

00591
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**"Papel del ácido retinoico en la muerte celular del paladar
embrionario"**

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

Biol.. Rodrigo Cuervo González

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo mencionado.

NOMBRE: Rodrigo Cuervo
González

FECHA: 41 Sept 03

Director de tesis.

Dr. Luis Covarrubias Roblés.

Instituto de Biotecnología.

Cuernavaca, Morelos.



Septiembre, 2003.



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

ANTECEDENTES

Muerte celular programada (MCP)	1
Maquinaria de muerte.....	1
Muerte celular en el desarrollo.....	5
Moléculas que participan en la inducción y regulación de la MCP.....	6
Fusión y muerte celular.....	8
El Acido Retinoico (AR).	
Metabolismo, señalización y función.....	8
AR y su participación en la muerte celular del desarrollo.....	11
AR como teratógeno.....	11
Desarrollo del paladar.	
Origen y desarrollo.....	12
Proceso de fusión.....	13
Adhesión.....	13
Muerte celular.....	14
Migración.....	14
Transformación epitelio-mesénquima.....	14
El paladar como modelo de estudio de muerte celular en el desarrollo.....	15
Muerte celular en la morfogénesis de la extremidad	16
JUSTIFICACION	17

RESULTADOS

I. Control de la muerte celular por AR.

Desarrollo de órganos (ventajas del sistema de cultivo).....	17
Muerte celular durante el desarrollo del paladar.....	18
Efecto del AR <i>in vitro</i>	19
Inhibición de la síntesis de AR.....	20
Algunos genes regulados por AR en el paladar.....	21
BMP-7 en la muerte celular de la extremidad y el paladar.....	22
TGF β -3 y la MCP.....	23
La muerte celular en la etiología del paladar hendido.	
Inhibición de la MCP y su efecto en la fusión.....	23

Incremento de la MCP y su efecto en la fusión (efecto teratogénico del AR).....	24
II. Análisis de los procesos celulares que participan en la fusión.	
La transformación epitelio-mesénquima.....	24
I. Marcaje y seguimiento del EM en cortes alternados.....	25
II. Seguimiento en rebanadas vivas.....	26
III. Marcaje LacZ por infección adenoviral.....	26
IV. Cultivos mixtos con paladares de ratones GFP.....	26
Función de las células peridermales.	
Conformación de los triángulos epiteliales.....	27
Adhesión.....	28
Migración y MCP.....	28
Dinámica y participación de la lámina basal durante la MCP.....	29
Las metaloproteinasas son necesarias para la fusión pero no para la MCP.....	29
DISCUSION	
El paladar como modelo de MCP durante el desarrollo embrionario.....	30
MCP asociada a la fusión (EM) y a la proliferación (crestas).....	31
El AR en el control de la MCP.	
Competencia.....	31
El AR endógeno en el control de la MCP.....	32
Miembros de la familia de TGF beta en la MCP de la extremidad y el paladar.....	33
Fusión y muerte celular, analogías con otras regiones embrionarias.....	34
Exceso de AR.....	36
Transformación epitelio mesénquima en el paladar.	
Evidencias reportadas por otros grupos.....	36
Primeros reportes sobre MCP en el paladar.....	37
Migración de las células peridermales y su relación con la MCP.....	38
Participación de TGFβ-3 en la MCP del EM.....	39
Intercalación del epitelio basal.....	40
Función de la lámina basal en el proceso de fusión.....	40
CONCLUSIONES.....	42
PERSPECTIVAS.....	42
MATERIALES Y METODOS.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	46

RESUMEN

En esta tesis mostramos que durante la fusión del paladar, la muerte celular programada (MCP) es regulada por ácido retinoico (AR). El AR exógeno activa la apoptosis en diferentes tipos celulares *in vitro* y también en el embrión cuando se inyecta en ratonas preñadas. En el ratón mutante *Rarb^{-/-}/Rarγ^{-/-}*, la muerte interdigital está notablemente reducida. Algunos experimentos en extremidades de pollo utilizando un antagonista de los receptores del AR han demostrado la relevancia del AR en el control de la muerte celular interdigital. Nuestros estudios muestran que el AR endógeno es un regulador importante de la MCP de las arrugas y epitelio medial del paladar. En ambos lugares la muerte celular se bloquea por el citral, un inhibidor de la síntesis del AR. Un antagonista específico para los RAR llamado AGN193109 también reduce la muerte celular que normalmente ocurre, así como la inducida por un potente agonista llamado AGN191183. La expresión de *Bmp-7* es regulada positivamente por AR; sin embargo, la proteína BMP-7 aplicada exógenamente fue incapaz de activar la muerte celular en el tejido del paladar. NOGGIN un antagonista natural de los BMP, no bloquea la MCP. La reducción de la MCP en el epitelio medial con un inhibidor de caspasas genera paladares sin fusionar. La administración *in vivo* de AR incrementa la muerte celular del epitelio medial y genera paladar hendido con una incidencia del 73%. Entonces, tanto una reducción como un exceso de muerte celular durante la fusión del paladar son causas etiológicas en la generación de paladar hendido.

