

20

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UACPyP del CCH

F. Q

Metabolismo de especies de oxígeno reactivas
para el control de la muerte celular programada

Tesis de posgrado que, para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas
presenta:

Denhi Schnabel Peraza

Director de tesis:
Dr. Luis Covarrubias Robles.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Comité Tutorial:

Dr. Luis Covarrubias
Dr. Wilhelm Hansberg
Dr. Alejandro Zentella

Jurado de examen de grado:

Presidente: Dr. Alejandro Alagón
Secretario: Dr. Luis Covarrubias
Vocal: Dr. Jesús Aguirre
Suplente: Dr. Rafael Vazquez
Suplente: Dra. Martha Vázquez

DEDICATORIAS

A Enrique

por todo lo que hemos vivido juntos, y por lo que nos falta.

A padre y madre

que siempre me apoyan y están presentes en todo momento.

A mi familia que adoro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Covarrubias por invitarme a formar parte de un excelente grupo de trabajo donde pude aprender y desarrollarme tanto profesionalmente como personalmente.

Al comite tutorial por todos los comentarios a lo largo del proyecto.

A todos los miembros del jurado, que examinaron con mucho cuidado todo el trabajo. Gracias.

A todos los integrantes del laboratorio que además de ser buenos compañeros son muy buenos amigos.

A Xochitl Alvarado y Enrique Salas por toda la ayuda con las imágenes en el confocal y el análisis de estas.

Al personal del Bioterio en especial a la Dra. Elizabeth Mata y Dra. Graciela Cabeza.

A Diana Escalante y Veronica Narvarez que me enseñaron tantisimas cosas con los transgénicos.

A todos los integrantes de los rigurosos jueves en casa de Ramón por la cantidad de horas de diversión y discusión.

Al grupo de natación y baile donde libero todas mis neuronas.

A la UNAM.

RESUMEN

La muerte celular es un evento común durante el desarrollo de diferentes tejidos embrionarios y postnatales; esta muerte puede iniciarse por una gran variedad de señales de activación y puede también depender del estado metabólico particular de la célula. En este trabajo se obtuvo evidencia a favor de que el metabolismo de las especies de oxígeno reactivas participa en el control de la muerte celular programada.

Resultados en el presente trabajo mostrarán que la actividad que observamos con el DCF-DA corresponden a la actividad enzimática de una glutatión peroxidasa. Las regiones donde se observó la actividad de glutatión peroxidasa coinciden con las zonas en donde no se observó un aumento en el estrés oxidativo y la muerte celular. Esto sugiere que la actividad de peroxidasa juega un papel importante en evitar un aumento en las las concentraciones de EOR, evitando así la muerte celular en los dígitos.

Con la finalidad de determinar cuál o cuáles eran las glutatión peroxidosas responsables de la actividad presente en los dígitos se realizó un RT-PCR específico para la GPX1, GPX3 y GPX4. Los resultados mostraron que las tres peroxidosas probadas se encuentran en el miembro a los 13 dpc, que corresponde a los estadios 9, 10 y 11. Se escogió a la GPX4 para realizar una hibridación *in situ* en el miembro completo en los diferentes estadios del desarrollo (de 9 a 12). Los resultados mostraron que la GPX4 se expresa en los dígitos y no se expresa en los interdígitos. Esto sugiere una regulación de la expresión de la GPX4, restringiendo la expresión únicamente a los dígitos. Esta expresión corresponde parcialmente a los sitios donde se observó la actividad de peroxidasa. Mientras que en las regiones distales de los dígitos del miembro, donde se observa una mayor actividad de glutatión peroxidasa, no se detectó la expresión de la Gpx4. Una posibilidad es que alguna de las otras dos glutatión peroxidosas detectadas por RT-PCR, la Gpx1 y/o la Gpx3, sean las responsables de esta actividad en la región mas distal del miembro.

Vivi Cora.

INDICE

Introducción

La muerte celular.....	1
Fase de activación de la apoptosis.....	3
Las especies de oxígeno reactivas.....	3
Fase de ejecución de la apoptosis.....	11
Las proteasas y la ejecución de la apoptosis.....	11
BCL-2 y la muerte celular.....	12
Fases de fagocitosis y degradación.....	15
El estrés oxidativo y la muerte celular.....	16
El desarrollo embrionario de las extremidades de ratón como modelo de estudio.....	17
Antecedentes.....	18
Hipótesis general del proyecto.....	20
Objetivos	
Objetivo general.....	20
Objetivo particular.....	20
Materiales y métodos	
Animales.....	21
Disección de extremidades de ratón.....	21
Cultivo <i>in vitro</i> de extremidades de embrión de ratón.....	21
Análisis de la muerte celular programada.....	22
Detección de actividad de peroxidasa <i>in situ</i>	22
Microscopía confocal.....	23
Estrategia para la construcción RAR β 2-bcl-2-IRES-BFP.....	23
Purificación de ácido desoxirribonucleico (DNA).....	24
Preparación de células competentes para electroporar.....	25
Electroporación de células competentes.....	26
Purificación de DNA a baja escala (Miniprep).....	26
Purificación de plásmido a gran escala.....	27
Purificación de ácido ribonucleico (RNA).....	27

Gel para RNA.....	28
Tratamiento de las muestras de RNA.....	28
Preparación de cDNA a partir de RNA.....	28
Amplificación de transcritos por PCR.....	28
Hibridación <i>in situ</i> de miembros enteros.....	31
Medios y soluciones.....	33
Resultados	
Desarrollo de las extremidades de ratón	38
Detección de actividad enzimática <i>in situ</i>	38
Actividad de peroxidasa y muerte celular.....	40
Identificación de la enzima responsable de la actividad enzimática observada.....	42
Determinación de la identidad de la glutión peroxidasa por RT-PCR.....	45
Hibridación en embrión entero.....	48
Expresión de <i>Bcl-2</i> en los interdígitos.....	50
Discusión	
Las glutación peroxidasas y el control de la muerte celular.....	52
BCL2 y la actividad de las glutación peroxidasas.....	55
Conclusiones.....	57
Perspectivas.....	57
Bibliografía.....	59

INTRODUCCIÓN

La muerte celular

En general, se han definido dos tipos de muerte celular:

a) La necrosis, la cual ocurre únicamente en condiciones patológicas en respuesta a una gran variedad de condiciones dañinas, como por ejemplo: hipertermia (Buckley, 1972), hipoxia (Laiho y col., 1983) o envenenamiento metabólico (Trump y col., 1984). Este tipo de muerte celular se caracteriza porque la célula se vuelve hipertónica, los organelos se hinchan y lisan (fig.1, 5) y posteriormente la célula se desintegra (fig.1, 6).

b) La apoptosis (caída natural de las hojas en otoño). Este tipo de muerte que ocurre en condiciones fisiológicas, especialmente durante el desarrollo embrionario. Se caracteriza por cambios morfológicos bien definidos como son la reducción de volúmen celular que provoca que la célula pierda contacto con las células adyacentes (fig.1, 1). Dentro del núcleo, la cromatina forma masas densas que aumentan a lo largo del tiempo hasta que se observa un núcleo totalmente condensado. El citoplasma se encoge lo que causa que la membrana celular se distorsione y se generan protuberancias (fig.1, 2). Al separarse estas protuberancias dan origen a los denominados cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos se caracterizan por tener en su interior organelos que mantienen su estructura (fig.1, 3). Los cuerpos apoptóticos son endocitados por células adyacentes con propiedades fagocíticas o por macrófagos (fig.1, 4). Finalmente son degradados dentro de fagolisosomas (Kerr y col., 1972; Kerr y Harmon, 1991).

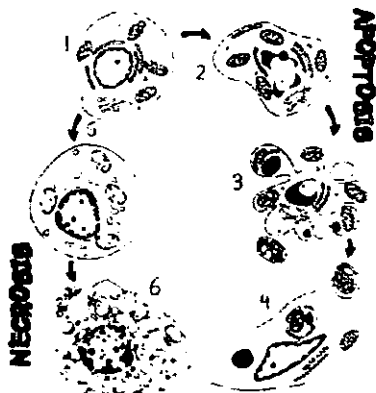


Figura 1. Diagrama en el cual se representa la secuencia de los cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis (1-4) y de la necrosis (5 y 6)

El término muerte celular programada se utilizó para describir la muerte celular que ocurre de manera regulada durante el desarrollo en lugares y tiempos determinados. Así la muerte celular participa en diversos procesos morfogenéticos necesarios durante el desarrollo embrionario (Glucksmann, 1951), tales como: la eliminación de un 50% de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso en los vertebrados; en la definición de estructuras (por ejemplo la formación de los miembros) (Saunders, 1966); la degeneración de estructuras, (por ejemplo la eliminación de los conductos de Müller en las hembras durante la diferenciación sexual) (Ortiz, 1945). La muerte celular está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis en los organismos adultos (Raff, 1992). Un decremento en la muerte celular puede contribuir a provocar enfermedades autoinmunes (Tan, 1994) o cáncer (Williams, 1991). Por el contrario, un exceso de muerte celular puede conducir a enfermedades tales como la neurodegeneración (Kerr y Harmon, 1991; Sen, 1992).

La apoptosis se caracteriza por una cascada de eventos, que se pueden dividir en 4 fases (Jacobson, 1996):

- a) la fase de activación, la cual consiste en la transducción de las señales que activan el programa de muerte celular.
- b) la fase denominada de ejecución, en la cual la maquinaria de muerte actúa dando lugar a los cambios morfológicos característicos de la apoptosis.
- c) la fagocitosis, mediante la cual se inicia la eliminación de los cuerpos apoptóticos, y
- d) la fase final en la que se degradan los fragmentos fagocitados.

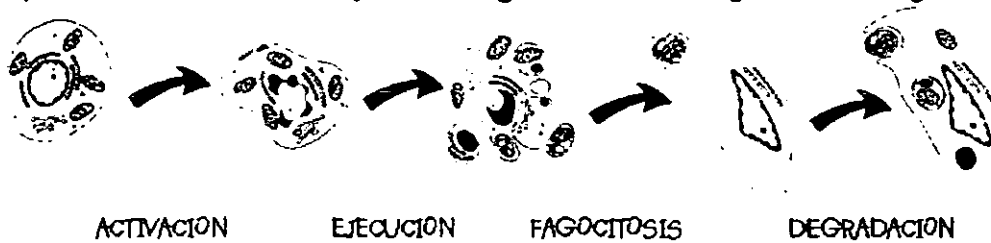


Figura 2. Fases del proceso de apoptosis.

Fase de Activación de la Apoptosis

La fase de activación a su vez, se puede dividir en diferentes etapas, típicas de la señalización por moléculas extracelulares. Dentro de los mensajeros primarios capaces de activar o prevenir el proceso de muerte celular existe una gran variedad, como por ejemplo los esteroides de forbol, los glucocorticoides, el ácido retinóico y los factores de crecimiento. Estos factores al unirse a sus receptores transducen señales al interior de la célula y son capaces de generar segundos mensajeros como el AMP cíclico, el calcio, ceramidas y las especies de oxígeno reactivas (Jacobson, 1996).

Muchos factores de crecimiento activan receptores que tienen actividad de tirosin-quinasa, los cuales inician una cascada de transducción de la señales, que involucra fosforilaciones sucesivas. Al activarse en esta cascada de fosforilaciones a RAS y/o a RAF, son capaces de proteger a las células de la muerte. Otros factores que inciden sobre la muerte celular, transducen las señales por otras rutas que involucran segundos mensajeros como el calcio, el inositol trifosfato y el AMP cíclico o a cinasas como la PKC (Jacobson, 1996).

El receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) y el receptor de Fas, transducen la señal de muerte en respuesta a la unión a sus respectivos ligandos (Wong y col., 1989). Estos receptores tienen un dominio de muerte (DM) que les permite asociarse con otras proteínas. Este complejo protéico es capaz de activar la maquinaria de muerte de dos maneras: al unirse a otra proteína, FLICE, que es capaz de activar a la maquinaria ejecutora de la muerte celular o mediante la producción de ceramida. Se ha demostrado que la ceramida es capaz de inducir cambios típicos de la apoptosis como la fragmentación nuclear, al administrarla a cultivos celulares (Obeid y Hannun, 1995).

-Las Especies de Oxígeno Reactivas

Existen varias evidencias de que las EOR son capaces de participar dentro del programa de muerte celular (ver más adelante). Las especies de oxígeno reactivas (EOR) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno.

el radical hidroxilo y otros radicales son generados por todas las células aeróbicas como subproductos de una serie de reacciones metabólicas y en respuesta a diferentes estímulos. Las EOR pueden generarse tanto en reacciones enzimáticas como no enzimáticas (fig. 3), dependiendo del tipo celular.

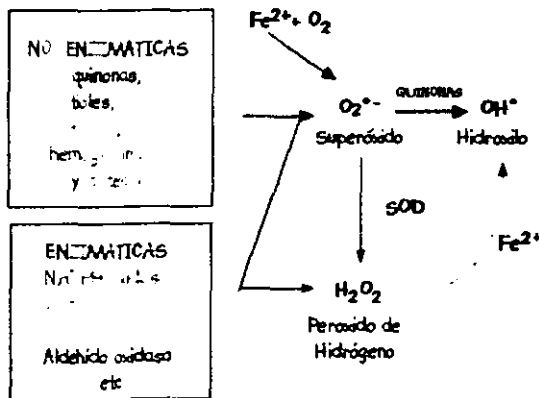


Figura 3. Generación de EOR

La reacción catalizada por la NADPH oxidasa en la membrana plasmática de los leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y en otros tipos celulares de mamíferos libera superóxido al espacio extracelular o a una vacuola fagocítica.



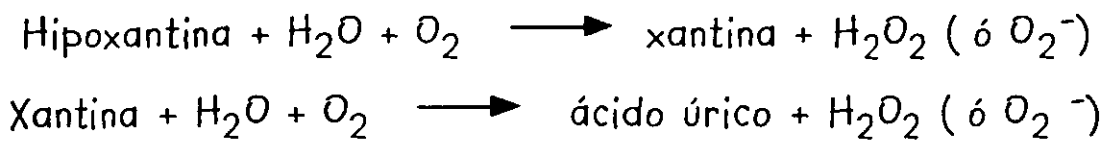
La urato oxidasa es una enzima peroxisomal que genera peróxido de hidrógeno durante la conversión de urato a alantoína



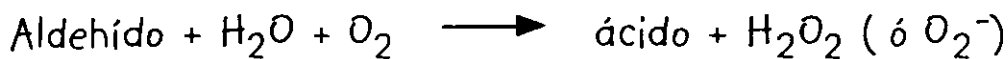
La D-amino oxidasa también es una enzima peroxisomal que genera peróxido de hidrógeno y cetoácidos



Otras enzimas como la poliamino oxidasa (Parchment, 1993), la lipoxigenasa (O'Donnell, y col., 1995), la glicolato oxidasa y la L-hidroxiácido oxidasa que también generan peróxido de hidrógeno. La xantina oxidasa y la aldehído oxidasa son flavoproteínas que contienen centros de fierro y molibdeno que pueden ciclar entre diferentes estados redox. El oxígeno molecular sirve como substrato oxidante para estas enzimas generándose así superóxido y peróxido de hidrógeno. En una reacción típica, la xantina oxidasa genera superóxido y peróxido de hidrógeno durante la conversión de hipoxantina a xantina y después a ácido úrico (Gramzinski y col., 1990). La proporción relativa de generación de H_2O_2 o O_2^- varía dependiendo del pH o la concentración de O_2 .



La xantina oxidasa tiene una amplia distribución dentro de la célula y recientemente se ha observado que se puede convertir de deshidrogenasa a oxidasa en condiciones de hipoxia. La aldehído oxidasa está presente en el citosol del hígado y tiene un mecanismo similar a la xantina oxidasa.



El aumento en las EOR generado por estas vías es mínimo. Mientras que la mayor fuente de producción de las EOR parece estar relacionado a la respiración en la mitocondria.

La mayoría de la reducción del oxígeno en las células ocurre en la vía de la citocromo oxidasa en la mitocondria. En esta reacción cuatro electrones son transferidos del citocromo c reducido a través de la citocromo oxidasa y de ésta al oxígeno molecular. En el sistema de

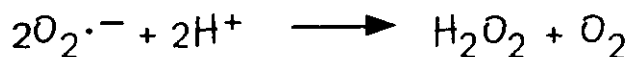
transporte de electrones en el retículo endoplásmico también ocurre la reducción del oxígeno. Durante esta vía se involucra la transferencia de un electrón al citocromo P450. Un segundo electrón es transferido a este complejo para producir oxígeno molecular. Sin embargo, en ambas vías, al haber varias oxidaciones parciales se puede producir superóxido. A partir del superóxido se puede generar el radical hidroperóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno en singulete.

Las EOR puede generarse también en reacciones no enzimáticas que involucran la autooxidación de componentes celulares por oxígeno molecular, tales como las quinonas, los tioles, la flavina, la hemoglobina y el catecol que son grupos químicamente susceptibles a la autooxidación (Cross y Jones, 1991). Algunos de estos compuestos como el catecol, o la epinefrina se encuentran en fluidos extracelulares e intracelulares y podrían contribuir a la producción de superóxido en ambos lugares.

