosphate buffered saline (PBS: 0.2% KH₂PO₄, 0.115 Na₂HPO₄, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, pH 7.4) stained with AO at 5mg/ml in PBS, for 30

min. at 37°C and observed under standard fluorescence microscopy. For more detailed studies, the tissues were analyzed by confocal microscopy as described below.

The regions of cell death were confirmed with the aid of alternative techniques as previously described [Salas-Vidal et al., 1998].

2.3 Confocal Laser Scanning Microscopy.

Developing limbs were imaged as previously described [Salas-Vidal et al., 1988]. Briefly, stained limbs were imaged with the Bio-Rad MRC-600 confocal laser scanning system equipped with a krypton/argon laser and coupled to an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) with PlanNeofluar 5X (aperture 0.15), 10X (aperture 0.30) and 20X (aperture 0.50) objectives. AO stained tissues were excited with blue light (488 nm), and the RHS filter was employed for AO fluorescence detection.

2.4 Image analysis.

For the computer aided three dimensional reconstruction of mouse embryonic limbs, the AO stained confocal image series were displayed on a High Impact Silicon Graphics computer, using a temporal license of the commercial software VoxelView (Vital Images).

3 Results

3.1 Limb development as a model system.

In the present project we have chosen limb development as an starting model for the

generation of a digital image cell death database, because it is an organ with many advantages to work with: (a) it is easily dissectable, therefore it has been a widely used organ in developmental studies; (b) it shows a conspicuous regionalization, therefore a clearly distinguishable anatomy; (c) gene expression patterns of many important molecules are very well known, therefore this expression patterns can be correlated with cellular processes like proliferation, migration, cell death, etc. (Tabin, 1991); (d) embryonic limbs can be used in large quantities because four limbs are usable from each embryo; (e) limb development *in vitro* shows a similar pattern than *in vivo*, therefore results obtained after experimental manipulations can be extrapolated to events occurring *in vivo* [Salas-Vidal et al., 1998]

3.2 Limb development staging system.

Reliable embryo staging systems are crucial for descriptive and experimental studies in developmental biology. A good staging system with discrete and well-defined stages provides a way to standardize observations and experimental analysis of ontogenic and regeneration processes. We selected, as the staging system for limb development, the one described by Wanek et al. [1989], since it is solely based on morphology of the limb in living preparations. However, we present in Table 1, other staging systems of embryo development [described in Kaufman, 1994] for comparison purposes. Embryo development is compared up to Wanek's limb stage 13, since most morphogenetic processes are completed up to this stage.

| <u>Theiler stage (1)</u> | <u>E(dpc)(1)</u> | <u>Somites(1)</u> | <u>Size(mm. unfix) (1)</u> | <u>Wanek Stage stage (F/H) (2)</u> | <u>Characteristics(1)</u> |
|--------------------------|------------------|-------------------|----------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | 0-1 | - | - | - | -Fertilized one-cell stage embryo. at the ampullary region of the oviduct. |
| 2 | 1 | - | - | - | -Two-cell stage embryo, beyond ampullary region. |
| 3 | 2 | - | - | - | -4 to 16 cell stage embryos, from early to fully compacted morulae. |
| 4 | 3 | - | - | - | -Around the utero-tubal junction |
| 5 | 4 | - | - | - | -Morula to blastocyst stage, with distinct inner cell mass, and outer layer of trophoctoderm cells. At the uterine lumen. |
| 6 | 4.5 | - | - | - | -Zona-free blastocyst and located within the uterine lumen. |
| 7 | 5 | - | - | - | -Attaching blastocyst |
| 8 | 6 | - | - | - | -Egg cylinder. Ectoplacental cone appears. Embryo implanted |
| 9 | 6.5 | - | - | - | -Differentiation egg cylinder. Proamniotic cavity appears. |
| 10 | 7 | - | - | - | -Formation mesoderm. Primitive villi and branching villi. Endometrial reaction |
| 11 | 7.5 | - | - | - | -Amnion formation, primitive groove, allantois |
| 12 | 8-8.5 | 1-7 | - | - | -Neural plate, presomite stage |
| 13 | 8.5-9 | 8-14 | - | - | -First somites, neural folds begin to close in occipital/cervical region |
| 14 | 9-9.5 | 13-20 | - | 0 | -Turning, Two pharyngeal bars, optic sulcus. |
| 15 | 9.5-10.25 | 21-29 | 1.8-3.3 | 1/0 | -Elevation of cephalic neural folds, rostral neuropore. Optic vesicle formation. |
| 16 | 10.25-10.75 | 30-34 | 3.1-3.9 | 1+/1 | -Formation of caudal neuropore. Three pharyngeal bars. Optic pit. Forelimb bud appears. |
| 17 | 10.25-10.75 | 35-39 | 3.5-4.9 | 2+/1+ | -Closure caudal neuropore. 4 branchial bars. Hind limb buds appear. Lens placode otic vesicle olfactory placode/pit. |
| 18 | 11 | 40-44 | 5-6 | 4/2+ | -Deep lens indentation, optic cup. |
| 19 | 11.5 | >45 | 6-7 | 5/4 | -Lens vesicle, deep nasal pit formation. Cervical somites becoming indistinct. Hand plate |
| 20 | 12 | nd | nd | 6+-8/5+-7 | -Lens vesicle completely separates from surface. Cervical somites indistinct. Distal part of forelimb bud paddle-shaped. Foot plate. |
| 21 | 13 | nd | nd | 9-10/8-9 | |
| 22 | 14 | nd | nd | 11-12/10-11 | |
| 23 | 15 | nd | nd | >13/>12 | |