Se ha propuesto que la transformación epitelio-mesénquima que ocurre durante la fusión de las placas del paladar es un proceso fundamental para la degeneración del epitelio medial. Utilizando diferentes estrategias para marcar y seguir el destino del epitelio medial pusimos a prueba esta hipótesis y no encontramos ninguna célula epitelial sufriendo el proceso de transformación. Encontramos muy pocas células marcadas en el compartamento mesenquimático, y todas ellas fueron células muertas. Marcando específicamente las células peridermales, las células más externas que cubren el epitelio basal, observamos que los triángulos epiteliales, en los extremos oral y nasal no se forman por la migración de las células del epitelio medial sino más bien por las células peridermales. La inhibición de la migración o la remoción de estas células sugiere que tienen una función transitoria en el control de la adhesión y la sobrevivencia del epitelio medial y nos ha permitido proponer un mecanismo celular que explica la acción de *Tgfb-3*. La inhibición de las metaloproteinasas, que impide la transformación epitelio-mesénquima en otros sistemas, no tiene ningún efecto en la degradación del epitelio medial ni en la muerte celular. Dicha inhibición sólo impide la degradación de la lámina basal. Concluimos que la degradación del epitelio medial ocurre básicamente por muerte celular, y por primera vez demostramos que este proceso puede activar la degradación de

la lámina basal. Mostramos al final un modelo donde se relacionan los procesos que estudiamos alrededor de la fusión con la morfogénesis del paladar.

E

ABSTRACT

In this thesis we show that during secondary palate shelf fusion programmed cell death (PCD) is regulated by retinoic acid (RA). Exogenous RA as been shown to activate apoptosis of different cell types in culture and also in the embryo when injected into pregnant mice. In the compound mutant *Rarb β ⁻/Rary γ ⁻* mice, interdigital PCD is markedly reduced. Experiments in chick limbs using a RAR antagonist demonstrate the relevance of RA in the control of interdigital cell death. Our studies show that endogenous RA is an important regulator of the secondary palate PCD in the rugae and medial edge epithelia. In both places cell death was reduced by citral a RA synthesis inhibitor. AGN193109 a RAR specific antagonist also reduces the naturally occurring cell death and the induced by AGN191183, a strong RAR agonist. *Bmp-7* expression was positively regulated by RA, however exogenous BMP-7 protein was unable to activate cell death within the palate tissue. NOGGIN, a natural BMP antagonist, did not block PCD. PCD reduction at the MEE directly with a caspase inhibitor resulted in un-fused palatal shelves. *In vivo* administration of RA increase cell death in the medial edge epithelia and generates cleft palate with an incidence of 73%. Then a reduction or an excess of cell death during palatal fusion is an ethiological cause for cleft palate generation.

It has been reported that epithelial-mesenchymal transformation occurs during shelf fusion and is considered a fundamental process for medial edge epithelia degeneration. Using different labeling approaches to follow the fate of medial edge epithelial cells, we tested this hypothesis and we were unable to found any epithelial cell undergoing this transformation. Very few labeled cells were found in the mesenchyme compartment, and all of them were dying cells. By specific labeling of peridermal cells, the superficial cells that cover the basal epithelium, we observed that epithelial triangles at oral and nasal ends of the epithelial seam do not appear to result from MEE cell migration, but rather from migration of peridermal cells. Inhibition of migration or removal of these cells suggests that they have a transient function controlling MEE cell adhesion and survival and allowed us to propose a mechanism for the Tgf β -3 action. Inhibition of metalloproteinases, which prevents EMT in other systems, had no effect on medial edge epithelia degeneration and cell death, only basal lamina degradation is prevented. We conclude that MEE degeneration occurs almost uniquely by cell death, and for the first time we show that this process can activate basal lamina degradation. A model is shown at the end of thesis where all the proceses around epithelial fusion are related with the morfogenesis of secondary palate.