El fierro juega un papel importante en iniciar y catalizar una gran variedad de reacciones que culminan con la producción de EOR. Los iones de fierro pueden participar en la transferencia de electrones al oxígeno molecular generando superóxido.



El superóxido puede generar a su vez peróxido de hidrógeno.



Una vez generado el peróxido de hidrógeno, la presencia del fierro promueve la formación de radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton.



A su vez el radical hidroxilo en solución es capaz de originar la peroxidación de lípidos causando daño en las membranas de la célula.



Las EOR se pueden producir en una gran variedad de sitios subcelulares por acción de distintas enzimas que incluyen a la mitocondria (ubiquinona y flavoproteínas), el retículo endoplásmico (citocromo P450), los peroxisomas (urato oxidasa, D- amino oxidasa), la membrana plasmática y fagosomas (NADPH oxidasa), la membrana nuclear y el citoplasma (xantina oxidasa, aldehído oxidasa y compuesto solubles). La cantidad de EOR producida por estos organelos podría variar dependiendo de la concentración de estas enzimas en diferentes tipos celulares, de la disponibilidad de substratos y cofactores.

Al producirse el radical hidroxilo, se genera un oxidante extremadamente poderoso, que es capaz de reaccionar a la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984) y por lo tanto solo actúa en un radio pequeño. El radical superóxido, es menos reactivo que el radical hidroxilo y es capaz de difundir una distancia más amplia. Por ello, se considera que el superóxido es potencialmente más dañino que el radical hidroxilo. También se ha propuesto que otros metabolitos como lípidos hidroxilados son buenos candidatos para actuar como segundos mensajeros ya que pueden reaccionar de una manera específica al mediar señales en receptores de la superficie de la célula (Jacobson 1996).

Cuando se genera una producción excesiva de EOR se genera un estado de estrés oxidativo. Este estado provoca la muerte celular a través del daño a diferentes macromoléculas de la célula como las proteínas, el ADN y los lípidos que conforman la membrana lipídica (Halliwell y Guttridge, 1989). Para prevenir este daño, las células han desarrollado un sistema complejo de defensa. Este incluye antioxidantes no enzimáticos como el glutatión y la tiorredoxina y antioxidantes enzimáticos como las superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas; así, el balance entre la producción y la degradación de EOR regula la concentración de éstas, manteniendo la homeostasis celular.

El glutatión es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, que tiene varias funciones dentro de la célula. Entre ellas, evita la formación

de enlaces disulfuro en el citosol y cataliza estas uniones en el retículo endoplásmico, actúa como co-substrato de diversas reacciones enzimáticas relacionadas con la detoxificación y resistencia a drogas y como antioxidante, propiedad conferida por el grupo tiol de la cisteína.

La tioredoxina participa en la detoxificación o en la reparación del daño por EOR. La tioredoxina, es una proteína pequeña con un sitio activo redox sensible. El sitio activo se caracteriza por tener la secuencia cisteína-glicina-prolina-cisteína. Las cisteínas permiten que la proteína pueda existir ya sea en la forma reducida (tioredoxina-(SH)₂) o de manera oxidada (tioredoxina-S₂). La tioredoxina oxidada es reducida generalmente por NADPH y la tioredoxina reductasa. La forma reducida participa en diversos procesos celulares ya sea como sustrato para enzimas reductoras ó como regulador de diversas enzimas y receptores (Holmgren, 1985). También se ha demostrado que la tioredoxina juega un papel importante en regular el ciclo celular en levadura (Müller, 1991) y *Xenopus* (Hartman y col., 1993). Al exponer blastocistos a la irradiación con rayos X o ultravioleta, condiciones que generan EOR, se bloquea la proliferación de las células de la masa celular interna, mientras que no se afectan las células del trofoectodermo (Mitsui y col., 1992). Este fenotipo es igual al que se observa en el ratón nulo de la tioredoxina (Yodoi y Uchiyama, 1992; Matsui y col 1996), por lo que se propone que la tioredoxina juega un papel esencial evitando que las células de la masa celular interna entren a un estado de estrés oxidativo y mueran a causa de éste.

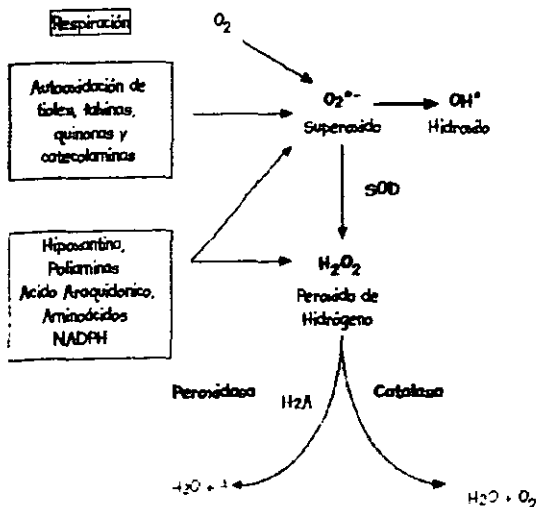


Figura 4. Eliminación de las EOR mediante vías enzimáticas.

La primera defensa en contra de las EOR en la vía enzimática es llevada a cabo por metaloenzimas denominadas superóxido dismutasas. Estas enzimas catalizan de manera eficaz y específica la conversión del superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (fig. 5).

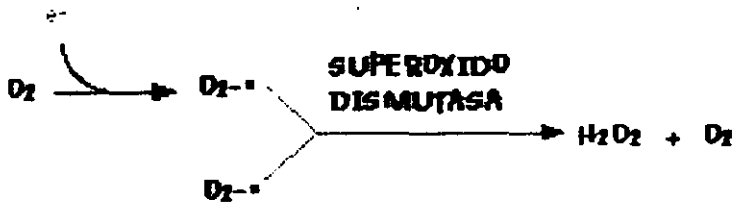


Figura 5. Actividad de la superóxido dismutasa, la cual cataliza la conversión de 2 radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y una molécula de oxígeno.

Se han descrito 2 tipos de superóxido dismutasas: las que en su sitio activo tienen cobre y zinc y se encuentran principalmente en el citosol y en el fluido extracelular en mamíferos. Las otras superóxido dismutasas pueden tener manganeso o hierro en su sitio activo y estas dos últimas poseen alta homología entre ellas.

La acumulación de peróxido se evita mediante la acción de catalasas y peroxidasas. La catalasa es una proteína compuesta de 4 subunidades iguales de 60 KDa, donde cada subunidad contiene un grupo hemo unido en el sitio activo. Esta enzima cataliza la descomposición de H_2O_2 a través de dos diferentes mecanismos: el catalítico y el peroxidativo (fig. 6). En el modo catalítico, dos moléculas de peróxido son convertidas a dos moléculas de agua más una molécula de O_2 , y en la forma peroxidativa, metabolitos tales como etanol, metanol, ácido fórmico y nitrito sirven como donadores electrónicos para la reducción de H_2O_2 (Singh, 1996). A diferencia de muchos otros organismos que poseen más de una sola catalasa, en mamíferos sólo se ha descrito una catalasa (Dickerman, 1968) que se localiza en peroxisomas y en la mitocondria (Radi y col., 1991).

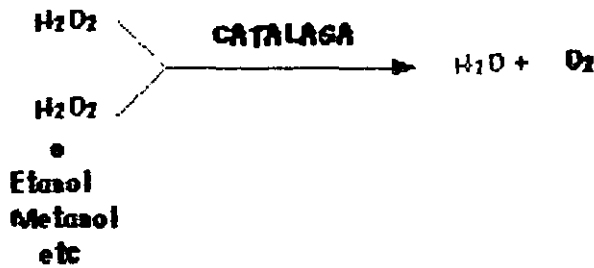


Figura 6. Actividad de catalasa, modo catalítico y peroxidativo

Las peroxidasas son capaces de detoxificar a la célula al eliminar el peróxido de hidrógeno a expensas de sustratos reducidos. A diferencia de las catalasas las peroxidasas son capaces de utilizar diferentes sustratos como por ejemplo alcoholes, fenoles, aminas, tioles, NADPH, etc. (fig. 7).

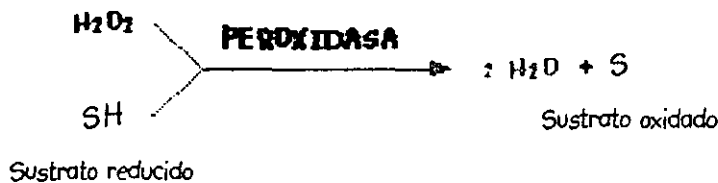


Figura 7. Actividad de peroxidasas, enzimas que catalizan la reacción en donde el peróxido de hidrógeno es reducido a agua utilizando un agente reductor (alcohol, tior, NADPH etc.)

En mamíferos existen varias peroxidasas: la familia de peroxidasas que poseen un grupo hemo en el sitio activo y conservan bastante homología entre ellas, son la yodoperoxidasa, la lactoperoxidasa y la mieloperoxidasa. La segunda familia es la de las glutatión peroxidasas que se caracterizan por carecer de grupo hemo, utilizar al glutatión como cofactor y tener una cisteína modificada como selenio-cisteína. Dentro de esta subfamilia existe una peroxidasa celular (GPXI), una peroxidasa que se expresa únicamente en el epitelio intestinal (GPX2), una extracelular (GPX3) y una peroxidasa de hidroxifosfolípidos (GPX4). También existe una glutatión peroxidasa que no contiene selenio la cual se caracteriza por encontrarse principalmente en sitios donde hubo un daño o herida. Recientemente se describió a la

tioredoxina peroxidasa que utiliza a la tioredoxina o algún intermediario con un grupo tiol para llevar a cabo su función de peroxidasa.

La actividad de las peroxidasas se regula con la concentración de peróxido de hidrogeno. Bajos niveles de peróxido de hidrógeno activan a la peroxidasa, mientras que al elevar la concentración de peróxido de hidrogeno ésta se inhibe de manera reversible. Estos sugiere que esta regulación podría tener importancia fisiológica (Chae y col. 1993).

Fase de Ejecución de la Apoptosis.

Estudios genéticos realizados en *Caenorhabditis elegans* permitieron identificar una docena de genes (*Ced*) involucrados en el programa de muerte celular y en el control de ésta (Ellis y Horvitz, 1986; Horvitz y Ellis 1982). La ejecución del programa de muerte ha sido de las fases más estudiadas y se han identificando genes esenciales para que se lleve a cabo encender la muerte como *Ced3* y *Ced4*. CED9 antagoniza los efectos de CED3 y CED4 y por lo tanto protege a las células de la apoptosis. Estudios genéticos situaron a CED4 en la cascada de señales entre CED9 y CED3, sugiriendo así que CED4 podría actuar como un adaptador entre el regulador CED9 y el efector CED3 (Shaham y Horvitz 1996).

-Las proteasas y la ejecución de la apoptosis

El producto del gen *Ced3* presenta similitudes funcionales y estructurales con la enzima interconvertidora de interleucina-1b (ICE). ICE es una cisteín proteasa de mamífero que corta a susubstrato en residuos de aspártico (Yuan y col., 1993). La sobreproducción de CED3 o de ICE en fibroblástos de ratón provoca que mueran por apoptosis. (Miura y col., 1993). Además inhibidores de ICE son capaces de evitar la muerte en neuronas de pollo desprovistas de factores de crecimiento (Gagliardini y col., 1994). ICE y CED3 son activadas al ser procesadas en un residuo de aspártico, por otra proteasa o por ellas mismas (Nicholson y Thornberry, 1997). En la actualidad se han descrito varios genes homólogos a *Ice*, los cuales conservan la región catalítica y son capaces de inducir apoptosis al

sobreexpresarlos en células en cultivo; a este grupo de proteínas se les ha denominado caspasas. Las caspasas actúan en el programa de muerte al cortar diferentes proteínas intracelulares, como por ejemplo proteínas de la lámina nuclear, del citoesqueleto, del retículo endoplásmico y del citosol.

El factor de fragmentación de DNA (DFF), encargado de la fragmentación y condensación del DNA asociada a la apoptosis en mamíferos, se activa mediante las caspasa 3. DFF está compuesto de dos subunidades: una nucleasa y un inhibidor de esta nucleasa. La caspasa 3 una vez activa, degrada al inhibidor liberándose así la nucleasa activa (Inohara y col., 1999). También se han identificado en mamíferos una familia de proteínas inductoras de la muerte celular las CIDE. Las CIDEs son proteínas pro-apoptóticas que inducen la fragmentación del DNA, la deformación de la membrana y la condensación del DNA en los cuerpos apoptóticos (Inohara y col., 1998). El inhibidor de la nucleasa también es capaz de inhibir a los miembros de la familia de CIDE y al ser degradado por la caspasa 3 permite que se activen las CIDEs (Inohara y col., 1998).

-BCL-2 y la muerte celular

La proteína CED9 es el homólogo en mamíferos de varios miembros de la familia de BCL2. Diversas observaciones refuerzan la idea de que BCL2 actúa de varias maneras para prevenir la apoptosis (Jacobson, 1996). Existen miembros de esta familia que inhiben la muerte celular como por ejemplo BCL2 o BCLX, mientras que existen otros miembros como BAX que promueven la muerte celular (Reed, 1997). Los miembros de la familia de Bcl-2 pueden actuar como homodímeros o heterodímeros, antagonizando o potenciando el efecto de cada uno. Así, la relación de activadores/inhibidores de la muerte celular puede determinar el destino final de la célula (Hockenbery 1995). Las proteínas de esta familia se encuentran localizadas en la membrana del núcleo, del retículo endoplásmico y de la mitocondria. En retículo endoplásmico, BCL2 está involucrado en mantener la homeostasis del calcio (He, y col., 1997; Lam y col., 1994),

mientras que en el núcleo podría modular el paso de proteínas (Ryan y col., 1994). BCL2 en la mitocondria podría regular la muerte por lo menos de tres maneras: regulando la permeabilidad de la membrana a moléculas pro-apoptóticas; anclando a la membrana mitocondrial proteínas pro-apoptóticas, y controlando el potencial redox.

Dos líneas separadas de evidencias sugieren que uno de los mecanismos de protección efectuado por BCL2 es evitar la salida de moléculas pro-apoptóticas de la mitocondria hacia el citosol. En el primer grupo de evidencias se ha observado que para que se activen las caspasas, el citocromo c tiene que ser translocado de la mitocondria al citosol (fig. 8) (Kluck y col., 1997; Susin y col., 1996 ; Yang y col., 1997). Recientemente se identificó en mamífero el equivalente a CED4, *factor activador de proteasa relacionado con apoptosis* (APAF1), el cual se requiere para la activación de la caspasa 3, dependiente de ATP (Zou y col., 1997). Cuando el citocromo c se une al complejo formado por APAF1 y la caspasa 3, éste se activa. APAF1 tiene actividad de ATPasa y es capaz de promover el que la caspasa se autoprocese (Chinnaiyan, 1997a). Al activarse el complejo APAF1/caspasa se promovería la ejecución del programa de muerte (fig. 8). Al sobreexpresar *Bcl2*, se ha observado que el citocromo c no se transloca y se evita la muerte.

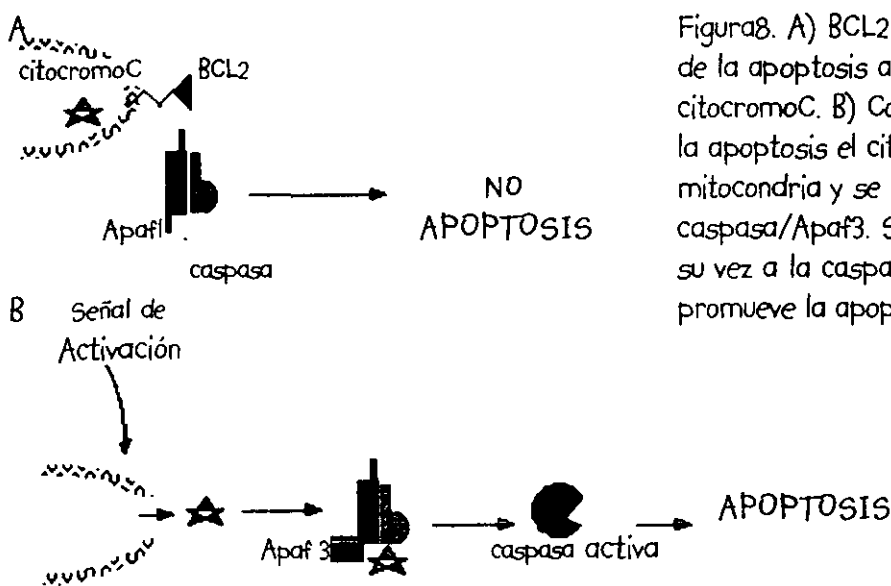


Figura8. A) BCL2 en la mitocondria protege de la apoptosis al evitar la salida del citocromo C. B) Con señales de activación de la apoptosis el citocromo C, sale de la mitocondria y se une al complejo de Apaf1/caspasa/Apaf3. Se activa Apaf1 y activa a su vez a la caspasa. La caspasa activa promueve la apoptosis.