TABLE 1.- Comparative table of mayor mouse embryo staging systems. From (1) Kaufman [1994], and (2) Martin [1990] and Wanek et al [1989].

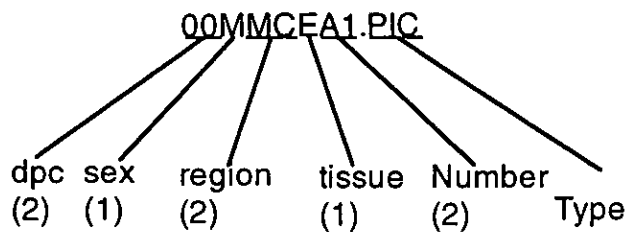


Fig. 1.- Proposed file naming conventions for developmental cell death database.

3.3. The cell death database.

For the cell death database we propose a code for file naming (Fig. 1), that can be used with common operative systems used in most biology laboratories, Windows and Macintosh (also can work fine on UNIX based systems). Since Windows impose most of the file name and character usage limitations, we chose to follow its restrictions. File names are made of up to eight characters, and a period followed by file extension. The file name can only use conventional alphanumeric characters. The first two characters, describe the number of days post coitus (dpc) of the embryo, which is widely used as an embryo development indicator, day 00 is when the vaginal plug is found after caging male and female mouse for cross purposes. The next position describe the embryo sex if available, M for male, F for female, and N for not determined. This information can be used to distinguish differences that have been described in morphogenetic processes between male and female embryos [Mittwoch and Delhanty, 1969; Mittwoch 1993]. Next two spaces are used for describing the embryonary regions, and next space for tissue; the precise letter code will be described elsewhere [Salas-Vidal and Covarrubias in preparation] and will be based on the index

provided by Kaufman [1994]. The following two spaces are for embryo specimen numbering, to facilitate archiving data and embryo collection numbering. The file extension space describe the file type image (like .pic, .tif, etc.), text (.doc, etc.) or other kinds of files.

The cell death information resource (Fig. 2) will contain information linking to different kind of information: embryonary organ, region and tissue index (external and internal organ anatomy image-text data base), images of embryos to visualize cell death localization (descriptive database of the regions where cell death occurs during mouse embryonic development), methodology index (methodology principles and description). Links to other developmental biology resources via internet will also be included.