F

ANTECEDENTES

Muerte celular programada.

La muerte celular programada (MCP) es un fenómeno tan complejo e importante como la división y la diferenciación celular. Estos tres fenómenos están estrechamente relacionados y se encuentran sometidos a las señales que controlan la morfogénesis. La MCP ocurre en todos los organismos pluricelulares donde se le ha buscado y aún en organismos unicelulares como protozoarios (Arnoult et.al. 2001). La MCP es ante todo un fenómeno altruista, que genera un beneficio para el organismo en desarrollo y el adulto. La alteración de sus funciones durante el desarrollo embrionario origina malformaciones graves y en el organismo adulto enfermedades que pueden ser tan severas como el cáncer y la enfermedad de Alzheimer.

Walther Flemming, quien acuñara el término mitosis (entre otras cosas), publicó en 1885 un trabajo que es considerado como el primer reporte en el que se describen células muriendo con características que ahora conocemos como apoptóticas (Lockshin and Zakeri 2001). Flemming llamó cromatólisis o muerte celular cromatolítica a este fenómeno que inicialmente observó en células foliculares de ovario y más tarde en células germinales testiculares. Estas observaciones lo llevaron a proponer que esta muerte celular tenía una función fisiológica. Otros grupos también observaron células con características

similares en distintos organismos, de hecho se considera que al menos seis veces, de manera independiente, se describió el fenómeno de muerte celular (la última vez en 1972) y de igual forma se le denominó de diferentes maneras: se le llamó necrobiosis, citólisis, degeneración celular, desintegración celular, y más recientemente apoptosis.

El término muerte celular "programada" empezó a utilizarse para definir a aquella muerte que ocurre siempre en el mismo lugar y momento durante el desarrollo de los organismos. Fue acuñado por Lockshin y Williams en 1964 mientras estudiaban la muerte celular durante la metamorfosis en insectos (Lockshin and Williams 1964). Mas tarde Kerr propuso el término apoptosis para referirse a aquella muerte que presenta características celulares regulares y ordenadas, características que ocurren en la mayoría de las células en proceso de muerte (e.i. encogimiento de la célula y lobulación del citoplasma, poco daño a los organelos, condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, etc) (Kerr et al. 1972). Juntando ambos términos podemos decir que, la mayoría de las veces, la muerte celular programada ocurre por apoptosis.

Maquinaria de muerte.

Las características tan particulares de este fenómeno hacían pensar en la existencia de un programa genético responsable de los cambios morfológicos de la célula apoptótica y de su regulación espacio temporal a lo largo del desarrollo.

El estudio de la MCP a nivel genético comenzó a principios de los años ochenta utilizando al nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo (Horvitz and Ellis 1983). Este organismo es muy simple, tiene pocas células y se conoce el destino de todas ellas a partir del cigoto. Se sabe que siempre, 131 de las 1090 células que lo componen, mueren de manera predeterminada en tiempo y espacio (Sulston and Horvitz 1977). Mediante el análisis de mutantes se identificaron varios genes que participan en distintas etapas del proceso de MCP (activación, ejecución, engullimiento y degradación). Se encontró también que algunos de estos genes regulan positivamente la muerte celular y otros negativamente y que están conservados a lo largo de la escala filogenética, de manera que pueden complementarse las mutaciones en el nemátodo con los productos de genes homólogos de organismos superiores.

La mitocondria es un organelo central en el proceso de muerte celular apoptótica. En ella confluyen señales que procesa y amplifica y de ella parten los procesos moleculares que llevan a cabo la apoptosis (Ferri and Kroemer 2001). En cierta forma la mitocondria decide, y a partir de ella el proceso de muerte es irreversible. En la membrana externa de la mitocondria se localizan proteínas de la familia de BCL-2 que participan de manera importante en el control de la muerte celular. BCL-2 fue originalmente identificado como un oncogen relacionado con linfomas de células B. Existen dos tipos de proteínas en esta familia, unas con