Un segundo grupo de evidencias de que la función de BCL2 es el regular la translocación de moléculas de la mitocondria hacia el citosol, es el análisis de la estructura proteica de BCLX_L. BCLX_L asemeja a una toxina bacteriana que es capaz de formar canales sensibles a pH en la membrana celular (Muchmore y col., 1996). Por otro lado, tanto BCL2 como otros miembros de la familia de BCL2 son capaces de formar poros en membranas lipídicas. Todo esto sugiriendo que de esta manera se podría regular el potencial de la membrana mitocondrial (Minn y col., 1997; y Schendel y col., 1997).

Hay varias evidencias de que Bcl-2 actúa en una vía antioxidante para evitar la apoptosis; por ejemplo las mutantes de levadura que carecen de la SOD-CuZn pueden ser rescatadas con la expresión de *Bcl2* (Longo y col., 1997). La sobreexpresión de *Bcl2* suprime completamente la peroxidación de lípidos en cultivos de células T (Hockenbery y col., 1993). Se desconoce cómo es que BCL2 protege de las EOR; en ciertos sistemas BCL2 afecta la producción de EOR (Kane y col., 1993) mientras que en otros casos no afecta la producción de EOR, pero evita el daño a constituyentes de la célula (Hockenbery y col., 1993). También se ha propuesto que BCL2 sirve como prooxidante, induciendo así a una respuesta antioxidante (Steinman, 1995) ya que como se menciono anteriormente, las enzimas como las catalasas o las peroxidasas se activan a ciertas concentraciones de EOR. Por otra parte varios autores han estudiado el efecto de BCL2 en el potencial redox de la célula, midiendo tanto la actividad de enzimas antioxidantes como los niveles de glutatión. Se ha demostrado que Bcl-2 puede proteger a las células de la muerte celular al promover que el potencial redox de las células pase a un estado más reducido; así se observó que líneas celulares que sobreexpresan *Bcl2* tienen niveles más altos de glutatión que las líneas control (Ellerby y col., 1996). Por otra parte, al eliminar los grupos tioles de las células que sobreexpresan *Bcl2* se revierte la resistencia al daño causado por la radiación (Mirkovic y col., 1997). No obstante la información anterior, se desconoce como es que BCL2 actúa.

Fases de Fagocitosis y Degradación

En el proceso de fagocitosis se han identificado en *C. elegans* seis genes involucrados en la fagocitosis (*Ced1*, *Ced2*, *Ced5*, *Ced6*, *Ced7* y *Ced10*). De estos seis genes únicamente se ha hecho el análisis molecular de tres: *Ced5*, *Ced6* y *Ced7*. *Ced5* codifica para una proteína similar a la proteína DOCK180 de humano y a la proteína MBC de *Drosophila melanogaster* (Wu y Horvitz, 1998). Ambas proteínas se han implicado en la extensión de la superficie celular. Las mutantes en *Ced5* se encuentran afectadas en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y en la migración de las células germinales a las gónadas. Los resultados de Wu y Horvitz (1998) sugieren que CED5 actúa en la extensión de la superficie para fagocitar a los cuerpos apoptóticos. Por otro lado CED6 actúa en las células fagocíticas como molécula adaptadora, en la vía de transducción de señales que regula específicamente el reconocimiento y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Liu y Hengartner, 1998). *Ced7* tiene secuencia similar al transportador ABC1 en mamíferos (Luciani y Chimini, 1998). Luciani y Chimini (1998) demostraron que ABC1 se expresa en los macrófagos, en los sitios donde hay apoptosis. Al bloquear la actividad de ABC1, se inhibe la fagocitosis de las células apoptóticas. CED7 se encuentra en la membrana celular y al parecer actúa translocando moléculas que son capaces de mediar la adhesión entre las dos células (Wu y Horvitz, 1998 a).

Únicamente se ha descrito un gen involucrado en la degradación de los cuerpos apoptóticos fagocitados a este gen se la denominó *nucl* (*nucleasa I*). En mutantes en *nucl* en *C. elegans*, el DNA condensado se mantiene en los cuerpos apoptóticos de manera indefinida en las células fagocíticas. Aparentemente *nucl* codifica o controla la actividad de una nucleasa que además de actuar en la apoptosis actúa en otros procesos, debido a que las mutantes en *nucl* son incapaces de digerir las bacterias en su intestino (Metzstein y col., 1998).

El estrés oxidativo y la muerte celular

Cada vez es mayor la evidencia de que las EOR pueden actuar como segundos mensajeros en diferentes procesos celulares; por ejemplo pueden activar a factores transcripcionales como AP-1 y NF- κ B e inducir la expresión genética de genes blanco (Pinkus, y col., 1996). También existen varias evidencias de que las EOR son capaces de participar dentro del programa de muerte celular:

1) El agregar EORs o promover la producción de éstas o al eliminar de antioxidantes celulares, trae como resultado la apoptosis (Kane y col. 1993). Las dosis bajas de peróxido de hidrógeno (10 a 100 μ M), o la adición de peróxidos lipídicos son estímulos capaces de inducir la muerte celular programada (Lennon y col., 1991). Por el contrario, dosis mayores de peróxido de hidrógeno provocan la necrosis. También, el incrementar la presión parcial de oxígeno en cultivo de neuronas induce muerte por apoptosis (Enokido y Hatanaka, 1993).

Se ha demostrado recientemente que los niveles de glutatión intracelular son muy importantes para que se lleve a cabo de manera correcta el programa de muerte. Así, por ejemplo, se ha observado que la baja de los niveles de glutatión correlaciona con la apoptosis observada en células linfoides (Fernandez y Cotter, 1994 y Banki y col., 1996). La reducción del glutatión induce la muerte de neuronas dopaminérgicas *in vitro* y potencia la toxicidad de agentes químicos *in vivo* (Jenner y Olanow, 1996). La sobrevivencia de linfocitos en cultivo se prolonga cuando se eleva la concentración de glutatión, al agregar N-acetilcisteína al cultivo (Herzenberg y col., 1997).

2) La activación del programa de muerte celular por diversos estímulos como exposición a rayos U.V., radiación ionizante, agentes químicos como estaurosporina, la falta de soporte trófico, y la activación de los receptores de TNF y Fas, entre otros, provocan un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1990; Quillet-Mary y col., 1997). Este tipo de muerte puede ser

inhibida al agregar agentes antioxidantes. Un ejemplo de esto se observó en cultivos de neuronas donde al quitar el factor de crecimiento neuronal (NGF) se provocó la muerte por apoptosis. Este efecto se retrasa al inyectar la superóxido dismutasa (SOD) o sobreexpresarla desde un vector. Al retirar el NGF se presentó un pico de especies reactivas. Cuando la SOD se inyectó después de este pico de EOR, fué incapaz de proteger a las células de la muerte celular. También al agregar NGF al cultivo después del pico de especies reactivas no se pudo evitar la apoptosis. Estos resultados sugieren que la producción de EOR funciona como una señal temprana mediadora del proceso de apoptosis (Greenlund y col. 1995). Un ejemplo *in vivo*, en donde se ve la participación de las EOR, es el que se observa durante la metamorfosis de *Rana rugosa*. La regresión de la cola es un evento que involucra la apoptosis de varios tipos celulares y en donde se observó que la actividad de SODCuZn citosólica aumenta, mientras que la de catalasa disminuye, fenómeno que provoca un aumento drástico de H₂O₂. Cuando este último se añade exógenamente la regresión es mucho más rápida (Hanada y col. 1997).

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

En particular, el desarrollo de las extremidades en tetrápodos es un modelo clásico para el estudio de la muerte celular (Zakeri y col. 1994; Mori y col., 1995). Este proceso se ha observado en las zonas anterior, posterior, interna e interdigitales (Gilbert, 1994).

Las extremidades de ratón, se forman a partir de protuberancias que se proyectan a los costados de la pared lateral del cuerpo. En esta estructura, existen regiones que regulan el crecimiento, la diferenciación, la muerte y la formación de patrones en las extremidades. En la inducción de la formación de las extremidades participan varias señales, como el ácido retinóico (Stratford y col., 1996) y diferentes miembros de la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) entre otros (Crosley y Martin, 1995).

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 (Zwilling, 1972). En segundo lugar, presentan una regionalización conspicua, además de que se conocen gran parte de los patrones de expresión de diferentes genes tanto en espacio como en el tiempo, lo que permite correlacionar los procesos celulares con la expresión de genes específicos (Tabin, 1991). Finalmente, tienen un desarrollo *in vitro* comparable al desarrollo *in vivo* (Salas-Vidal 1998).

ANTECEDENTES

Trabajos previos han demostrado que el estrés oxidativo participa en el control de la muerte en diferentes tipos celulares. Sin embargo, trabajo realizado en el laboratorio (Salas- Vidal y col. 1998) mostró la primera evidencia a favor de que las EOR participan de manera natural en la fase de activación en el programa de muerte celular. Se probó el efecto de diferentes antioxidantes (fenol, dimetilsulfóxido) y se observó que éstos tratamientos evitaron tanto la muerte celular como la regresión del interdígito. Además al teñir extremidades de ratón con colorantes sensibles a cambios redox como el 5-6-carboxi-2',7'-diclorodihidro-fluorecein diacetato (DCDHF-DA), se observó que algunas células interdigitales presentan un estado de estrés oxidativo precisamente en las etapas en las que ocurre la muerte celular. Al sobrelapar las tinciones para muerte y estrés oxidativo se observó que pocas eran las células que presentaban doble tinción, lo cual sugiere que la generación de especies reactivas y la apoptosis ocurren en etapas del desarrollo diferentes (fig. 9).

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 (Zwilling, 1972). En segundo lugar, presentan una regionalización conspicua, además de que se conocen gran parte de los patrones de expresión de diferentes genes tanto en espacio como en el tiempo, lo que permite correlacionar los procesos celulares con la expresión de genes específicos (Tabin, 1991). Finalmente, tienen un desarrollo *in vitro* comparable al desarrollo *in vivo* (Salas-Vidal 1998).

ANTECEDENTES

Trabajos previos han demostrado que el estrés oxidativo participa en el control de la muerte en diferentes tipos celulares. Sin embargo, trabajo realizado en el laboratorio (Salas- Vidal y col. 1998) mostró la primera evidencia a favor de que las EOR participan de manera natural en la fase de activación en el programa de muerte celular. Se probó el efecto de diferentes antioxidantes (fenol, dimetilsulfóxido) y se observó que éstos tratamientos evitaron tanto la muerte celular como la regresión del interdígito. Además al teñir extremidades de ratón con colorantes sensibles a cambios redox como el 5-6-carboxi-2',7'-diclorodihidro-fluorecein diacetato (DCDHF-DA), se observó que algunas células interdigitales presentan un estado de estrés oxidativo precisamente en las etapas en las que ocurre la muerte celular. Al sobrelapar las tinciones para muerte y estrés oxidativo se observó que pocas eran las células que presentaban doble tinción, lo cual sugiere que la generación de especies reactivas y la apoptosis ocurren en etapas del desarrollo diferentes (fig. 9).

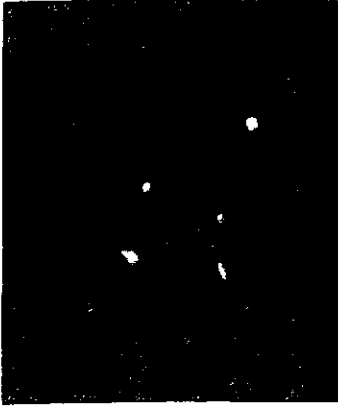


Figura 9. Sobrelapamiento de la tinción para detectar la muerte celular con anaranjado de acridina (rojo) y detección de EOR con DCFDH-DA (verde); las células con ambas tinciones se muestran en color amarillo.

Para determinar si las EOR juegan un papel general durante el desarrollo embrionario, se tiñeron con colorantes sensibles al estado redox diferentes estructuras donde se conoce que ocurre normalmente muerte celular. Así, se observó que en la línea de fusión del esternón, a lo largo de la línea de fusión del paladar, en la vesícula ótica y en el ojo en desarrollo, hay una tinción EOR en las mismas regiones de muerte. Estos resultados sugieren que la participación de las EOR en el proceso de muerte celular es un fenómeno general durante el desarrollo embrionario del ratón (Salas-Vidal y col., 1998). Los resultados de este trabajo mostraron que tanto las EOR como la muerte celular se presenta en zonas discretas. Sin embargo, en las zonas adyacentes a estos sitios no se observa un aumento en las EOR ni en la muerte celular. Con la finalidad de determinar cómo es que las células adyacentes a estas regiones discretas evitan el aumento en las EOR, en el laboratorio se realizó un trabajo preliminar donde se mostraba la posible participación de enzimas encargadas de eliminar las EOR tales como las peroxidasas. Por otra parte la expresión de BCL2 en los miembros podría sugerir que éste juega un papel relacionado para evitar el estrés oxidativo, ya que se expresa en las zonas de los dígitos y no se expresa en los interdígitos (Veis Novack y Korsmeyer, 1994). Aunque se ha propuesto que BCL2 puede actuar como antioxidante, no se ha demostrado como es que lleva a cabo esta función. Se seleccionó este modelo para estudiar si los dígitos poseen alguna enzima relacionada con la eliminación de las EOR, evitando así la muerte celular, así como si ésta enzima tiene alguna correlación con la expresión de BCL2.

HIPÓTESIS GENERAL DEL PROYECTO

El metabolismo de las EOR juega un papel importante en la regulación la muerte celular que ocurre durante el desarrollo embrionario de ratón.

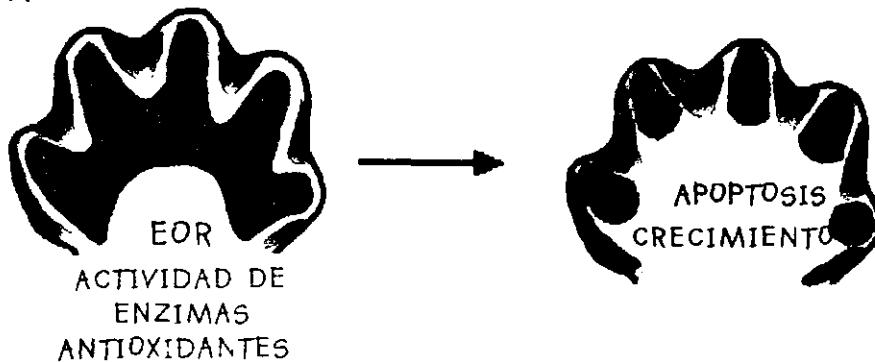


Figura 10. Esquema que ilustra la hipótesis del proyecto. Eventos posibles que participan en el control de la muerte celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente proyecto es estudiar el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno para el control de la muerte celular programada.

OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar la actividad enzimática *in situ* de las peroxidasas durante el desarrollo del miembro.

b) Identificar la peroxidasa responsable de la actividad enzimática utilizando:

- Inhibidores específicos de peroxidasas
- RT-PCR.
- Hibridaciones en el miembro completo.

c) Expresar Bcl-2 en el interdígito en ratones transgénicos, con la finalidad de evaluar el efecto en la muerte al expresar Bcl-2 en el interdígito y estudiar si la expresión de Bcl-2 es capaz de promover la actividad de enzimas antioxidantes en el interdígito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de la cepa CDI, se mantuvieron en un cuarto con fotoperíodo con 10 h de luz y 14 de oscuridad, recibiendo agua y alimento *ad libitum*. Para las cruces se puso a una hembra y un macho por caja durante la noche, al siguiente día en la mañana se revisaron las hembras y se seleccionaron aquellas que presentaran el tapón vaginal característico; ese día se tomó como el día 0.5 post coito (dpc).

Disección de extremidades de embriones de ratón

Las ratonas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los dpc requeridos. Los úteros de las hembras fueron disectados, y los embriones fueron puestos en medio L15 (Microlab. México) o bien en solución salina de fosfatos (PBS). Las extremidades fueron removidas de los embriones bajo un microscopio estereoscópico y clasificados en base a su morfología de acuerdo a la tabla de desarrollo de Wanek (1989).

Cultivo *in vitro* de extremidades de embrión de ratón.

Se utilizó el protocolo de cultivo *in vitro* modificado de Taketo y Koide (1981) para el cultivo organotípico de extremidades de ratón.

Las extremidades embrionarias seleccionadas fueron cultivadas sobre filtros Durapore (Millipore) con un diámetro de poro de 0.45 μm flotando sobre medio McCoy 5a modificado (Microlab) sin suero, suplementado con GPS (GIBCO, U.S.A.). Dependiendo del procedimiento experimental, a este medio se le agregó de la solución madre de mercapto succinato 1 M (ácido mercapto succínico SIGMA, U. S. A) para obtener las concentraciones deseadas (0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 50 mM, 100mM, 150mM y 200mM). La solución madre de mercapto succinato 1 M fue agregada previamente a los cultivos, los cuales se mantuvieron por diferentes intervalos de tiempo, 30 min., 6 horas y 24 horas en incubadoras con humedad saturada, CO₂ al 5% y aire al 95% a una temperatura de 37°C.