3.4. The cell death distribution during mouse limb development.

Regions of cell death in freshly dissected embryonic limbs were visualized with the vital dye acridine orange staining method (AO) [Abrahams et al 1993], validated to detect cell death in mouse embryos by Salas-Vidal et al. [1998]; the details of this analysis will be presented elsewhere [Salas-Vidal and Covarrubias,

manuscript in preparation]. We found that cell death patterns change during mouse limb development (Fig. 3). As expected cell death was mainly located in the interdigital tissue and the so called anterior and posterior "necrotic zones". However our analysis demonstrated that distribution was not homogeneous, rather cell death occurs in "gradients" that follow the main limb axes: antero-posterior, dorso-ventral and disto-proximal [Salas-Vidal and Covarrubias, manuscript in preparation]. Fig. 3 show some of these results. In stage 9 (S9) little cell death was observed in the most distal regions of limbs and by S10, pronounced cell death was observed at interdigital regions. Then between S11 and S12 most interdigital tissue regression occurred, and digit individualization was observed. Cell death was more prominent in ventral regions than in dorsal ones (Fig. 3)

3.5 3D reconstruction and rendering of mouse embryo confocal images.

With the confocal stacks of images we made 3D-renderings to obtain detailed images of the external structure of mouse embryonic limbs (Fig 4). 3D reconstruction of limbs at S10, S11 and S12 viewed from ventral or from dorsal sides are shown. Models of the limb contours (in pink) and of cell death regions (in red) are shown. Clearly cell death patterns change and as development advance become more restricted, participating in limb fine shaping (Fig. 4). More detailed analysis of these models will be presented elsewhere [Salas-Vidal and Covarrubias, manuscript in preparation].

4 Discussion

4.1 2D models showed that cell death patterns change during mouse embryonic limb development.

2D confocal images of mouse embryonic limbs showed that cell death patterns change during limb development, following the main limb axes. These cell death patterns are similar to the ones previously described by Saunders [1966] as cell death "waves". Particularly noticeable is the one observed during interdigital regression between 13 and 14 dpc, from S10 to S12, starting at the most distal mesenchymal tissue, extending to more proximal regions as development proceed (Fig. 3 and 4).

In earlier developmental stages, 10 dpc or S3 (not shown), cell death starts in the most anterior region of the limb base, and afterwards also at the base in the most posterior region of the limb bud. This antero-posterior pattern have been previously reported to occur in other tissues such as the rombencephalon, where cell death occur first in rhombomere 3 (anterior) and latter in rhombomere 5 (posterior) [Graham, et al., 1993]. This pattern also occur during late somite and in prominent rugae in the palate development [Salas-Vidal and Covarrubias, unpublished results].

2D models helped us to define that digit separation in the proximo-distal axis occurs by two main processes, interdigital regression and digit growth [Fig. 3 and 4, and Salas-Vidal and Covarrubias, manuscript in preparation].