actividad antiapoptótica, como BCL-x1, MCL-1 y BCL-2 mismos que presentan cuatro dominios denominados BH1 a BH4. Otras tienen actividad pro-apoptótica y se les clasifica según presenten un sitio de homología BH3, por ejemplo BID, BAD, BIM, Noxa y Puma o tres sitios BH1-3, como BAX, BAK y BOK (Newmeyer and Ferguson-Miller 2003). Existe evidencia de que Bax junto con Bid forman poros en la membrana externa de la mitocondria que permiten la salida de moléculas de alto peso molecular (2 megadaltones) Por estos poros se propone que sale el citocromo C y otras proteínas fundamentales para la apoptosis tales como AIF. En la formación de estos poros participa la cardiolipina, un lípido abundante en la membrana mitocondrial interna. BCL-x1 es capaz de prevenir directamente la función de estos poros (Kuwana et.al. 2002).

Otro mecanismo por medio del cual la membrana externa de la mitocondria puede volverse permeable es a través de un poro no específico denominado poro mitocondrial de transición de permeabilidad, que permite el paso de moléculas de 1.5 kDa y que se abre hacia la membrana interna. La apertura de este poro ocurre en condiciones de alto calcio y estrés oxidativo, condiciones comunes en el proceso de muerte celular (Halestrap et al. 2002). Se ha relacionado a BAX y a BID con la apertura de este poro de transición, sin embargo, se ha cuestionado la importancia de este poro en todos los tipos de muerte celular ya que puede haber liberación de proteínas de la mitocondria sin que existan los cambios asociados a la

formación de este poro de transición (e.g. la pérdida del potencial de membrana, el hinchamiento de la membrana interna y el rompimiento de la externa). La apertura de este poro y los cambios asociados al mismo parecen estar más relacionados con formas de muerte celular en las que el calcio y las especies reactivas de oxígeno están presentes en cantidades abundantes.

El citocromo C es una molécula que participa en la cadena transportadora de electrones pero que bajo diferentes condiciones apoptóticas es liberado por la mitocondria para formar parte del apoptosoma (Liu et al. 1996). El apoptosoma es un complejo formado por siete unidades de la proteína APAF-1 que forman una rueda con forma de hélice (Acehan and Akey 2002). A cada uno de los brazos de la hélice se une una molécula de citocromo C y en presencia de ATP es capaz de inducir la activación autoproteolítica de la caspasa 9.

Las caspasas son enzimas que participan de manera fundamental en la muerte celular. *Ced-3* fue originalmente identificado como un gen necesario para la MCP del nemátodo *C. elegans*. Al analizar la secuencia de *Ced-3* se observó que presentaba similitudes con la enzima interconvertidora de interleucina-1 β o ICE. Esta cistein-proteasa corta en residuos de ácido aspártico generando la forma madura de la interleucina (de ahí el nombre de caspasas). Tanto ICE como CED-3 se autoprocenan y, al ser sobre expresadas en fibroblastos de ratón, pueden inducir apoptosis (Miura et al. 1993). Después se identificaron más

proteínas de este tipo, la mayoría relacionadas con muerte celular y fueron subdivididas en tres familias: la de ICE, la de CED-3 y la de NEDD-2.

La activación del apoptosoma induce la autoproteólisis de la caspasa 9, la cual a su vez activa a la caspasa 3, desencadenándose una cascada proteolítica cuyos blancos son otras caspasas y diferentes proteínas, algunas relacionadas con el ciclo celular como Rb, PARP y MDM-2, otras estructurales como actina, lámina A y B, presenilinas, fodrina, y cinasas como FAK y MEKK-1. Uno de los blancos de las caspasas es la proteína ICAD. Esta se encuentra asociada inhibiendo a la DNasa CAD. Cuando es cortada, (posiblemente por la caspasa 3), libera a la nucleasa CAD y esta se transloca al núcleo donde corta al DNA en fragmentos internucleosomales (Enari et al. 1998). Existen muchos más substratos de las caspasas y otros eventos que aún no se conocen por completo pero que finalmente son los responsables del desensamblaje de la célula y de los cambios morfológicos típicos de la apoptosis. Esta es la ruta considerada como canónica de muerte celular apoptótica la cual también involucra señales que activan la fagocitosis, señales como la translocación de la fosfatidilserina de la membrana interna a la externa y otras menos conocidas que participan en la degradación de la célula dentro de los fagocitos.