Análisis de la muerte celular programada

Se utilizó la tinción con el fluorógeno anaranjado de acridina (AA, SIGMA) para detectar las células en proceso de muerte por la técnica descrita previamente por Abrahams y col (1993). Las extremidades a analizar fueron lavadas en PBS y posteriormente teñidas en una solución de AA a una concentración de 5 µg/ml en PBS durante 30 minutos a 37°C. Se observaron en microscopía de fluorescencia con un filtro para rodamina, para detectar regiones de muerte; para estudios más detallados las muestras fueron analizadas con microscopía confocal (ver más abajo).

Detección de actividad de peroxidasa *in situ*

Para la detección de la actividad de peroxidasa *in situ* las extremidades de embrión de ratón de diferentes *dpc* fueron incubados con DCDHF-DA (5-6-carboxi-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato) el cual da un producto fluorogénico, el DCF (dicloro fluoresceína), al reaccionar con el peróxido de hidrógeno en una reacción mediada por la actividad de peroxidasa (Black y Brandt, 1974)(figura II).

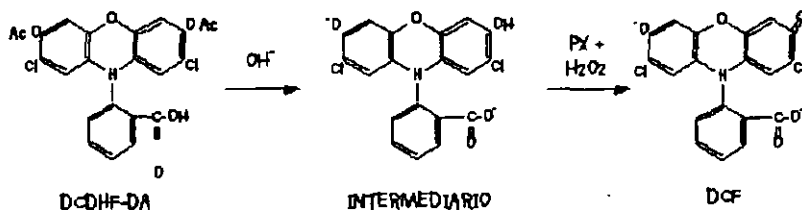


Figura II. Activación y oxidación del diacetilclorofluoresceína a diclorofluoresceína (DCF). Modificado de Black y Brandt 1974.

Este fluorógeno se utilizó a una concentración final de 1µg/ ml en PBS. También se agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 40mM. Se incubó durante 45 minutos en las mismas condiciones que en el cultivo de tejidos.

Microscopia confocal

Las extremidades del ratón teñidas con los colorantes fluorogénicos, fueron observados en un sistema de microscopía confocal por barrido con rayo láser, marca Biorad, modelo MRC-600, equipado con un láser de criptón/argón, acoplado a microscopio Axioscope (Zeiss), con objetivos plan-neofluar 5X. Los tejidos teñidos con AA o con DCDHF-DA fueron excitados con luz azul (488 nm). Se utilizó el filtro de alta sensibilidad rojo (RHS) para la detección de la señal de AA y un filtro de alta sensibilidad al azul (BHS) y para la detección de DCF. Se obtuvieron series de imágenes de cortes ópticos a intervalos de 15µm en el eje Z.

Estrategia para la construcción RARβ2-bcl-2-IRES-BFP

Para expresar *Bcl2* en los interdigitos se utilizó el promotor del receptor de ácido retinóico β 2 (RARβ2). Para identificar la región donde se expresa *Bcl2* se escogió la proteína azul fluorescente (BFP). Para que la BFP se exprese bajo el mismo promotor se utiliza al IRES (*internal ribosome entry site*). Esta secuencia es reconocida por los ribosomas y permite que continúe la transcripción del ADN bajo el mismo promotor y posteriormente cuando el ARN mensajero se traduce se producen dos proteínas en este caso BCL2 y la BFP; así al identificar la fluorescencia de la BFP sabremos dónde se está expresando *Bcl2*.

Para realizar la construcción RAR-β2-*Bcl2*-IRES-BFP se utilizó un fragmento flanqueado por XbaI que contiene 3.8Kb de la región 5' del mensajero de RAR-β2, este se subclonó en el sitio XbaI del plásmido pKs-*Bcl2* (col-2) quedando el fragmento de 3.8 Kb en la región 5' de *Bcl2*. Posteriormente, se obtuvo con NotI y ClaI el fragmento de 4.8Kb que contiene el promotor RARβ2 y *Bcl2*. Del plásmido pKs-IRES-BFP se obtuvo un fragmento ClaI-NotI de 1.4 Kb, que comprende al IRES a la BFP y el poliA; ambos fragmentos se subclonaron en el sitio NotI en pKs. Posteriormente, se digirió el plásmido pKs RARβ2-*bcl2*-IRES-BFP-pA con NotI para obtener un fragmento final de 6.2 kb.

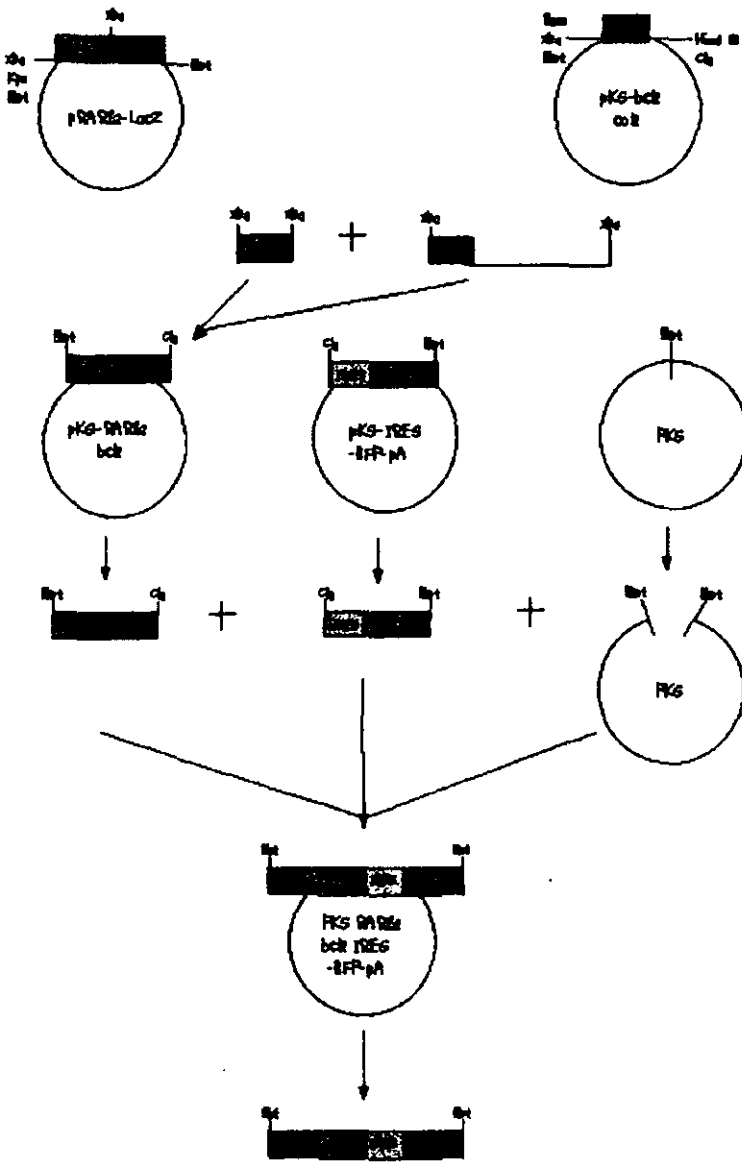


Figura 12. Estrategia de clonación para obtener la construcción RAR-β2-bcl2-IRES-BFP-pA.

Purificación de fragmentos de ácido deoxirribonucleico (DNA).

Con la enzima apropiada se digirió durante 1 hora a 37°C el DNA de interés. En un gel de agarosa de bajo punto de fusión en TAE IX, se separaron los fragmentos de DNA; se utilizaron concentraciones de agarosa que permitiera la resolución adecuada:

Para un fragmento de :	Concentración de agarosa
30 - 1 Kb	0.5 %
12 - 0.8 Kb	0.7 %
10 - 0.5 Kb	1.0 %

Para un fragmento de :	Concentración de agarosa
7 - 0.4 Kb	1.2 %
3- 0.2 Kb	1.5 %

Observando bajo la luz UV se cortó la banda de interés y se siguió el siguiente protocolo:

Se agregaron 100 μ l de agua estéril a la banda cortada, durante 15 min. se incubó a 65°C. Una vez disuelta la agarosa se agregó un volumen igual de fenol y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Después de centrifugar durante 15 min a 12000 rpm se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó un volumen de fenol:cloroformo 1:1 v/v y se repitió agregando un volumen de cloroformo. Al sobrenadante se le agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 3 volúmenes de etanol al 100%. Después de 2 h a -20°C se centrifugó durante 30 min a 12000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%. Una vez seca la pastilla se resuspendió en agua bidestilada y estéril.

Preparación de células competentes para electroporar

En 10 ml de medio LB se puso a crecer la cepa de interés durante 10 horas. Después con los 10 ml de precultivo se inoculó un litro de LB y se incubó aproximadamente de 3 a 4 horas a 200 rpm a 37°C hasta obtener una lectura de 0.9- 0.97 O.D. a 595. Se mantuvieron en hielo durante 30 min. Se centrifugó 3 veces durante 10 min a 4°C. Las pastillas se resuspendieron en glicerol frío al 10% las 2 primeras ocasiones y la tercera se resuspendió en 2 ml de medio GYT frío más 2 ml de glicerol al 10%. Se hicieron alícuotas de 50 μ l y se guardaron a -70°C.

Electroporación de células competentes

Una vez obtenido el DNA con la construcción de interés se electroporaron células DH5 α y se siguió el protocolo siguiente:

A las células competentes descongeladas se agregaron de 50 a 100 ng de DNA manteniendo el volúmen a 5 μ l máximo, al mismo tiempo se prepararon los tubos con medio SOB. Las células se pasaron a una cubeta (Gene pulser/*E.coli* Pulser Cuvette, Bio-Rad) y se dio un pulso en el electroporador (Gene pulser II, Bio-Rad) con las siguientes condiciones 25mF, 200W, 2.5kv y se agregó inmediatamente el medio SOB. Se incubó durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se plateó en medio LB sólido con antibiótico.

Después de aproximadamente 18 h a 37°C se seleccionaron colonias y se purificó DNA para detectar aquellas colonias que tuvieran la construcción incorporada.

Purificación de DNA a Baja Escala (Mini prep)

Se cultivaron cada una de las colonias de interés de 6 a 8 h a 37°C en 2 ml de medio LB con antibiótico. Se tomó 1.5 ml del cultivo de cada uno de los cultivos y se centrifugó 30 segundos a 12000 rpm. A la pastilla se le añadieron 100 μ l de solución P1 fría mas RNAsa y se agitó hasta que se resuspendió la pastilla. A esto se añadieron 200 μ l de la solución P2 y se mezcló. Al final se agregaron 150 μ l de la solución P3 fría y se dejó en hielo durante 5 min. Se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm a 4°C y se tomó el sobrenadante. Se hicieron 2 extracciones fenol:cloroformo (1:1 v/v) y una extracción con cloroformo. Se tomó la fase acuosa y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar durante 1 h a -20°C. Para obtener la pastilla de DNA se centrifugó durante 15 min a 4°C a 12000 rpm. Se lavó dos veces con etanol al 70%. Una vez seco se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Para seleccionar la colonia que posee la construcción de interés se trato el DNA durante 1 h a 37°C con la enzima que permitió observar un

patrón característico de la construcción en particular. Una vez hecha la digestión se analizó en un gel de agarosa en TAE I X.

Purificación plásmido gran escala

En 3 ml de medio LB con antibiótico se inoculó con una colonia y se dejó en agitación durante aproximadamente 18 h. Este precultivo se pasó a un matraz con 150 ml de medio LB y se dejó por 8 h más en agitación.

El cultivo se centrifugó a 5000 rpm 6 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 5 ml de la solución P1 frío con 200µl de RNAsa (10 mg /ml). Una vez disuelta la pastilla se añadieron 5 ml de solución P2, se mezcló suavemente y se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 5 ml de solución P3 fría mezclando suavemente y se incubó durante 20 min en hielo. Se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante filtrando por una gasa. Durante 10 min a temperatura ambiente se dejó precipitar con 0.6 volúmenes de isopropanol. Finalmente se resuspendió en 0.5 ml de agua bidestilada estéril. El sobrenadante se extrajo con fenol, fenol:cloroformo (1:1 v/v) y cloroformo. Al sobrenadante se añadieron 0.2 volúmenes de NaCl 5 M y 0.33 volúmenes de PEG 30 % y se dejó incubar por 2 h a - 20°C. Para obtener una pastilla se centrifugó durante 20 min a 9000 rpm a 4°C, se resuspendió en 500 µl de agua bidestilada y estéril y se extrajo el restante del PEG con un volumen de cloroformo.

Para precipitar el DNA se agregó al sobrenadante 1 ml de etanol un décimo del volumen de acetato de sodio 3 M y se incubó por 12 h a -20°C. Se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min. a 4°C para obtener una pastilla compacta. La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70 %. Una vez seca se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Purificación de ácido ribonucleico (RNA)

Se tomaron 100 mg del tejido para obtener RNA total y se congeló con nitrógeno líquido; una vez congelado se pulverizó con ayuda de un

mortero. Posteriormente se resuspendió el tejido en un volumen 10 veces mayor de solución desnaturalizante y se homogenizó suavemente. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de solución desnaturalizante empleada y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se volvió a incubar durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 15 min. a 12000 g a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 500µl de isopropanol (por cada ml de solución desnaturalizante utilizada). Después de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 12000 g durante 10 min. a 4°C. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 75% para eliminar todas las sales restantes. Y finalmente la pastilla de RNA una vez seca se resuspendió en agua con DEPC.

Gel para RNA

Se prepara un gel al 1% de agarosa en solución MOPS 1 X, una vez fría la agarosa se agregó formaldehído para tener una concentración final al 5% .

Tratamiento de las muestras de RNA

A 3 µl de RNA se le agregaron 12 µl de la solución de cargado y se incubó por 10 minutos a 65°C; inmediatamente se pasaron a 4°C. Antes de cargar se agregaron 2 ml de la solución de azul de bromofenol y xilencianol.

Preparación de cDNA a partir de RNA

Se calentó 1 µg de cada una de las muestras a 65°C durante 5 minutos y se añadieron 29 µl de buffer de la reverse transcriptasa (solución A). Se incubó a 37 °C por una hora.

Amplificación de transcritos por PCR (Polymerase Chain Reaction)

A 3 µl de cDNA se le agregó 5 µl de Buffer de polimerasa (10X), 2µl de dNTP, 1 µl de Taq polimerasa y 3 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos.

Oligonucleótidos para la glutatión peroxidasa 1 de ratón.

5' ACA CCG CTT ACT TTC TCC TCT 3'

3' TCC TCT TAC CGT TCT TAC TTC 5'

Se obtiene un fragmento de 185 pares de bases. Alguno de los sitios únicos se muestran en la figura 13.



Figura 13. Mapa del fragmento esperado de la GPXI 1, se muestran los sitios de restricción únicos, en rojo se muestra la enzima que se utilizó para digerir el fragmento.

Oligonucleótidos para detectar específicamente la glutatión peroxidasa 3 de ratón.

5' CAT TTG GCT TGG TCA TTC TGG 3'

3' CTT GCC CCT CTT TCT CGT CTT 5'

Se obtiene con estos oligos un producto de 169 pares de bases. La figura 13 muestra los sitios únicos de corte.



Figura 14. Fragmento esperado de la amplificación de la GPX3, se muestran los sitios únicos y en rojo el sitio que se utilizó para cortar el fragmento obtenido.

Oligonucleótidos específicos para detectar la glutatión peroxidasa 4

5' GCA ATG AGG CAA AAC TGA 3'

3' GGA CGG CAC GAT AGA GAT 5'

Con estos oligos se obtiene un fragmento de 382 pares de bases, que tiene los sitios de restricción que se muestran en la figura 15.

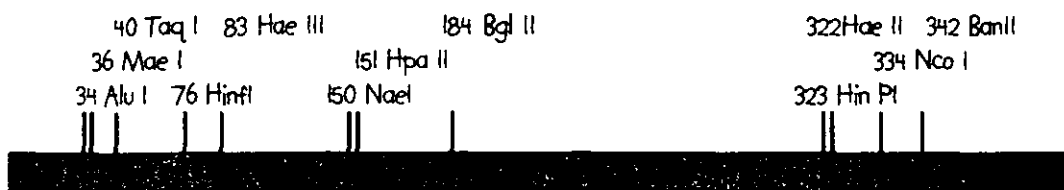


Figura 15. Diagrama del fragmento esperado de la GPX4, se muestran los sitios únicos y en rojo la enzima que se utilizo para digerir el fragmento obtenido.

Se utilizaron los sitios HinfI, Taq I y Bgl II (rojo fig 13, 14 y 15) para digerir los productos de PCR de la GPX1, GPX3 y GPX4 respectivamente con la finalidad de corroborar que aquéllos productos amplificados, además de corresponder al tamaño esperado, tienen los sitios de restricción específicos para cada uno de los productos.