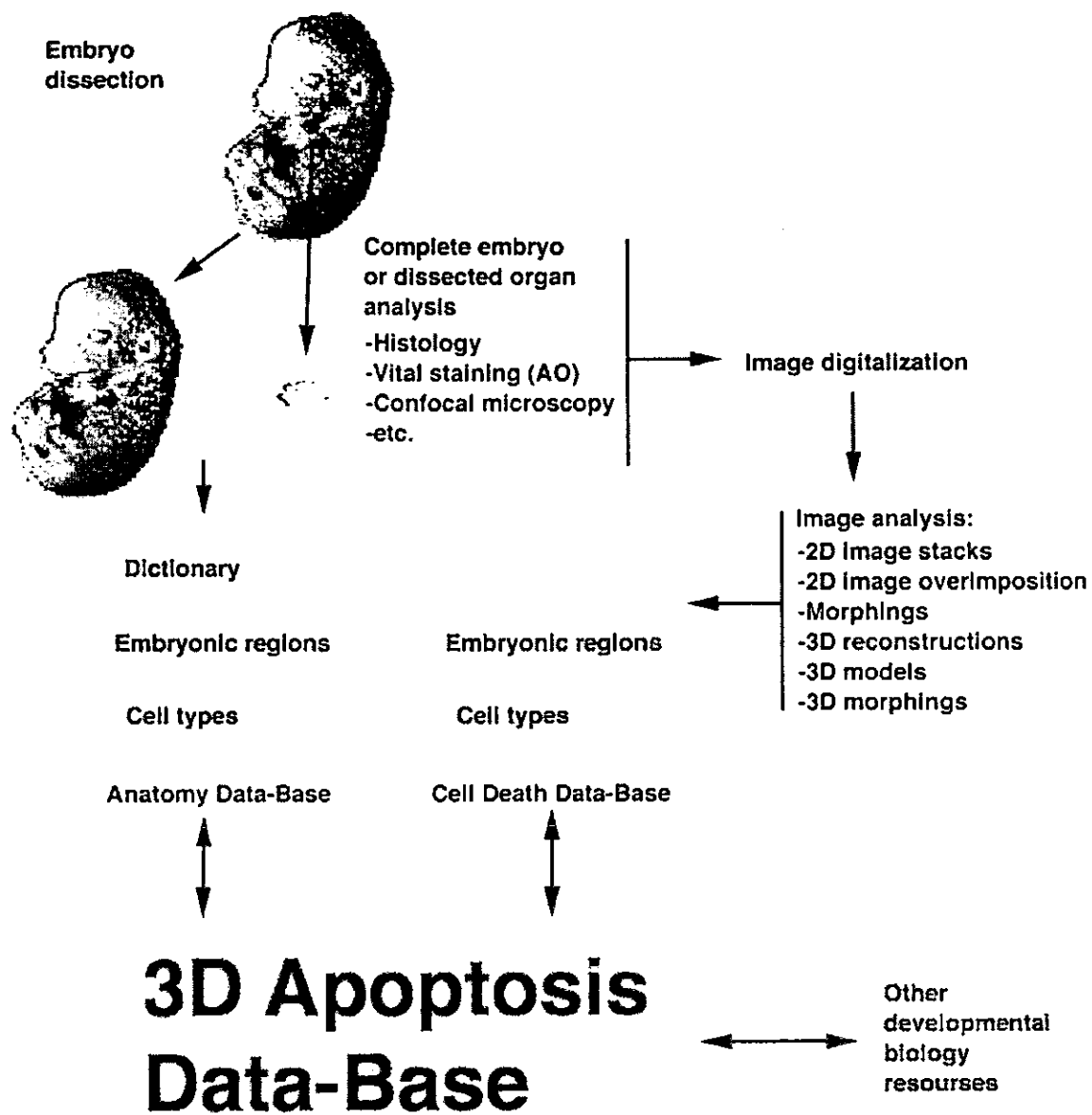


Fig. 2 The cell death information resource. Information flow is shown as single arrows. Lines with double arrowheads mean information flow interaction.