Trabajos recientes realizados en *C. elegans* han demostrado que una parte importante del proceso apoptótico es

conducida por el fagocito que interactúa con la célula apoptótica (Reddien, et al. 2001). Alteraciones en la capacidad fagocítica retardan o inclusive evitan la apoptosis. Por lo tanto la fagocitosis no es un proceso posterior a la apoptosis o separado de ella que solamente se encarga de remover los fragmentos de la célula muerta, sino que forma parte central en el proceso de ejecución de la misma. De hecho, en muchos casos la fagocitosis empieza antes de que las células presenten características apoptóticas. Hay casos en los que es necesaria la presencia de macrófagos para que haya MCP, como ocurre durante la regresión de las células de la membrana pupilar (Lang and Bishop 1993).

Existen rutas de muerte celular que no requieren la activación del apoptosoma. Por ejemplo, algunos estímulos apoptóticos provocan la liberación de la proteína SMAC/DIABLO de la mitocondria al citosol. En el citosol se une a las proteínas IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis) y libera la represión que éstas ejercen sobre las caspasas 3,7 y 9 (Du, Fang et al. 2000). Otra vía alterna es la inducida por la flavoproteína AIF (factor inductor de la apoptosis) la cual se transloca de la mitocondria al núcleo e induce la degradación y condensación de la cromatina por una ruta que no involucra caspasas; además induce la permeabilización de la mitocondria y dispara la liberación de citocromo C, reforzando la señal apoptótica (Susin et al. 1999).

Durante el desarrollo embrionario del ratón, la MCP forma la cavidad proamniótica (por cavitación) (Coucouvani and Martin, 1995). Este es el primer evento en el que participa la MCP en la morfogénesis del ratón. Lo interesante de esta muerte celular es que no requiere de dos de las proteínas principales de la maquinaria de muerte, APAF-1 y caspasa 9. Además, el citocromo C tampoco participa en este tipo de muerte celular, ya que los ratones deficientes en citocromo C se desarrollan hasta los 10 días de gestación. En cambio, la proteína AIF es indispensable para la MCP que ocurre en la cavidad proamniótica (Joza and et.al. 2001). Es relevante mencionar que se han encontrado homólogos de esta proteína en todos los filas de metazoarios, incluyendo plantas y hongos, así como en algunos protozoarios que presentan muerte celular con características apoptóticas. En todos estos organismos donde participa este tipo de muerte no se han encontrado caspasas mediadoras de la MCP, por lo que se ha propuesto que esta ruta de muerte celular, la de AIF, es la mas ancestral y conservada.

La mitocondria es un organelo que fue adquirido por endosimbiosis. Podemos pensar que al inicio se trataba de una forma de parasitismo en el cual ambas células obtenían ventajas mutuas. Se ha propuesto que en este escenario, el organismo precursor de la mitocondria (una bacteria gram-negativa) podría querer liberarse o salir de la célula huésped y entrar en otra cuando las condiciones fueran desfavorables o cambiara su ciclo de vida.

El mecanismo para escapar de la célula pudo haber sido el precursor del fenómeno de la apoptosis (Frade and Michaelidis, 1997). Otro escenario podría ser aquel en el cual el estrés por escasez de nutrientes provocara que la mitocondria matara a su célula huésped y se conformaran los cuerpos apoptóticos, los cuales pudieran haber servido como paquetes alimenticios para otra célula y en los cuales la mitocondria podría viajar y, al ser fagocitados, entrar a otra célula. De hecho el citocromo C y AIF salen de la mitocondria y ejecutan partes fundamentales del proceso apoptótico: el citocromo activa al apoptosoma y AIF se transloca directamente al núcleo de la célula y participa en la degradación del DNA. Además, la salida de estos componentes de la apoptosis se encuentra asociado a la división o fisión de las mitocondrias (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003).

Muerte celular en el desarrollo.

La muerte celular es un tema recurrente durante el desarrollo embrionario de los metazoarios. En el ratón aparece por primera vez, y es necesaria para la formación de la cavidad proamniótica. A partir de este momento se presenta en diversas regiones, órganos y estructuras a lo largo de la ontogenia. La muerte celular del desarrollo se encuentra bajo el control de las señales y procesos morfogenéticos, es decir, es programada en el sentido de que está coordinada o programada con respecto al desarrollo. Por lo tanto su estudio no puede dissociarse de

los otros fenómenos celulares que participan en la morfogénesis ni su regulación y función de las interacciones celulares que construyen al organismo.