Se utilizaron 30 ciclos para cada peroxidasa con las siguientes características:

Para la glutatión peroxidasa celular (GPX1)

Desnaturalización a 94°C, 30 segundos

Apareamiento a 52°C, 30 segundos

Extensión a 72°C, 45 segundos

Para la glutatión peroxidasa extracelular (GPX3)

Desnaturalización a 94°C, 30 segundos

Apareamiento a 55°C, 30 segundos

Extensión a 72°C, 45 segundos

Para la glutatión peroxidasa de fosfolípidos (GPX4)

Desnaturalización a 94°C, 30 segundos

Apareamiento a 54°C, 30 segundos

Extensión a 72°C, 45 segundos

Para el control (HPRT) se utilizaron las mismas condiciones utilizadas para las diferentes peroxidasas.

Con las mismas condiciones se amplificó con Pvu polimerasa obteniendo el producto de PCR con sitios romos. Este producto se subclonó en pKS en Eco RV.

Hibridación *in situ* de miembros enteros

La disección de los miembros se realizó como se describió anteriormente y se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4%. Se fijaron los miembros durante aproximadamente 11 horas a 4°C. Se lavaron dos veces durante 5 min a 4 °C con PBT. Después se deshidrataron con metanol (25%, 50% y 75%) en PBT durante 5 minutos a temperatura ambiente, se realizó un lavado de 5 minutos en metanol al 100% y se guardaron a -20°C en metanol hasta que se realizó la hibridación.

Preparación de la sonda:

A temperatura ambiente se realizó la siguiente mezcla:

- 10 µl de agua destilada
- 4 µl de solución de transcripción 5 X
- 2 µl de DTT 0.1 M
- 2 µl de la mezcla de nucleótidos
- 1 µg de plásmido lineal
- 0.5 µl de RNasin (100 u/µl)
- T3 RNA polimerasa (10 u/µl)

Se incubó durante 2 h a 37°C. Para precipitar se agregaron 100 µl de TE, 10 µl de cloruro de litio 4M y 300 µl de etanol absoluto, se dejó a -20°C durante media hora. Se centrifugó por 10 min y se lavó la pastilla con etanol al 70% y se dejó secar. Una vez seca la pastilla se disolvió en TE para obtener una concentración final de 0.1 µg/µl.

Se tomaron 5 µl de cada una de las muestras para analizarlas en gel. El gel corrido se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó con SSC 2X y se fijó mediante *cross linking*. Posteriormente se lavó en la solución DIG 1 por 15 minutos. Después se bloqueó durante 30 minutos en agitación con la solución de bloqueó (Boehringer) al 0.5 %. Durante 30 minutos se colocó en la solución con el anticuerpo anti DIG (DIG 2). Se lavó dos veces el anticuerpo con DIG 1 y se coloreó con DIG 3 mas NBT y BCPI.

Hibridación

Se rehidrataron con tratamientos de metanol en PBT (75%, 50% y 25%) durante 5 minutos, después se lavó dos veces con PBT por 5 minutos. Se trataron con PBT-H₂O₂ 6 % (v/v) durante 1 hora. Se lavaron 3 veces con PBT durante 5 minutos cada una. Se trató con proteinasa K durante 7 minutos, se lavó con glicina (2mg/ml) en PBT y con 2 lavados de PBT durante 5 minutos. Se volvió a fijar con glutaraldehído/paraformaldehído 0.2%/4% y Tween al 0.01% durante 20 minutos. Se lavaron con PBT durante 5 minutos. Se incubaron a 70°C durante 1 hora en la solución de prehibridación. Y se dejaron por 12 horas a 70°C en la solución de prehibridación con 10µl de la sonda marcada.

Se lavaron 2 veces durante 30 minutos a 70°C con la solución 1. Después se lavaron con una solución 1:1 (v/v) de la solución 1 y la solución 2 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 4 veces con la solución 2 por 5 minutos a temperatura ambiente y un lavado de 5 minutos a temperatura ambiente con la solución 3 y 2 lavados más a 65°C con la solución 3. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBST.

Los miembros se bloquearon con suero de borrego al 10 % en TBST, después de 2 ó 3 horas se quitó la solución y se agregó el anticuerpo y se dejó durante 14 h a 4°C. Se lavaron con TBST 3 veces durante 5 minutos y cuatro veces más durante 1 hora, finalmente se dejó durante 14 h en TBST.

Para revelar el anticuerpo se lavó 3 veces con NTMT durante 10 minutos. Se incubaron posteriormente durante 20 minutos en agitación y cubierto para evitar la luz con NBT (3.5µl/ml) y BCIP (3.5 µl/ml). Una vez que se observa la señal (5 horas aproximadamente) se lavó dos veces con PBT por 15 minutos, una vez con glicerol 50% en PBT y se guardaron en glicerol 80% en PBT. Se tomaron las fotografías en un microscopio estereoscópico con un objetivo de 5X.

Medios y soluciones

- Agua con dietilpircarbonato (DEPC).

Agregar un ml de DEPC a un litro de agua destilada estéril. Esterilizar y guardar a temperatura ambiente.

- Anticuerpo anti-DIG.

A 500 μ l de TBST se agregaron 3 mg de polvo de embrión se dejó disolver durante 30 min a 70°C en agitación. Una vez transcurrido este tiempo se enfrió en hielo y se agregaron 5 μ l de suero de borrego y 1 μ l de anticuerpo anti-DIG dejando disolver por 1 hora a 4°C. Se centrifugó 5 segundos para obtener el sobrenadante que se diluyó con 2 ml de TBST/suero 1%.

- Buffer Tris-acetato (TAE) 50 X

242 gr. tris base

57.1 ml. ácido acético glacial

100 ml. EDTA 2H₂O 0.5 M pH 8

Aforar a 1 lt con agua destilada

- DIG 1

Tris 100mM pH 7.5 y NaCl 150 mM

- DIG 2

Se disolvió 1 μ l de anticuerpo anti-DIG en 5 ml de DIG 1

- DIG 3

Tris 100 mM pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

•GPS

glutamina 2mM, penicilina G de Sodio 200UI/ml y estreptomicina 200mg/ml

•GYT

Glicerol 10%, extracto de levadura 0.125% y triptona 0.25%

•LB

Bacto-Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% Se disuelve en agua y esteriliza una vez frío se agrega carbecina a una concentración final de 10mg/ml.

•Mercapto succinato 1M

Ácido mercaptosuccínico 1M, pH 7 con NaOH 10N

•Mg 2 M

1M MgCl₂ y 1M MgSO₄

•MOPS 10X

20.93 g MOPS, 2.05 g Acetato de sodio y 10 ml de EDTA 0.5 M

Agregar a 400 ml de agua DEPC una vez disuelto ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio 1N. Aforar a 500 ml con agua DEPC.

•NTMT

NaCl 100mM, Tris-HCl 100mM pH 9.5, MgCl₂ 50 mM, Tween-20 0.1% y levamisol 2mM.

•Nucleótidos para preparar la sonda de RNA

GTP 10 mM, ATP 10 mM, CTP 10 mM, UTP 6.5 mM y UTP digoxigenina 3.5 mM

- P1
Tris 50 mM y EDTA 10 mM pH 8
- P2
NaOH 0.2 M y SDS 1 %. Esta solución se preparó cada vez que se utilizó.
- P3
acetato de K 3 M . Se ajustó el pH con ácido acético a 5.5.
- Paraformaldehído al 4 %
Para 100 ml de paraformaldehído se utilizaron 4 g de paraformaldehído. Se preparó en un matraz de 500 ml y se agregaron 86 ml de agua bidestilada se calentó hasta llegar a 70°C y se agregaron de 2 a 3 gotas de NaOH 5M hasta obtener una solución transparente. Una vez fría la solución se le agregaron 10 ml de PBS-DEPC 10 X y se aforó con agua a 100 ml finales los cuales se alicuotaron en alícuotas de 5 ml y se guardaron a -20°C.
- PBS
KH₂PO₄ 0.02%, Na₂HPO₄ 0.115%, NaCl 0.8 % y KCl 0.02 % pH 7.5 en agua estéril
- PBT
PBS y Tween-20 0.1%.
- Proteínasa K
La proteínasa K se disolvió a una concentración final de 10µg/ml en PBT.
- S0B
Se agregó al momento de usar al medio S0C 1/100 de Mg 2M y 1/100 de glucosa 2M.

- SOC

Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10mM y KCl 2.5mM.

- Solución 1

Formamida 50%. SSC 5X pH 4.5 y SDS 1%

- Solución 2

NaCl 0.5M, Tris-HCl 10mM pH7.5 Tween-20 10%

- Solución 3

Formamida 50%, SSC 2X pH 4.5.

- Solución A

6 µl de Buffer de transcriptasa reversa (5X)

3 µl de dNTP

3 µl de DTT (100 mM)

1.5µl de oligo dT primer (1.5 µg/µl)

0.5 µl de Reverso transcriptasa

ajustar con agua destilada estéril a un volúmen final de 29 µl.

- Solución coloreadora

Por cada ml de DIG 3 se agregaron 3.37 µl de NBT y 3.5 µl de BCPI.

- Solución de cargado para RNA

600 ml formamida, 179 ml formaldehído, 100 ml MOPS 10X, 8.3 ml de bromuro de etidio (10mg/ml) y 113 ml de agua con DEPC

- Solución desnaturalizante

tiocianato de guanidina 2 M, citrato de sodio 12.5 mM, β-mercapto etanol 50 mM, acetato de sodio 100 mM, sarcosil 0.25 %, fenol saturado con agua 50 %. Agregar cada uno de los reactivos y guardar a temperatura

ambiente. Al momento de usar agregar el β -mercaptoetanol por cada mililitro de solución desnaturizante.

- Solución de prehibridación

Formamida 50%, SSC 5X pH5, RNA de levadura 50 μ g/ml, SDS 1% y heparina 50 μ g/ml

- SSC 20X

NaCl 175.3g y citrato de sodio 88.2g , se ajustó el pH a 7 con NaOH (10N) y se aforó a un litro con agua.

- TE

Tris 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM pH 7.5

- TBST 10X

8 g NaCl, 0.2g KCl, 25 ml de Tris-HCl 1 M ph 7.5, 10 ml de Tween-20 en 100 ml de agua bidestilada estéril. Se autoclaveó.

Para utilizar se diluyó a 1X y se agregó levamisol a una concentración final de 2 mM.

RESULTADOS

Desarrollo de las extremidades de ratón

En el presente trabajo se utilizó la tabla de Wanek y col. (1989) debido a que se basa exclusivamente en la morfología de las extremidades vivas sin ningún tratamiento previo. En este esquema las etapas son fácilmente distinguibles, la tabla incluye desde los 9 d.p.c. hasta los 5 días postnatales. En trabajo, realizado previamente en el laboratorio (Salas-Vidal, 1998), se mostró que la muerte interdigital comienza en los estadios 9 ó 10 temprano por lo cual se utilizaron miembros del estadio 9 para los experimentos realizados en el presente trabajo. Solamente se utilizaron extremidades anteriores debido a que las posteriores difieren ligeramente en el desarrollo, lo que podría causar variabilidad en los resultados.

En el presente proyecto se adaptó un sistema de cultivo organotípico (Taketo y Koide, 1981). Se realizaron los experimentos *in vitro* ya que esto permite controlar de manera estricta el que las extremidades que se utilizan sean de la misma etapa así como las concentraciones de los fármacos utilizados.

Detección de actividad enzimática *in situ*

Se ha descrito previamente que con el fluorógeno 2',7'-diclorofluoresceína diacetato es posible detectar tanto la actividad de peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (Black y Brandt, 1974) como peróxido de hidrógeno en presencia de fierro (LeBel y col., 1992). Se utilizó esta técnica de tinción para detectar la actividad de peroxidasa en los miembros del ratón. Con esta metodología fue posible detectar en diferentes estadios de desarrollo del miembro la actividad de peroxidasa (fig 16).

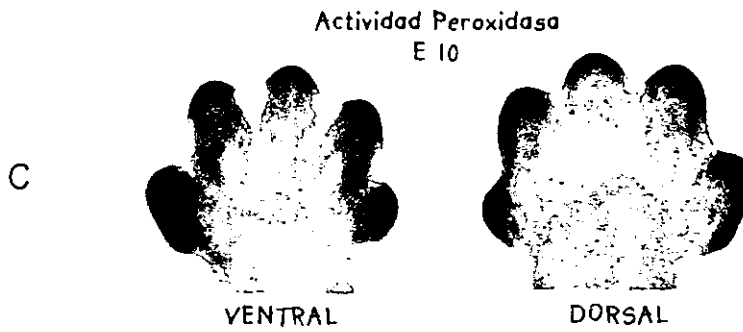
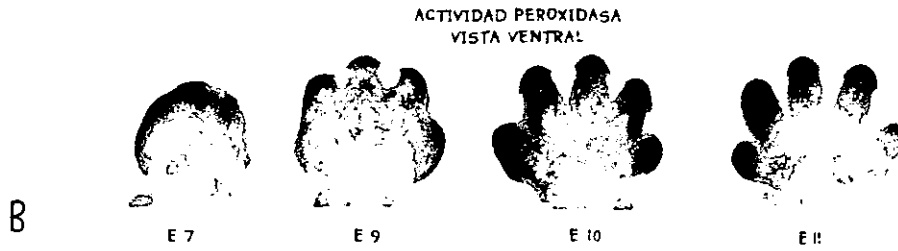
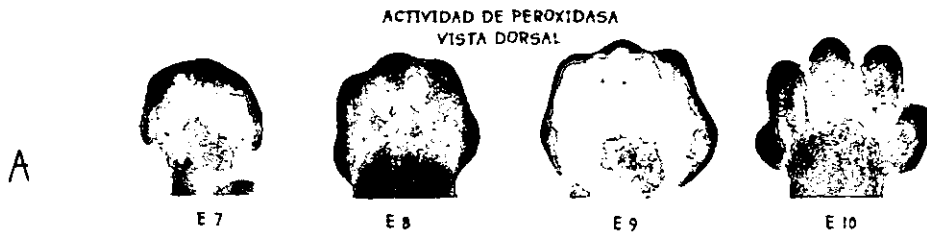


Figura 16. Actividad de peroxidasa (azul) en los miembros de ratón. A) Vista dorsal en los estadios 7, 8, 9 y 10. B) Vista ventral estadios 7, 9, 10 y 11. C) Comparación de la actividad de peroxidasa del lado ventral con el lado dorsal, en el estadio 10 D) Acercamiento de la vista ventral (E10) en la región apical remanente, donde se observó una disminución de la actividad (flecha)

El análisis de los resultados obtenidos mostraron lo siguiente:

1) Los patrones de actividad de peroxidasa cambian durante el desarrollo (fig 16 A y B):

En el estadio 7 comienza en la región más distal; en los estadios 8 y 9 se limita a las regiones en donde se van a formar los dígitos y en la palma; para el estadio 10 se observa actividad de peroxidasa en todo el miembro excepto en los interdígitos y en las regiones marginales de la palma anterior y posterior; y en el estadio 11 se conserva la actividad en los dígitos y en la palma.

2) En todos los estadios analizados se observa en la parte más distal de los dígitos en mayor tinción de la actividad de peroxidasa. Mientras que al nivel de la tercera falange se observa menor tinción (fig. 16 A y B).

3) Se observan diferencias entre el lado dorsal y el ventral en los patrones de actividad de peroxidasa (fig. 16 C). En la vista ventral se observa actividad de peroxidasa tanto en los dígitos como en el dorso la mano, mientras que en la vista dorsal aumenta en la región del interdígito en donde no hay actividad de peroxidasa hasta la tercera falange.

4) Hay una disminución notable de la actividad de peroxidasa en la región del ectodermo apical distal remanente (fig 16 D) con respecto al mesénquima subyacente.

5) No se observaron diferencias evidentes con respecto a la actividad de peroxidasa con respecto al eje antero-posterior.

Actividad de peroxidasa y muerte celular

En trabajo previo realizado en el laboratorio (Salas-Vidal y col., 1998) se demostró, con anaranjado de acridina, que las zonas de muerte celular en las extremidades de ratón se encuentran en los interdígitos y en las regiones marginales anteriores y posteriores de la palma; además se demostró, con colorantes redox-sensibles (MTT y DCF), que en las mismas regiones existe un incremento de las EOR. Estos resultados se sobrelaparon con la tinción de actividad de peroxidasa, y se observó que los patrones de muerte y de estrés son complementarios a la actividad de peroxidasa (fig. 17 A y B). Es de llamar la atención que en la región del ectodermo apical remanente donde se observó que disminuye la actividad de

peroxidasa hay un aumento en la concentración de especies reactivas y de la muerte celular(fig. 17 C y D). Estos resultados sugieren que la actividad deperoxidasa detectada en esta zona puede tener un papel en el control del aumento en las EOR, evitando de esta manera que se active el programa de muerte celular.