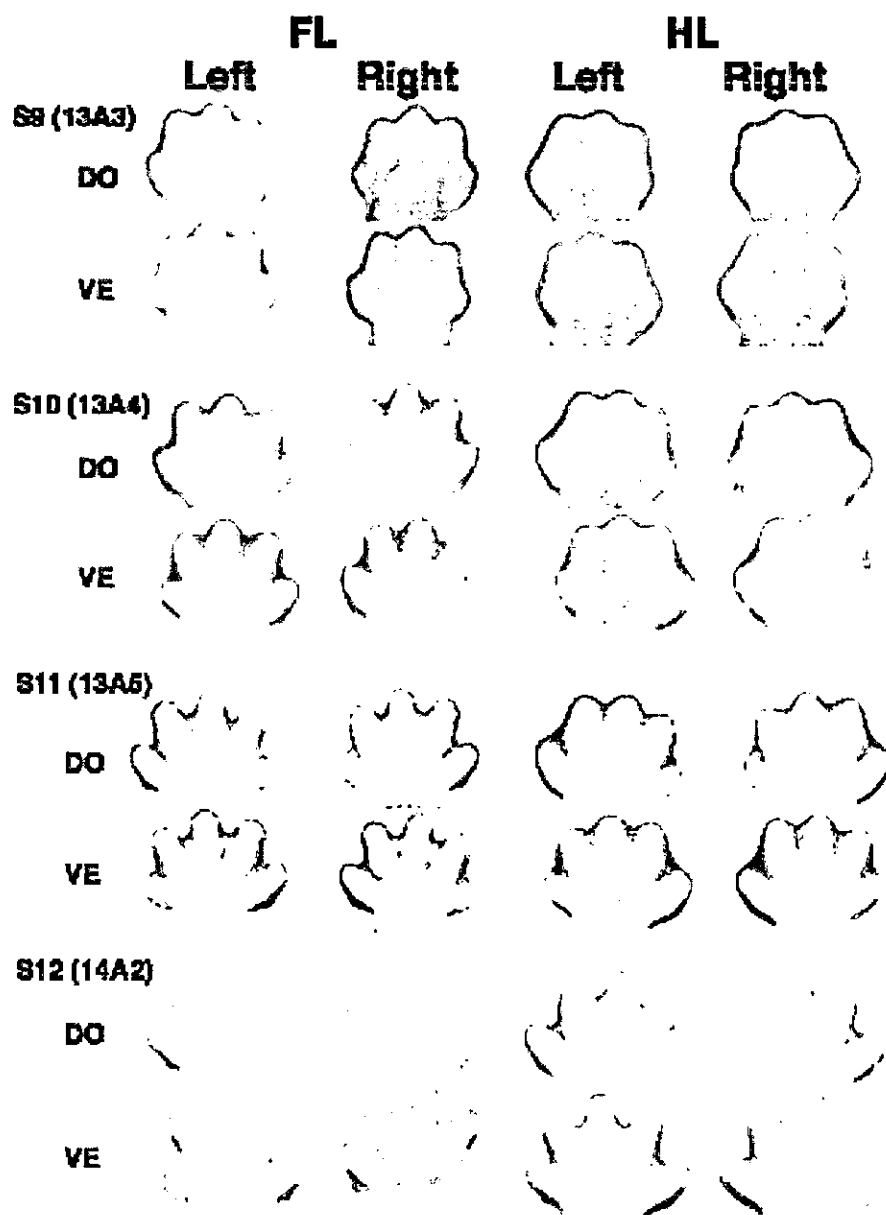


Fig. 3 Cell death distribution during late mouse limb development. FL, fore limb. HL, Hind limb. DO, dorsal view. VE, ventral view. In parenthesis embryonic ages in dpc are shown, followed by the sample number. Regions of cell death are shown in black.

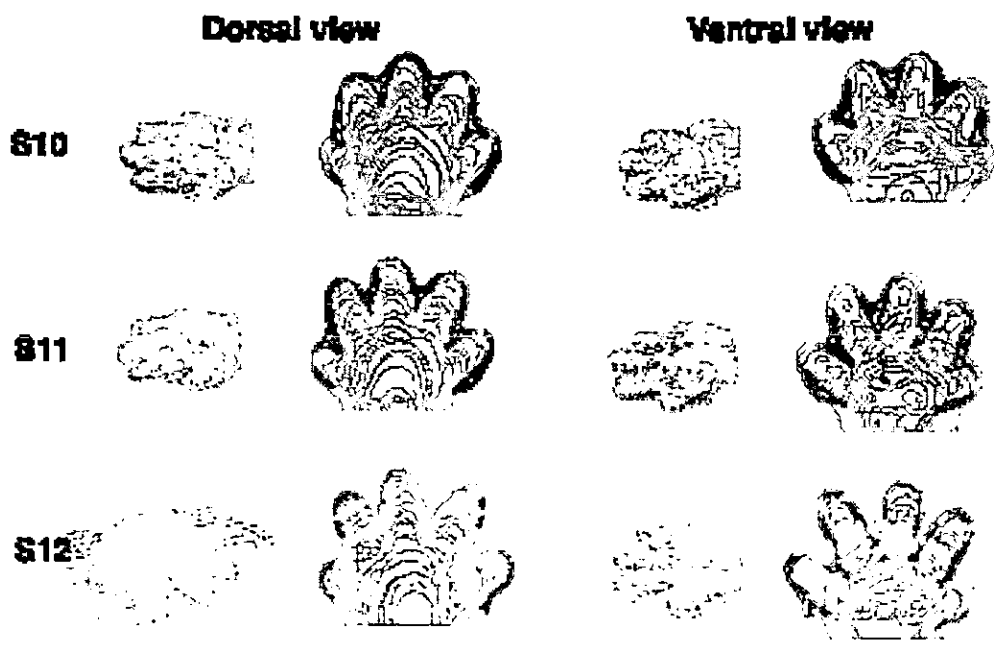


Fig. 4. 3D reconstruction and models of embryonic mouse limbs. Limb contours are shown in gray in 3D reconstructions from the original confocal images. In pink 3D wire frame models are shown, with the cell death in red.