Es muy probable que la muerte celular en el desarrollo haya sido utilizada, a través de la evolución, como una estrategia para generar cambios en los organismos y/o corregir errores del desarrollo (Adachi-Yamada, 2002). Aunque existen algunas explicaciones o hipótesis al respecto, aún no es tan claro, por ejemplo, por qué la mitad de todas las células nerviosas del embrión de ratón son eliminadas apoptóticamente, o por qué la cavidad amniótica se forma por apoptosis de las células centrales y no por intercalación o expansión, como ocurre al formarse el blastocelo. Al parecer el embrión se tiene que asegurar la formación de suficientes células aún cuando más tarde sean eliminadas y aún a pesar de que esto implica un gasto energético y de información.

Se han propuesto tres funciones principales de la MCP durante el desarrollo: a) remover estructuras que no se requieren durante la vida adulta, por ejemplo la cola de los anfibios anuros (muerte filogenética); b) regular el número de células, como sucede durante la formación del sistema nervioso (muerte histogenética); c) modelar órganos y estructuras embrionarias, como en el caso de la desaparición del tejido interdigital (muerte morfogenética) (Glucksman, 1951).

Prácticamente en todos los procesos embrionarios donde hay

invaginaciones o evaginaciones de tejidos, fusión de estructuras o placas, cavitación y en muchas zonas de alta proliferación hay muerte celular. No se sabe, en la mayoría de los casos, cual es la función de esta MCP. Por ejemplo en la regresión del tejido interdigital (uno de los primeros y más estudiados modelos de MCP) participa en la individualización de los dedos. Actualmente se considera que la individualización de los dedos ocurre mediante la muerte celular del tejido interdigital que los separa. Sin embargo estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que ocurre en mayor medida por el crecimiento de los dígitos. Siendo precisos, la muerte celular no participa directamente en la individualización de los dedos, sino más bien en restringir, a través de matar, el crecimiento del interdígito (Salas-Vidal, et al. 2001).

En la mayoría de las regiones embrionarias donde hay MCP se desconoce su función. De la misma manera y a pesar de que las moléculas y cascadas que controlan la muerte celular apoptótica dentro de la célula se conocen bastante bien, en el contexto del desarrollo se ignoran en gran medida las señales del entorno que regulan la muerte. Entonces, tanto la función *per se*, como su regulación espacio-temporal es poco conocida, en particular en organismos complejos como el ratón.

En los últimos años se han estudiado moléculas reguladoras o inductoras de muerte celular en el desarrollo. Algunas de estas moléculas son factores de crecimiento de la familia de los

BMPs (BMP-2, 4, 7, TGF- β), factores transcripcionales como los MSXs, receptores nucleares de la familia del ácido retinoico, etc.

Los BMPs son factores de crecimiento pertenecientes a la familia de TGF- β . Noggin y otras proteínas como Folistatina y Cordina se unen a diferentes BMPs y evitan la unión con sus receptores. BMP-2, 4 y 7 se expresan en algunas regiones donde existe MCP (Macías, Ganan et al. 1997), y se ha demostrado que bloqueando el receptor BMPR-1B se puede evitar la muerte celular del tejido interdigital en pollo (Zou and Niswander, 1996). La expresión de la proteína Noggin en el tejido interdigital también bloquea la muerte celular (Guha, 2002). La aplicación exógena de las proteínas BMP-7 o 2 en las regiones interdigitales induce una abundante muerte celular (Macías, et al. 1997). Los BMPs se unen a receptores de membrana de tipo serin-treonina que fosforilan a proteínas denominadas SMADs las cuales forman complejos heteroméricos que se translocan al núcleo regulando la transcripción de sus genes blanco. Las SMADs 1, 5 y 8 se asocian con SMAD-4 después de la activación de los receptores. Por otra parte, si se activan los receptores de TGF- β , se activan SMAD-2 y 3 y se asocian con SMAD-4, común a ambas vías de transducción. Existen SMADs que regulan negativamente estas rutas de transducción. SMAD-6 regula negativamente la vía de BMP's y SMAD-7 la de TGF- β s. Por lo tanto dos maneras de determinar la

participación de BMP-7 en la muerte celular es bloqueando su función a través de regular negativamente su transducción sobre expresando SMAD-6, o bloqueando la capacidad de BMP-7 de unirse a su receptor, agregando la proteína Noggin.