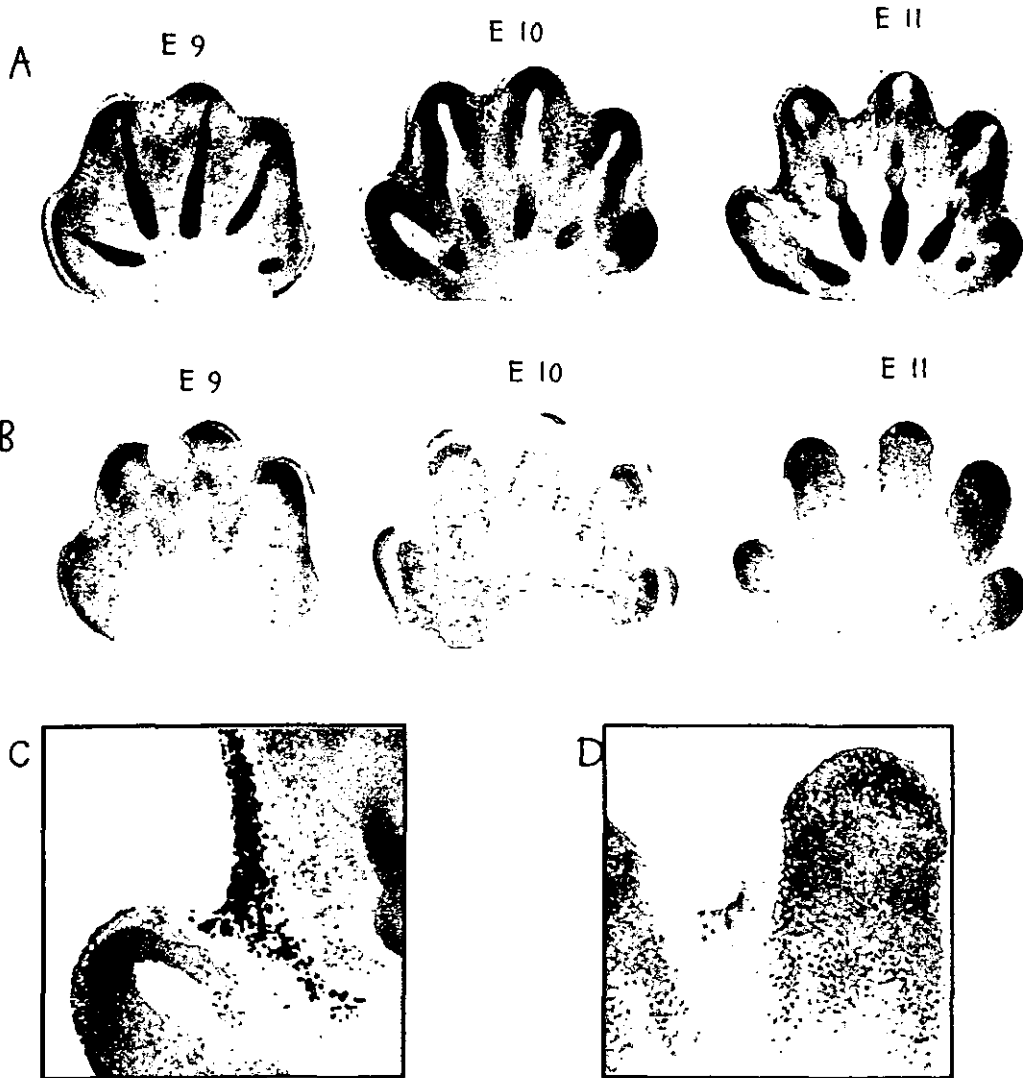


Figura 17. Sobreposiciones de la actividad de peroxidasa en azul (fig. 16) (A) sobre extremidades teñidas con anaranjado de acridina detectando la muerte (rojo) o (B) teñidas con DCF para detectar las especies de oxígeno reactivas (verde). C) Aumento de la sobreposición de la actividad de peroxidasa y la muerte celular. D) Aumento de la sobreposición de la actividad de peroxidasa y la detección de especies de oxígeno reactivas. En A y C se muestran los elementos esqueléticos a manera de referencia.

Identificación de la enzima responsable de la actividad enzimáticas observada

Para identificar que peroxidasa o peroxidadas estaba o estaban siendo identificadas con este ensayo (figura 16) se utilizaron diferentes estrategias. En un principio se intentó mediante geles de actividad, para determinar si la actividad observada correspondía a una o a varias peroxidadas, o a una catalasa. Sin embargo, con esta estrategia no fue posible ninguna actividad enzimática. También se realizaron tinciones con diaminobenzidina, que específicamente detecta la actividad de peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno y se observó el mismo patrón que con el DCF-DA, estos resultados mostraron que la actividad observada corresponde a una peroxidasa. Se probaron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, ya que previamente se ha demostrado *in vitro* (Silveira y Hadler, 1978) que éste factor es crítico para la actividad de las peroxidadas y de las catalasas. En concentraciones de peróxido de hidrógeno de 1.5mM hasta 3.5mM se encuentran activas únicamente las peroxidadas y conforme aumentan las concentraciones a 10 mM se encuentran activas tanto las peroxidadas como las catalasas. En concentraciones de 4M las peroxidadas se inactivan y las catalasas se activan (Silveira y Hadler, 1978). Debido a que no es posible determinar precisamente la concentración de peróxido de hidrógeno a la cual está expuesto el miembro en los cultivos organotípicos se realizaron curvas de concentraciones de peróxido de hidrógeno desde 4mM hasta 400mM. En este trabajo encontramos que al aumentar la concentración de peróxido de hidrógeno a 400mM, disminuye notablemente la tinción de la actividad detectada (fig. 18). Estos resultados sugieren que la actividad que observamos se debe a la actividad enzimática de una peroxidasa y que responde a la cantidad de peróxido de hidrógeno según lo reportado por Silveira y Hadler (1978).

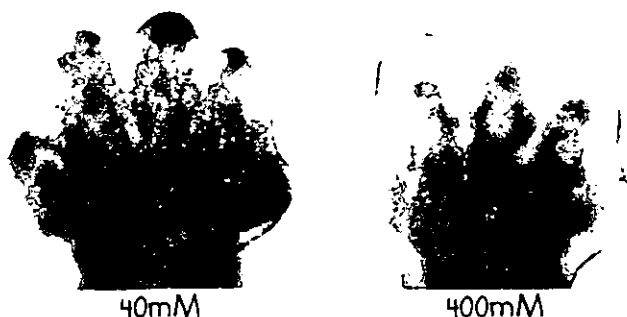


Figura 18 Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno en la actividad detectada con DCF

La familia de las peroxidases se divide principalmente en tres:

- 1) La subfamilia de peroxidases que poseen un grupo hemo:
 - la yodoperoxidasa,
 - la lactoperoxidasa y
 - la mieloperoxidasa.
- 2) La subfamilia de las peroxiredoxinas que utilizan a la tioredoxina como agente reductor
- 3) las glutatión peroxidases :
 - la glutatión peroxidasa específica de heridas
 - las glutatión peroxidases que tienen una cisteína modificada como selenio-cisteína (Cis-Se)
 - la glutatión peroxidasa celular (GPX1),
 - la glutatión peroxidasa específica del endotelio intestinal (GPX2),
 - la glutatión peroxidasa extracelular o plasmática (GPX3) y
 - la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos fosfolípidicos (GPX4).

El mercaptosuccinato compete con el glutatión durante el ciclo enzimático al reaccionar con la selenio-cisteína presente en el sitio activo, dando como resultado la producción de tioselenato el cual inhibe a la glutatión peroxidasa (Chaudiere y col., 1984). Esta característica permitió utilizar al mercaptosuccinato para determinar si la actividad que observamos pertenecía a la subfamilia de las glutatión peroxidases.

Se hicieron curvas de concentración de mercaptosuccinato desde 1 mM hasta 200 mM, concentraciones que se ha demostrado que tienen un efecto *in vitro* en cultivos de fibroblastos (Toussaint y col., 1993).

Se determinó el efecto del inhibidor a 30 minutos (fig 19) y 6 h de cultivo y el efecto en la muerte a las 6 y 24 horas de cultivo (fig. 20).

A los 30 minutos de cultivo la actividad disminuye de manera dependiente al aumento de la concentración de mercaptosuccinato. Así, a 1 mM no se observó diferencia con respecto al control; a 10 mM se observó que la tinción de actividad de peroxidasa disminuye en gradiente de la parte posterior a la anterior; a una concentración mas alta (50 mM), aumentó la inhibición de la actividad de peroxidasa y se siguió observando que la inhibición es mayor en la región posterior que en la anterior y aumentó en la región de las falanges. A 100 mM y 200 mM se observó que la actividad de la peroxidasa está inhibida. Es importante mencionar que la tinción de la actividad de peroxidasa se realizó en presencia de mercaptosuccinato y que si se retiraba, la actividad de peroxidasa se restablecía por completo, esto sugiere que el mercaptosuccinato no tuvo un efecto tóxico.

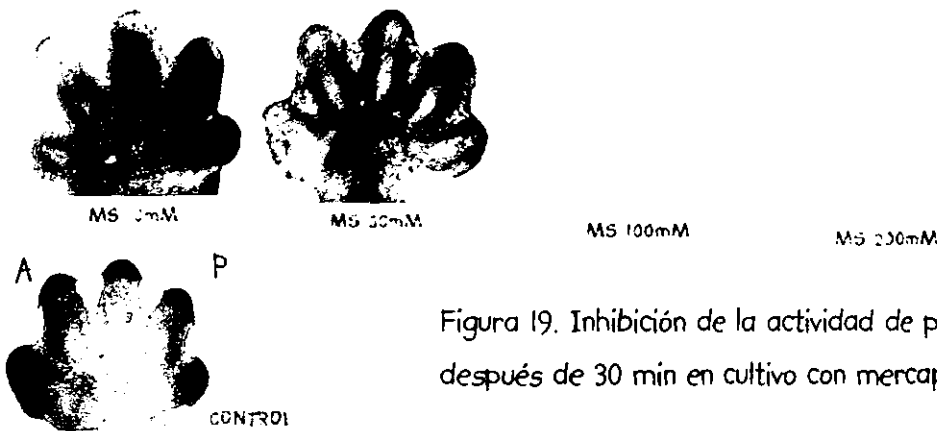


Figura 19. Inhibición de la actividad de peroxidasa con el después de 30 min en cultivo con mercaptosuccinato.

A las 6 horas de cultivo se observó que aún en la concentración más baja utilizada de mercaptosuccinato (0.1 mM) la actividad de peroxidasa esta completamente inhibida o no es detectable (fig.20A). A pesar de que a las 6 horas de cultivo se inhibe totalmente la actividad de peroxidasa, no se observo un aumento en la muerte celular en las dos concentraciones utilizadas de 0.1 mM y 10 mM (fig. 20B). En cultivos de 24 horas con mercaptosuccinato 10 mM se observó un aumento en la muerte celular en la región distal de los dígitos (fig. 20C).

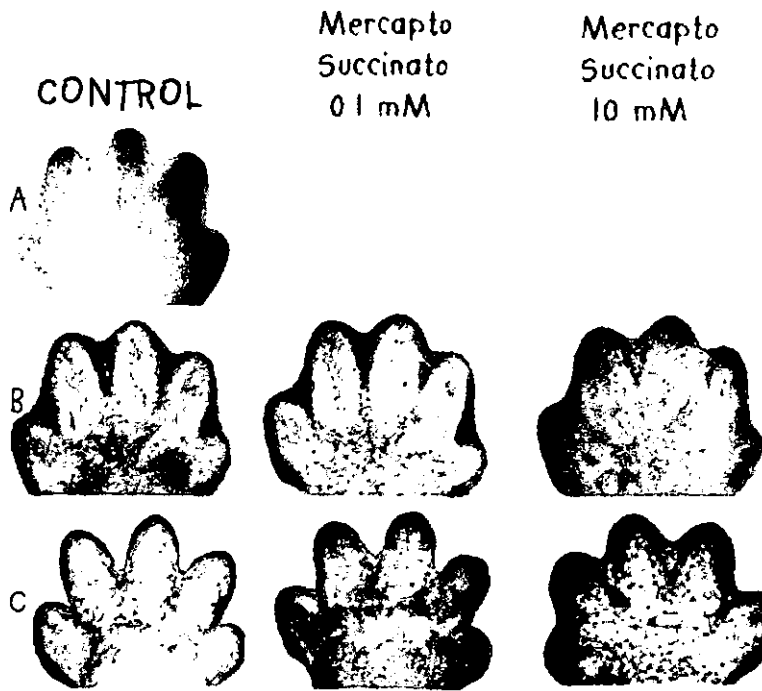


Figura 20. Inhibición de la actividad de peroxidasa con mercaptosuccinato
 A) Se presenta la inhibición total de la actividad de peroxidasa a las 6 horas de cultivo con las concentraciones utilizadas. B) Tinción con anaranjado de acridina después de 6 horas de cultivo con el inhibidor
 C) Tinción con anaranjado de acridina después de 24 h de cultivo donde se muestra que la mayor concentración aumenta considerablemente la muerte en los dígitos.

Estos resultados sugieren que la actividad que se detecta con 2',7'-diclorofluoreceína diacetato corresponde a la actividad de una o varias glutatión peroxidadas con seleniocisteína. Se utilizó la metodología de RT-PCR con la finalidad de determinar cuál de la o las glutatión peroxidadas es responsable de la actividad. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de las glutatión peroxidadas, para la GPXI, la GPX3 y la GPX4. No se hicieron oligonucleótidos para la GPX2 porque se ha descrito que esta peroxidasa se expresa únicamente en las células epiteliales del intestino (Esworthy y col. 1998).

Determinación de la identidad de la glutatión peroxidasa por RT-PCR

Se purificó RNA total de miembros de 13 *dpc* delanteros que corresponde a los estadios de 9, 10 y 11 de desarrollo. Como control de la *Gpx1*, *Gpx3* y *Gpx4* se purificó RNA total de hígado adulto, de testículo adulto y de riñón adulto. A partir del RNA total se sintetizó la cadena complementaria de ADN (cDNA) que se utilizó como templado para hacer una reacción de transcripción reversa. La obtención de un producto al

utilizar una combinación de oligonucleótidos específicos para cada una de las peroxidases permitió identificar cual o cuales de las peroxidases se encontraban presentes en los miembros.

Con los oligonucleótidos específicos para detectar la *Gpx1* de ratón se obtuvo un fragmento del tamaño esperado de 185 pares de bases tanto de la muestra de los miembros como de la muestra de hígado (fig. 21) y en la de embrión completo de 13 dpc (no se muestra). El fragmento de 185 pares de bases proveniente de la muestra de los miembros se digirió con *Hinf I* ya que al digerir con esta enzima se esperaba obtener dos fragmentos, uno de 79 pares de bases y otro de 106 pares de bases (fig. 24). Los resultados de las digestión con *Hinf I* correspondieron a lo esperado, por lo tanto los datos sugieren que los miembros de ratón expresan la *Gpx1* a los 13 dpc.

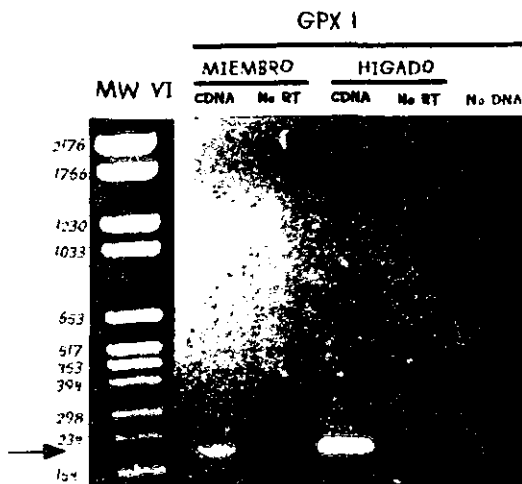


Figura 21. Gel de agarosa donde se muestra la amplificación del producto de la GPXI tanto en el miembro como en el control.

Con los oligonucleótidos específicos para detectar la *Gpx3* se detectó un fragmento del tamaño esperado, 169 pares de bases, tanto en la muestra de los miembros de 13 dpc como en la muestra de riñón (fig. 22), testículo y embrión (no se muestra). Posteriormente el fragmento obtenido de 169 pares de bases se digirió con la enzima *TaqI* obteniendo dos fragmentos uno de 95 pares de bases y el segundo de 74 pares de bases (fig 24). Este patrón corresponde al esperado para el fragmento de la GPX3, lo que sugiere que en los miembros también se expresa la GPX 3.

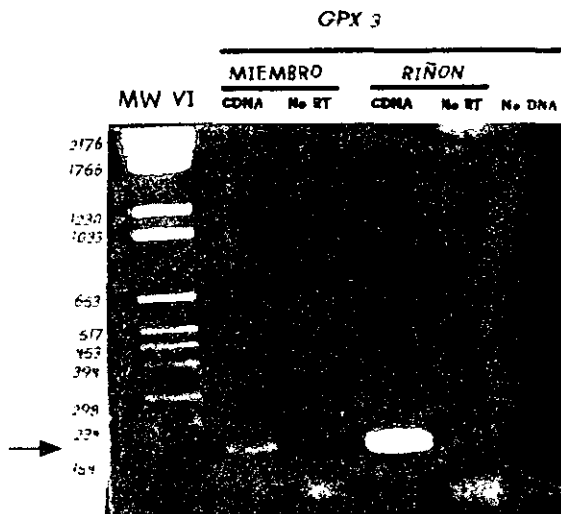


Figura 22. Gel con los resultados del RT-PCR para la GPX3. Tanto en el control como en el miembro se observa una banda de aproximadamente 169 pb, que corresponden al tamaño esperado.