This seems reminiscent to digit individualization mechanisms in amphibians, where digit separation occurs only by differential tissue growth [Cameron and Fallon, 1977].

process that can not be observed in simple 2D models, therefore the contribution of differential growth ^{could} ~~not~~ be underestimated in the 2D analysis. } ?

4.1 3D models showed also that differential tissue growth and cell death participate in digit individualization in the dorso-ventral axis.

Detailed 3D model analysis showed that interdigital invagination is similar in both dorsal and ventral regions, although in the ventral region cell death is more prominent (Fig. 4). This data are additional support to the idea that digit individualization occur⁴ by differential growth in addition to interdigital cell death, and not only by the latter mechanism, in agreement with the 2D models. Finally mouse embryonic limbs bend in the dorso-ventral axis after S11 (Fig. 4), a

4 Conclusions

The results presented in the present paper and elsewhere [Salas-Vidal and Covarrubias, manuscript in preparation], is helping us evaluate the contribution of cell death to the morphogenesis of limb, along to define some mechanisms involved in the control of cell death patterning. This information is planned to be accessible via internet and in CD in the near future, to help researchers and students in developmental biology fields to view the developmental cell death process in 3D models.

5 Acknowledgments

Project partially supported by Cray Res.

Inc./DGSCA, UNAM joint projects, and DGAPA/UNAM

6 References.

- [Abrahams et al., 1993] Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117, 29-43. 1993.
- [Bard, 1990]. J.B.L. Bard. *Morphogenesis*. Cambridge University Press, Avon. 1990.
- [Bard and Davies, 1995] J.B.L. Bard and J.A. Davies. Development, databases and the internet. *BioEssays* 17: 999-1001. 1995.
- [Barinaga, 1994] M. Barinaga. Looking to development's future. *Science* 266: 561-564. 1994.
- [Cameron and Fallon, 1977] J. Cameron and J.F. Fallon. The absence of cell death during development of free digits in amphibians. *Dev. Biol.* 55:331-338. 1977.
- [Clarke, 1990] P.G.H. Clarke. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213. 1990
- [Gavrieli et al., 1992]] Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501. 1992.
- [Glucsmann, 1951] A. Glucsmann. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26: 59-86. 1951.
- [Graham et al., 1993] A. Graham, I. Heyman and A. Lumsden. Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development* 119: 233-245.
- [Hamburger, 1975] V. Hamburger. Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160: 535-546. 1975.
- [Hartenstein, 1995] V. Hartenstein, et al. A graphic digital database of *Drosophila* embryogenesis. *Trends Genet.* 11: 51-58. 1995.
- [Kaufman, 1994] M.H. Kaufman. *The atlas of mouse development*. Academic Press, Second Printing, 1994.
- [Martin, 1990]. P. Martin. Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int. J. Dev. Biol.* 34:323-336. 1990.
- [Mittwoch and Delhanty, 1969] U. Mittwoch and J.D.A. Delhanty. Growth of differentiating testes and ovaries. *Nature* 224: 1323-1325. 1969.
- [Mittwoch, 1993] U. Mittwoch. Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum. Reprod.* 8: 1550-1555. 1993.
- [Salas-Vidal et al., 1998] E. Salas-Vidal, H. Lomelí, S. Castro-Obregón, R. Cuervo, and L. Covarrubias. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell Res.* 238, 136-147. 1988.
- [Saunders, 1965] J.W. Saunders. Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612. 1965.
- [Tabin, 1991] C.J. Tabin. Retinoids, homeoboxes, and growth factors: Toward molecular models of limb development. *Cell* 66, 199-217.
- [Thomas et al., 1996] C. Thomas, P. DeVries, J. Hardin, and J. White. Four-dimensional imaging: Computer visualization of 3D movements in living specimens. *Science* 273: 603-607. 1996.
- [Tomei and Cope 1991] L.D. Tomei, and F.O. Cope. *Introduction*. In Apoptosis: The molecular basis of cell death. Tomei, L.D., and Cope, F.O. ed. CSHL Press, New York. 1991.
- [Wanek et al., 1989] N. Wanek, K. Muneoka, G. Holler-Dinsmore, R. Burton, and S.V. Bryant. A