Msx-2 se expresa en algunos lugares donde hay MCP, como los interdígitos (Salas-Vidal et al. 2001), primordios dentales (Jowett et al. 1993) y en los rombómeros 3 y 5 (Graham, et al. 1994). En estos rombómeros también se expresa *Bmp-4* y la función de ambos es promover la MCP de las células de la cresta neural (Graham, et al. 1994). Se sabe que si se expresa ectópicamente *Msx-2* en la parte posterior de una extremidad en desarrollo, se logra inducir la expresión de *Bmp-4*, inhibir la proliferación y promover la muerte celular en una región que no estaba determinada a morir (Ferrari, et al. 1998).

SHH es una proteína que regula numerosos procesos morfogénicos y proliferativos. En la extremidad se expresa en la zona polarizante donde regula la disposición anteroposterior del autópodo. Sin embargo se ha demostrado que también tiene una actividad apoptótica sobre estas células y otra antiapoptótica en las células del tejido interdigital (Sanz-Ezquerro and Tickle 2000).

Tgf β -2 es un gene que se expresa en la región digital y participa en la formación de cartílago. Si se administra esta proteína exógenamente en el interdígito se inhibe la MCP y se promueve la formación de un dedo extra. Esta capacidad para inhibir la MCP

también la presentan TGF β -1 y 3. Recientemente se observó que en el ratón mutante para los genes *Tgf β -2/Tgf β -3* la muerte interdigital se encuentra notablemente disminuida (Dunker, et al. 2002).

Al inicio del desarrollo de la extremidad, diferentes FGFs participan en el control de su crecimiento, promoviendo la proliferación de las células localizadas en la zona de progresión. Este efecto es regulado o controlado negativamente por BMPs. Mas tarde en el desarrollo, durante la morfogénesis del autópodo, FGF-8 participa en el control de la muerte celular. Cuando se agrega FGF exógeno en el interdígito se inhibe la MCP durante las primeras etapas de la regresión interdigital, pero después tiene el efecto contrario, generando un abundante incremento de muerte celular (Montero, et al. 2001). Este incremento puede ser revertido al agregar Noggin o Gremlin, antagonistas de los BMPs. En contraste, un inhibidor de FGF bloquea la muerte fisiológica y la inducida por BMP. En el mesodermo del autópodo se expresan los receptores para *Fgf 1, 2 y 3* y el receptor 3 es regulado por FGF y BMP en las zonas donde hay apoptosis. Lo anterior indica que en ausencia de FGF, BMP es incapaz de disparar la apoptosis. (Montero, et al. 2001).

Existen otras moléculas que participan en la MCP del desarrollo, particularmente en la que ocurre en el interdígito. Algunas de estas, como es de esperarse, son moléculas centrales en el control de la apoptosis. El ratón deficiente para el producto del gene *Apaf-1* presenta

una disminución en la muerte interdigital y por lo tanto la persistencia de esta membrana (Ceconi, et al. 1998). También la fusión del paladar es afectada por esa misma mutación. El ratón nulo para los genes *Bax/Bak* presenta las mismas alteraciones en las extremidades pero un desarrollo normal en el paladar (Lindsten, et al. 2000). Otros genes que se expresan en zonas de muerte celular o que participan en el control de la misma son *p53*, *Zfp-145*, *c-Fos*, *Gas1*, *Gas 2* y la *cinasa 5* dependiente de ciclina (Zuzarte-Luis and Hurlle 2002).

Fusión y muerte celular.

En la morfogénesis de muchos órganos y estructuras embrionarias participa la fusión de tejidos (Martin and Wood 2002); por ejemplo, el tubo neural se forma a partir de la placa neural, la cual se pliega sobre sí misma, converge en la parte dorsal y se fusiona. Asociada a esta fusión hay una gran cantidad de muerte celular. Si se bloquea la MCP con inhibidores de caspasas como el z-VAD, el tubo neural no se fusiona y permanece abierto (Weil, et al. 1997).

Otras regiones que se fusionan y que también presentan MCP durante su formación son el esternón, los párpados, la bolsa de Ratke (precursor de la glándula pituitaria), el septo nasal, los primordios faciales (e.g. labio superior), el primordio cloacal y el paladar entre otros. En estos casos se desconoce como participa la muerte, si es un requerimiento o si es una consecuencia de los fenómenos de

proliferación, diferenciación o migración celular.

El Acido Retinoico.

Metabolismo, señalización y función.