En la amplificación realizada con los oligos específicos para la *Gpx 4* fue posible detectar un fragmento esperado de 381 pares de bases en las muestras de miembros de 13 *dpc*, y riñón de ratón adulto (fig. 23), así como de embrión y de hígado de ratón adulto (no se muestra). En el control se observó una banda de mayor tamaño que corresponde a lo reportado para la *Gpx4*; la *Gpx4* se puede sintetizar en dos formas: como una proteína de 194 aminoácidos que se localiza en la mitocondria y como otra proteína de 170 aminoácidos que se localiza en el citoplasma (Knopp y col., 1999). El patrón de digestión con *Bgl*III mostró dos bandas esperadas de 198 y 184 pares de bases (fig. 24). Estos resultados sugieren que en los miembros de 13 *dpc* también se expresan al menos una de las *Gpx4*.



Figura 23. Fotografía del gel de agarosa donde se muestran los resultados del RT-PCR específico para la GPX4.

Los resultados de la amplificación y de las digestiones muestran que las tres glutatión peroxidadas probadas se expresan en los miembros delanteros a los 13 *dpc* (figs. 21, 22, 23 y 24).

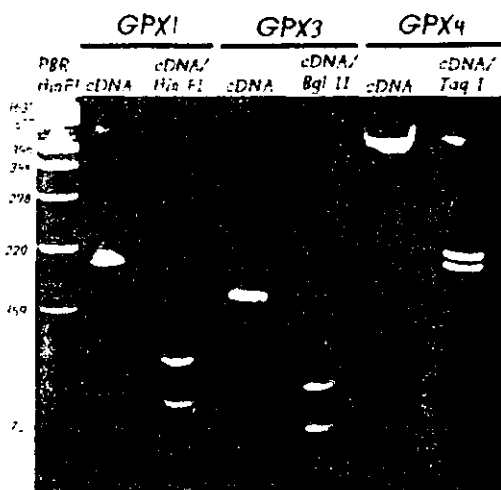


Figura 24. Resultados de las digestiones de los fragmentos de DNA correspondientes a las GPX 1, GPX3 y GPX4. Las tres digestiones muestran el patrón esperado para cada una de las peroxidadas.

Aunque se determinó que las tres glutatión peroxidadas se expresan en los miembros no se conoce el patrón de expresión de estas enzimas. Así como un primer acercamiento y con la finalidad de conocer el patrón de expresión de la *Gpx4* se realizó una hibridación de miembro completo.

Hibridación en embrión entero

Con el fragmento de PCR de la *Gpx 4* se preparó una sonda antisentido para detectar en el miembro completo la expresión de la *Gpx 4* y como control una sonda sentido (fig. 25).

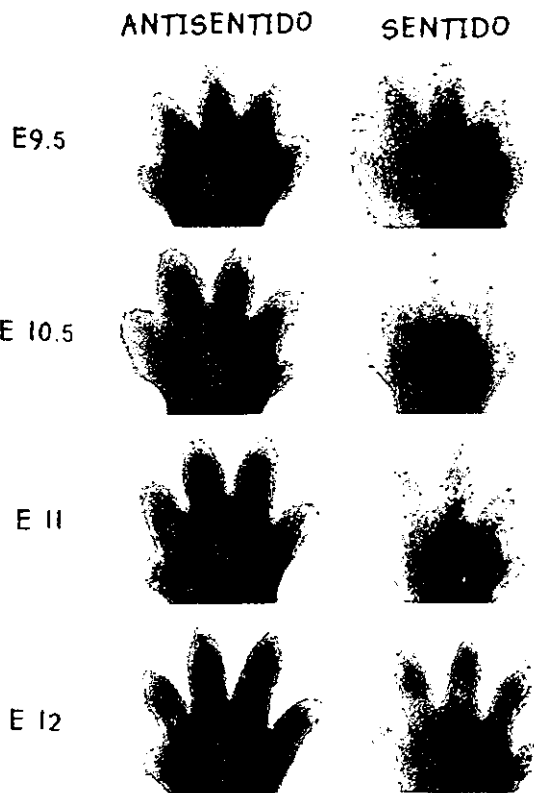


Figura 25. Patrones de la hibridación para GPX4 en extremidades de 13 y 14 dpc (E 9.5, 10.5 y 11 y 12 respectivamente).

Los resultados de esta hibridación con la sonda antisentido mostraron que:

- 1) La GPX4 se expresa en diferentes estadios del desarrollo (los estadios 9.5, 10, 11 y 12).
- 2) La expresión de la GPX4 se observó solo en los dígitos y no se observó en los interdígitos
- 3) Se observa un gradiente próximo distal en todos los diferentes estadios de desarrollo.
- 4) Hay una disminución en la expresión en la región donde se van a desarrollar las falanges.

Estos resultados se sobrelaparon con los patrones de muerte celular y con la tinción de la actividad de peroxidasa. Con estos análisis se mostró que: La expresión del RNAm de la GPX4 y la tinción para muerte son excluyentes, así en la región en donde se expresa la peroxidasa se observa que no hay muerte celular (fig. 26)

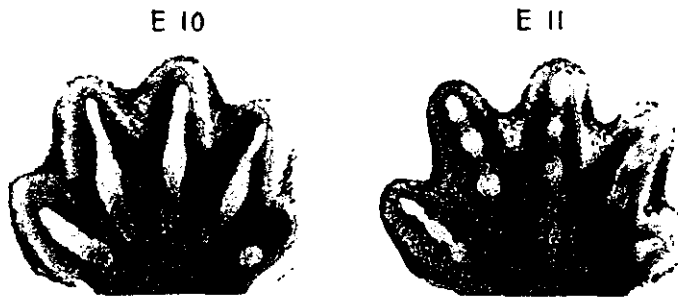


Figura 26. Sobrelapamiento de la expresión del PNA de la glutatión peroxidasa 4 (morado) y la tinción con anaranjado de acridina detectando apoptosis (rojo), en azul claro se muestran los elementos esqueléticos como referencia.

La expresión del RNAm de la *Gpx4* y la actividad de peroxidasa coinciden en la región proximal, mientras que en la región distal donde se observa mayor tinción para la actividad existe menor expresión del RNAm de la *Gpx4*. En la figura 27 se muestra en azul únicamente aquellas regiones donde no sobrelapa la actividad con la expresión del RNAm de la *Gpx4*



Figura 27. Sobrelapamiento de la actividad de glutatión peroxidasa y la expresión de la GPX4. La región mas distal donde no se observa un sobrelapamiento de la actividad y la expresión se muestra con azul.

Expresión de Bcl-2 en los interdígitos

Mendelsohn y col. (1991) reportaron en ratones transgénicos la expresión de RAR- β 2, al utilizar la construcción de fusión del promotor de RAR- β 2 unido a *lacZ*. Durante el desarrollo en los animales transgénicos se mostró un patrón reproducible de actividad de β -gal, el cual coincide en su

mayoría con los sitios donde se expresa RAR-β2 por hibridación *in situ* (Ruberte y col., 1991; Dollé y col. 1989). La expresión de RARβ2 se presenta en los miembros; así a los 9.5 y 10.5 dpc, cuando el primordio del miembro se encuentra compuesto principalmente de células mesenquimáticas no diferenciadas cubiertas por el ectodermo, la expresión de *lacZ* se encuentra confinada a la zona próximo dorsal tanto en el mesénquima como en el ectodermo. A los 11.5 dpc, la actividad de β-gal baja en la región proximal de los miembros pero permanece en el ectodermo apical. Desde los 12.5 dpc, la tinción de *lacZ* se hace visible en la región interdigital y continua hasta los 14.5 días en la zona de los interdógitos. Por este patrón, nos interesó utilizar este promotor para expresar *Bcl2* en los interdógitos.

El objetivo de este trabajo era determinar si BCL2 podría evitar la muerte celular normal que ocurre en los interdógitos. Posteriormente se quería estudiar si BCL2 lleva a cabo esto mediante la activación de alguna de las glutatión peroxidadasas. Dado que la tinción para muerte y la expresión de *lacZ* a partir del promotor de RAR-β2 son complementarias (ver fig. 28), (es decir en las regiones del interdígito en donde no hay muerte se observa que existe la expresión a partir de RAR-β2) la construcción realizada no fue utilizada para producir animales transgénicos

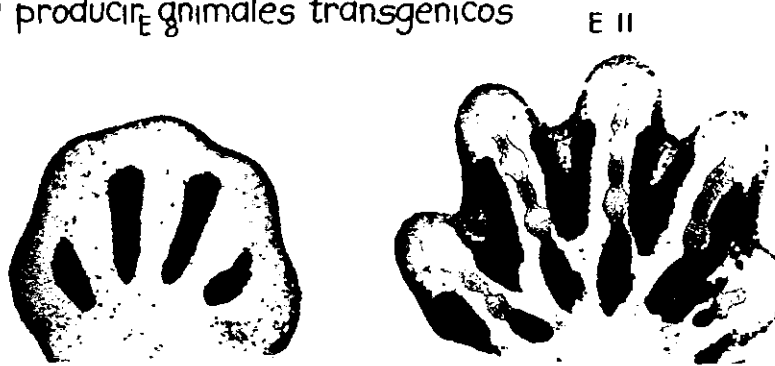


Figura 28. Sobrelapamientos de la expresión de RARβ-2 (verde) y la muerte celular (rojo).

DISCUSIÓN

Las glutatión peroxidasas y el control de la muerte celular

La muerte celular es un evento común durante el desarrollo de diferentes tejidos embrionarios y postnatales (Glucksmann, 1951); esta muerte puede iniciarse por una gran variedad de señales de activación y puede también depender del estado metabólico particular de la célula.

Trabajo previo mostró la primera evidencia de que el estrés oxidativo participa de manera natural en el proceso de muerte celular programada que ocurre durante el desarrollo del ratón en los interdígitos del miembro, en la línea de fusión del paladar, en la vesícula ótica, en la línea media de fusión del esternón y en el ojo en desarrollo (Salas-Vidal y col. 1998). Sin embargo, no se había descrito anteriormente la manera en que las células que sobreviven son capaces de protegerse del programa de muerte celular, evitando que aumenten las EOR. El presente trabajo muestra la primera evidencia *in vivo* de que las células en los dígitos expresan al menos tres enzimas encargadas de eliminar las EOR, posiblemente evitando la muerte en ésta región.

En este trabajo se mostró que los dígitos, a diferencia de los interdígitos, presentan la tinción con el fluorógeno diclorofluoresceína (DCF) al agregar H_2O_2 . La peroxidasa es capaz de utilizar al 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) como sustrato y en presencia de peróxido de hidrógeno, producir al DCF el cual es fluorescente, detectandose de esta manera la actividad de peroxidasa (Black y Brandt, 1974). Sin embargo, también está descrito que el DCF-DA es capaz de detectar al peróxido de hidrógeno en presencia de de fierro (LeBel y col., 1992). Para determinar que la tinción con DCF-DA correspondía a la actividad de peroxidasa y no a la detección del peróxido de hidrógeno en presencia de fierro se realizaron cultivos organotípicos con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Anteriormente Silveira y Hadler (1978) en experimentos *in vitro* mostraron que la actividad de la peroxidasa es

dependiente de la concentración de H_2O_2 . Con los cultivos organotípicos no es posible determinar con exactitud la cantidad real de peróxido de hidrógeno que puede entrar al miembro, por lo cual se realizó una curva de concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se observó que la mayor concentración de peróxido de hidrógeno es capaz de inactivar a la peroxidasa. Estos resultados mostraron que la actividad que observamos con el DCF-DA corresponden a la actividad enzimática de una peroxidasa y que responde a la cantidad de peróxido de hidrogeno según lo reportado por Silveira y Hadler (1978).

El patrón de actividad de peroxidasa resulta interesante, ya que se observa en los dígitos y en la palma, mientras que en los interdígitos y la región más distal del ectodermo apical remanente no se observó actividad de glutatión peroxidasa. Las regiones donde se observó la actividad de peroxidasa coinciden con las zonas en donde no se observó un aumento en el estrés oxidativo y la muerte celular. Esto sugiere que la actividad de peroxidasa juega un papel importante en evitar un aumento en las las concentraciones de EOR, evitando así la muerte celular en los dígitos.

Para determinar si la actividad enzimática observada correspondía a alguna peroxidasa de la subfamilia de las glutatión peroxidases se hicieron cultivos organotípicos en presencia de mercaptosuccinato, inhibidor específico de las glutatión peroxidases (Chaudiere y col., 1984). Los ensayos realizados con este inhibidor mostraron que en 30 minutos era posible inactivar totalmente la actividad de la peroxidasa. Transcurridos estos treinta minutos, al lavar el mercaptosuccinato, fue posible detectar nuevamente la actividad de peroxidasa, lo que mostró que el efecto del inhibidor es sobre la actividad de una o varias glutatión peroxidases y que tiene un efecto reversible. Estos resultados mostraron que el mercaptosuccinato actúa en estos cultivos como inhibidor de una o varias glutatión peroxidases y que la actividad de peroxidasa detectada con el DCF pertenece a la subfamilia de las glutatión peroxidasa con selenio-cisteínas

Existe la posibilidad de que el mercaptosuccinato, al tener un grupo

tiol (como el glutatión), pueda actuar como antioxidante no-enzimático. Al actuar de esta manera sería capaz de disminuir la concentración de EOR y por lo tanto de inhibir la muerte celular. Para observar si al eliminar la actividad de peroxidasa, con el mercaptosuccinato aumentaba la muerte celular, se realizaron cultivos más prolongados (24h) con mercaptosuccinato. Se observó un aumento en la muerte celular en los dígitos a las concentraciones más bajas. Esto sugiere que las peroxidasa juegan un papel importante en evitar un aumento en la concentración de EOR, evitando así que se inicie el programa de muerte. Sin embargo, solo se observó este efecto en la muerte celular en los cultivos más prolongados. Esto podría deberse a que en lapsos cortos no aumente la concentración de EOR necesaria para que se active el programa de la muerte celular. Otra posibilidad es que ocurran las oleadas o picos de estrés oxidativo y que no se observe un efecto en la muerte celular hasta que se genere una oleada posterior al tratamiento con el mercaptosuccinato.

Los resultados de los tratamientos con mercaptosuccinato permitieron evaluar la importancia de la actividad de la peroxidasa en el proceso de muerte celular programada. Otra conclusión de estos experimentos es que la actividad observada pertenece a una o varias peroxidasa de la subfamilia de las glutatión peroxidasa que poseen en el sitio activo selenio. Esta familia está compuesta de una peroxidasa citosólica (GPXI) (Chambers y col., 1986), una específica del epitelio intestinal (GPX2) (Esworthy y col., 1998), una plasmática (GPX3) (Schwaab y col., 1995) y una de hidroperóxidos fosfolipídicos (GPX4) (Knopp y col., 1999). Con la finalidad de determinar cuál o cuáles eran las glutatión peroxidasa responsables de la actividad presente en los dígitos se realizó un RT-PCR específico para la GPXI, GPX3 y GPX4. No se estudió a la GPX2 debido a que se ha descrito que ésta se expresa únicamente en las células del epitelio del intestino y de manera esporádica en el tejido de las glándulas mamarias (Chu y col. 1999). Los resultados mostraron que las tres peroxidasa probadas se encuentran en el miembro a los 13 dpc, que corresponde a los estadios 9, 10

y II. Se escogió a la GPX4 para realizar una hibridación *in situ* en el miembro completo en los diferentes estadios del desarrollo (de 9 a 12).

Los resultados mostraron que la GPX4 se expresa en los dígitos y no se expresa en los interdígitos. Esto es interesante, pues sugiere una regulación de la expresión de la GPX4, restringiendo la expresión únicamente a los dígitos. Esta expresión corresponde parcialmente a los sitios donde se observó la actividad de peroxidasa. Mientras que en las regiones distales de los dígitos del miembro, donde se observa una mayor actividad de glutatión peroxidasa, no se detectó la expresión de la Gpx4.

Una posibilidad es que alguna de las otras dos glutatión peroxidasas detectadas por RT-PCR, la Gpx1 y/o la Gpx3, sean las responsables de esta actividad en la región más distal del miembro. De manera alternativa, también podría corresponder a otra actividad de alguna glutatión peroxidasa no probada en este estudio como la Gpx2 o inclusive a alguna otra glutatión peroxidasa no descrita aún.

Es de llamar la atención que la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos fosfolípidicos se encuentre en los dígitos, ya que se ha propuesto que los lípidos son mejores candidatos a ser segundos mensajeros, porque pueden mediar señales específicas en receptores de la superficie de la célula (Jacobson 1996). Esto sugiere un papel de los ácidos grasos, que generan radicales libres, en la muerte celular que ocurre en los interdígitos. En los dígitos se encuentra la maquinaria necesaria (GPX4) para eliminar a estas especies reactivas evitando así que se genere alguna señal capaces de activar al programa de muerte celular.

Bcl-2 y la actividad de las glutatión peroxidasas

Con diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la sobreexpresión de BCL2 puede incrementar la sobrevivencia en ciertas condiciones donde se promueve la muerte celular. Sin embargo la sobreexpresión de BCL2, no protege de la muerte para todos los estímulos que se han observado capaces de provocar muerte por apoptosis; por

ejemplo BCL2 es capaz de proteger la muerte en líneas celulares hematopoyéticas al retirar la interleucina 3 y la interleucina-4, pero no es capaz de proteger cuando se retira la interleucina-2 o la interleucina-6 (Nuñez y col., 1990; Vaux y col., 1988).

Aunque se desconoce el mecanismo bioquímico por el cual BCL2 actúa, se ha propuesto que funciona en una vía antioxidante. La expresión de BCL2 en líneas celulares hematopoyéticas impide la muerte celular en respuesta al estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno y menadiona (Hockenbery y col., 1993). En este sistema Bcl-2 no actúa evitando la generación de especies reactivas sino que impide el daño a constituyentes celulares, incluyendo la peroxidación de lípidos. La expresión de BCL2 evita la muerte celular cuando se reduce el glutatión en cultivos de la línea celular de hipocampo (Kane y col., 1993). Las células que expresan BCL2 tienen menor cantidad de peróxidos y de peroxidación de lípidos después de la eliminación de glutatión.

Steinman (1995) propuso que BCL2 es en realidad una molécula pro-oxidante que genera estados parciales o temporales de estrés oxidativo, que no son suficientes para activar la apoptosis, pero sí para inducir una respuesta antioxidante. También se ha demostrado que la concentración del peróxido de hidrógeno es crítica para la actividad tanto de las peroxidasas como para la actividad de las catalasas. (Silveira y Hadler, 1978). Por otra parte se ha demostrado que BCL2 se expresa en los dígitos y no en los interdígitos; ésta expresión coincide con la actividad de glutatión peroxidasa y con la expresión al menos de la *Gpx4* como se mostró en el presente trabajo. Este conjunto de evidencias sugiere que BCL2 podría regular la actividad de las glutatión peroxidasas presentes en el miembro (GPXI, GPX3 y GPX4) evitando que aumente la concentración de peróxido de hidrógeno y así evitando la muerte celular en los dígitos.

CONCLUSIONES

- 1.- El conjunto de resultados presentados, apoyan la hipótesis de que el metabolismo de las EOR tienen un papel importante en regular el proceso de muerte celular, que ocurre de manera natural en el desarrollo embrionario del ratón.
- 2.- En los miembros en desarrollo se expresan al menos tres enzimas encargadas de eliminar al peróxido de hidrógeno. La glutatión peroxidasa celular, la glutatión peroxidasa extracelular y la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos de fosfolípidos.
- 3.- Los resultados mostraron que la actividad que se observó en los dígitos corresponde a la actividad de glutatión peroxidasa. Los análisis de los modelos de sobreposición de imágenes, mostraron que en las regiones donde hay actividad de glutatión peroxidasa no se detectan EOR ni muerte celular. Al inhibir la actividad de peroxidasa aumenta la muerte celular en los dígitos. Lo que sugiere que las glutatión peroxidases presentes en los dígitos, participan naturalmente en la maquinaria que evita la muerte celular.
- 4.- El promotor del RAR- β 2, no es un buen candidato para dirigir la expresión de *Bcl2* en las regiones del interdígito donde ocurre la muerte celular.

PERSPECTIVAS

Debido a que el patrón de expresión de la *Gpx4* no coincide totalmente con el patrón de actividad, es interesante analizar el patrón de expresión de las *Gpx1* y *Gpx3*, mediante hibridaciones *in situ*. También es interesante observar la localización de cada una de las proteínas en los miembros en desarrollo, utilizando anticuerpos específicos para cada una de las glutatión peroxidases.

El presente trabajo muestra la importancia del metabolismo de las EOR en el control de la muerte celular. Sin embargo, solo se estudió a las glutatión peroxidases. El estudio de otras enzimas encargadas de eliminar a

las EOR como las SOD y la catalasa permitiría tener un esquema más completo que explique el sistema de defensa celular en contra de las EOR. También resulta muy interesante estudiar a las enzimas capaces de generar EOR, (por ejemplo la NADPH oxidasa). Esto permitiría determinar si existe una regulación de la expresión y/o actividad de estas enzimas, que ocasione el que las EOR se generen únicamente en los interdógitos, donde hay muerte celular. Así, en experimentos preliminares, con el inhibidor de la NADPH oxidasa, se observó una disminución en la muerte que ocurre normalmente en los interdógitos.

Para estudiar la posible regulación de BCL2 sobre las glutatión peroxidasas, se planea expresar *Bcl2* en los interdógitos. No se ha descrito algún promotor que permita la expresión en las células del interdígito que mueren por apoptosis. Por lo cual una posibilidad para expresar a *Bcl2* en el interdígito es con un vector retroviral. Este vector está actualmente caracterizándose. Una vez caracterizado se planea utilizarlo para hacer infecciones *in útero* a los 11 dpc. A los 13dpc se podría observar el efecto en la muerte celular y la actividad de glutatión peroxidasa.

Resulta interesante estudiar, si la sobreexpresión de las glutatión peroxidasas es suficiente para evitar la muerte celular que ocurre de manera normal. Así, se podría utilizar un vector retroviral como se describe anteriormente para BCL2, o de manera alternativa hacer ratones transgénicos que sobreexpresen a la glutatión peroxidasa constitutivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahams, J. M., White, C., Fessler, L. I. y Steller, H. (1993) Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117:29-43.
- Banki, K., Hutter, E., Colombo, E., Gonchoroff, N. J. y Perl, A. (1996) Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression. *J. Biol. Chem.* 271:32994-33001
- Black, M. J. y Brandt R. B. (1974) Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide *Anal. Biochem.* 58:246-254.
- Buckley, I. K. (1972) A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. *Lab. Invest.* 26: 201-209.
- Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K. y Rhee, S. G. (1993) Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268:16815-16821.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. y Harrison, P.R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO* 5:1221-1227.
- Chaudiere, J., Wilhelmsen, E. C. y Tappel, A. L. (1984) Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J. Biol. Chem.* 259:1043-1050.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R. y Dixit, V. M. (1997) Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275:1122-1126.

- Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D. O., O'Rourke, K., Koonin, E. V. y Dixit, V. M. (1997a) Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 388:728-729.
- Cross, A. R., y Jones, O. T. G. (1991) Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochem. Biophys. Acta* 1057:281-298.
- Crossley, P. H. y 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.
- Czapski, G. (1984) Reaction of OH. *Meth. Enzymol.* 105:209-214.
- Dickerman, R. C., Feinstein, R. N. y Grahn, D. (1968) Position of the acatalasemia gene in linkage group V of the mouse *J. Hered.* 59:177-178.
- Dollé, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C. M., Gudas, L. J. y Chambon, P. (1989) Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* 342:702-5.
- 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. y Bredesen, D. E. (1996) Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J. Neurochem.* 67:1259-1267.
- Ellis, H. M. y Horvitz, H. R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817-829.
- Enokido, Y. y Hatanaka, H. (1993) Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultures in a high oxygen atmosphere. *Neuroscience* 57: 965-972.

-Esworthy, R.S., Swiderek, K.M., Ho, Y.S. y Chu, F.F. (1998) Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1381:213-226.

-Fernández, R. S. y Cotter, T.G. (1994) Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem. Pharmacol.* 48:675-681.

-Gagliardini, V., Fernández, P.A., Lee, R.K.K., Drexlaer, H.C., Rotello, R.J., Fishman, M.C. y Yuan, J. (1994) Prevention of vertebrate neuronal death by the *crmA* gene. *Science* 263:826-828.

-Gilbert, S. F. (1994) *Developmental Biology* Fourth edition. Sinauer. Sunderland, Mass., USA.

-Glucksmann A. (1951) Cell death in normal ontogeny. *Biol. Rev.* 26: 59-86.

-Golstein, P. (1997) Controlling cell death. *Science* 275: 1081-1082.

-Gramzinski, R.A., Parchement, R.E., y 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. y Johnson, E. M. (1995) Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal cell death. *Neuron* 14:303-315.

-Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free radicals in Biology and Medicine*. 2nd edition. Oxford University Press, Avon, U. K.

-Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85.

-Hanada, H., Kashiwagi, A., Takehara, Y., Kanno, T., Yabuki, M., Sasaki, J., Inoue, M. y Utsumi, K. (1997) Do reactive oxygen species underlie the mechanism of apoptosis in the tadpole tail? *Free Radic. Biol. Med.* 23:294-301.

-Hartman, H., Wu, M., Buchanan, B. B., y Gerhart, J. C. (1993) Spinach thioredoxin inhibits DNA synthesis in fertilized *Xenopus* eggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2271-2275.

-He, H., Lam, M., McCormick, T. S. y Distlhorst, C. W. (1997) Maintenance of calcium homeostasis in endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J. Cell. Biol.* 138:1219-1228.

-Herzenberg, L. A., De Rosa, S. C., Dubs, J. G., Roederer, M. Anderson, M. T., Ela, S. W., Deresinski, S. C. y Herzenberg, L. A. (1997) Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1967-1972.

-Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L. y Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.

-Hockenbery, D. M. (1995) *bcl-2*, a novel regulator of cell death. *BioEssays* 17:631-168.

-Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54:237-271.

-Horvitz, H. R. y Ellis, S. P. (1982) Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Comment.* 1:56-65.

-Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Benedict, M.A. y Nuñez G. (1999) Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J. Biol. Chem.* 274:270-274.

-Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. y Nuñez G (1998) CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO* 17:2526-2533.

-Jacobson, M. D. y Raff, M. C. (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374:814-816.

-Jacobson, M.D., (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 21:83-86

-Jenner, P y Olanow, C. W. (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47:161-170.

-Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., y Bredesen, D. E. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death-decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262:1274-1277.

-Kerr, J.F.K., Willie, A.H. y Currie, A.R., (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239-257.

-Kerr, J.F.K.y Harmon, V.B., (1991) Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. En: *Apoptosis: The molecular basis of cell death.* Ed. Tomei L.D. y Cope F.O. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

-Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. y Newmeyer, D. D. (1997) The release of cytochrome c from the mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.

-Knopp, E. A., Arndt, T. L., Eng, K. L., Caldwell, M., LeBoeuf, R. C., Deeb, S. S. y O'Brien, K. D. (1999) Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping. *Mamm Genome*. 6:601-5.

-Laiho, K. U., Berezesky, I. K. y Trump, B. F. (1983) The role of calcium in cell injury: studies in Ehrlich ascites tumor cells following injury with anoxia and organic mercurials. *Surv.Synth. Pathol Res.* 2: 170-183.

-Lam, M., Dubyak, G., Chen, I., Nunez, G., Miesfeld, R. L. y Distelhorst, C. W. (1994) Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6559-6573.

-LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., y Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2'-7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Rev. Toxicol.* 5:227-231.

-Lennon, S. V. Martin, S. J. y Cotter, T. G. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24:203-214.

-Liu, Q. A., Hengartner, M. O. (1998) Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell* 93:961-72

-Longo, V. D., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E. Valentine, J. S. y Gralla, E. B. (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide

dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.* 137:1581-1588.

-Luciani, M.F. y Chimini, G. (1998) The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO* 15:226-235.

-Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., y Taketo, M. M. (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178:179-185.

-Mendelsohn, C., Ruberte, E., LeMeur, M., Morriss-Kay, G. y Chambon, P. (1991) Developmental analysis of the retinoic acid inducible RAR- β 2 promoter in transgenic animals. *Development* 113:723-734.

-Metzstein, M. M., Stanfield, G. M. y Horvitz, H. R. (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past present and future. *TIG* 14:410-416

-Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. y Thompson, C. B. (1997) Bcl-X_L forms a ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385:353-357.

-Mirkovic, N., Voeringer, D. W., Story, M. D., McConkey, D. J., McDonell, T. J. y Meyn, R. E. (1997) Resistance to radiation in induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. *Oncogene* 15:1461-1470.

-Mitsui, M. Hirakawa, T y Yodoi, J. (1992) Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1220-1226.

-Miura, M.M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweig, A. y Yuan, J. (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75:653-660.

-Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T. y Shiota, K. (1995) Programmed cell death in the interdigital tissue. *Anat. Rec.* 242:103-110.

-Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadowas, R. P. Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S. Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. C. y Fesik, S. W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-X_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381:335-341.

-Müller, E. G. D. (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongues S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266:9191-9202.

-Nicholson, D. W. y Thornberry, N. A. (1997) Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 299-306.

-Nuñez G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J. P. y Korsmeyer, S. J. (1990) Desregulated *Bcl-2* gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* 144: 3602-3610.

-O'Donnell, V. B., Spycher, S. y Azzi, A. (1995) Involvement of oxidants and oxidant generating enzyme(s) in tumor-necrosis-factor- α -mediated apoptosis; role for lipoxygenase pathway but not mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 310:133-141.

-Ortiz, E. (1945) The embryological development of the Wolffian and Müllerian ducts and the accesory reproductive organs of the golden hamster (*Cricetus auratus*) *Anat. Rec.* 92: 371.

-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.

-Pinkus, R., Weiner, L. M. y Daniel, V. (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expresion. *J. Biol. Chem.* 271:13422-13429.

-Quillet-Mary, A., Jaffrezou, J. P., Mansat, V., Bordier, C., Naval, J. y Laurent, G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem* 272:21388-21395.

-Radi, R. Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M. Crapo, J. D. y Freeman, B. A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266:22028-22034.

-Raff, M. C. (1992) Social control on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.

-Reed, J. C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-776.

-Ruberte, E., Dolle, P., Chambon, P. y Morriss-Kay, G. (1991) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* 1:45-60

-Ryan, J. J. Prochoenik, E., Gottlieb, C. A., Apel, I. J., Merino, R., Nuñez, G. y Clarke, M. F. (1994) c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5878-5882

-Salas-Vidal, E., (1998) El estrés oxidativo y la muerte celular durante el desarrollo de las extremidades del ratón. Tesis Doctorado en Investigación Biomédica Básica. UNAM.

-Salas-Vidal E., Lomeli, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D. y Covarrubias, L. (1998) Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell. Res.* 238:136-147.

-Saunders, J. W. (1966) Death in embryonic systems. *Science* 154:604-612.

-Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsumaya, S., Montal, M. y Reed, J. C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5113-5118.

-Schwaab, V., Baud, E., Ghyselinck, N., Mattei, M.G., Dufaure, J.P. y Drevet, J.R. (1995) Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene* 167:25-31.

-Sen, S. (1992) Programmed cell: concept, mechanism and control. *Biol. Rev.* 67:287-319.

-Shaham, S. y Horvitz, H. R. (1996) Developing *Caenorhabditis elegans* neuron may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes & Dev.* 10: 578-591.

-Silveira, S. R. y Hadler, W. A. (1978) Catalases and peroxidases histochemical detection; techniques suitable to discriminate these enzymes. *Acta. Histochem.* 63:1-10.

-Singh, I. 1996 Mammalian peroxisomes metabolism of oxygen and reactive species *Ann. NY Acad. Sci.* 804:612-627

-Steinman, H. M., (1995) The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J. Biol. Chem.* 270:3487-3490.

-Stratford, T., Horton, C. y Maden, N. (1996) Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Current Biol.* 6:1124-1133.

-Susin, S. A., Zamzani, N., Castedo, M., Hirsh, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. y Kroemer, G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184:1-11.

-Tabin, C. J. (1991) Retinoids, homeoboxes and growth factors. Toward molecular models for limb development. *Cell* 66:199-217.

-Tan, E. M. (1994) Autoimmunity and apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 1083-1086.

-Taketo, T. y Koide, S. S. (1981) *In vitro* development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* 84:61-66.

-Trump, B. F., Berezsky, I. K., Sato, T., Laiho, K. U., Phelps, P. C., De Clarins, N. (1984) Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ. Health Perspect.* 57: 281-287.

-Vaux, D. L., Cory, S. y Adams, J. M. (1988) Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442.

-Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R. y Bryant, S. V. (1989) A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* 249:41-49.

-Williams, G. T. (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098.

-Wu, Y. C. y Horvitz, H. R. (1998) *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392:501-4

-Wu, Y. C. y Horvitz, H. R. (1998a) The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93:951-60

-Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. y Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from the mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.

-Yodoi, J. y Uchiyama, T. (1992) Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) associated diseases: Virus, IL-2 receptor dysregulation and redox regulation. *Immunol. Today* 13:405-411.

-Yuan, J. Y., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. y Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641-652.

-Zakeri, Z., Quaglina, D. y Ahuja, H. S. (1994) Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant. *Dev. Biol.* 165:294-297.

-Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschung, A. y Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of casapase-3. *Cell* 90:405-413.

-Zwilling, E. (1972) Limb morphogenesis. *Dev. Biol.* 28:12-17.