El ácido retinoico (AR) es una molécula presente en todos los cordados. Participa de manera fundamental en la morfogénesis y organogénesis a lo largo de prácticamente todo el desarrollo embrionario. Se produce a partir de la vitamina A llamada también retinol y tiene que ser tomada por la dieta ya que no puede sintetizarse *de novo* en células embrionarias ni de adulto. Se genera mediante dos oxidaciones consecutivas catalizadas por las enzimas alcohol (ADH) y aldehído deshidrogenasas (ALDH). Se conocen diferentes clases de estas enzimas así como diferentes compuestos que las inhiben (e.g. disulfiram, citral, 4-metilpirazol (Kikonyogo, et al. 1999), (Stratford, et al. 1996).

El AR es un isoprenoide de 20 carbonos de longitud con un anillo de ionilideno-beta y una cadena adyacente con enlaces dobles conjugados. Esta estructura permite la existencia de una gran cantidad de configuraciones isoméricas. En los mamíferos, en particular en el ratón, la isoforma mas importante es el AR "all-trans". En el pollo predomina el ácido didehidroretinoico (Stratford, et al. 1996), en el embrión de *Xenopus* predomina el AR 4-oxo (Blumberg 1996) y durante la regeneración de la extremidad en salamandras se sintetiza abundantemente el AR 9-cis (Viviano and Brockes 1996).

El retinol es transportado por la proteína de unión a retinol o RBP a través del suero sanguíneo para su potencial conversión en AR (Siegenthaler and Saurat 1989). Esta conversión ocurre en las células que presentan las enzimas necesarias para su síntesis, hecho que regula su disponibilidad espacio-temporal. Mediante análisis por cromatografía o HPLC, se ha demostrado que existen regiones del embrión en las que el AR es mas abundante. También los patrones de expresión de las diferentes enzimas alcohol y aldehído deshidrogenas indican que existe una distribución diferencial del AR (McCaffery and Dräger 1994). Por ejemplo, poco después de la gastrulación hay mas AR en la parte posterior del embrión que en la parte anterior. Al deletar el gene de la *Raldh-2*, responsable de establecer esta diferencia, los embriones mueren a la mitad de la gestación con malformaciones graves como acortamiento del tronco y proceso frontonasal, ausencia de extremidades y desarrollo reducido del corazón (Niederreither, et al. 1999). Asi mismo durante la formación de los rombómeros (cerebro posterior) (Dupe and Lumsden 2001), las extremidades (Thaller and Eichele 1987) y la retina (McCaffery, et al. 1992) hay mas AR en las regiones posteriores de estas estructuras. Existen diferentes enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas en estas regiones y otros órganos más.

Existen siete clases de alcohol deshidrogenasas de las cuales solo las de las clases I, II y IV presentan actividad de retinol deshidrogenasas. Estas catalizan el

primer paso en la oxidación del retinol (proceso reversible) generando retinaldehído. El segundo paso es irreversible y es catalizado por las aldehído deshidrogenasas. Existen tres clases de estas enzimas y solo las de la clase I tienen actividad de retinaldehído deshidrogenasa (Duester 1996). Otras enzimas como la P450 o CYP26 se encargan de la degradación del AR a formas mucho menos activas (eg. AR 4-oxo). La enzima CYP26 tiene un patrón de expresión complementario al de la retinaldehído 2 al inicio del desarrollo embrionario, por lo que se propone que su función es la de restringir, a través de degradar, la disponibilidad de AR en regiones anteriores del embrión (Swindell, et al. 1999).

El AR activa la transcripción al unirse a receptores nucleares. Se conocen más de 150 diferentes proteínas de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroide-tiroideas (Mangelsdorf and Evans 1995). Estos receptores unen moléculas de carácter lipofílico que pueden entrar fácilmente a la célula. Son receptores intracitoplasmáticos que al unirse con sus ligandos se translocan al núcleo activando la transcripción. Los receptores para el AR son de dos tipos, RAR y RXR. Se expresan en distintos lugares durante el desarrollo embrionario y tienen preferencia a responder a diferentes isoformas de AR; generalmente los receptores RAR son activados por el AR all-trans y en ocasiones por el 9-cis y los de tipo RXR solamente por el 9-cis (Blumberg 1997). Cada receptor presenta

las formas α , β y γ y para la generación de cada uno de ellos existe un uso diferencial de promotores así como procesamiento diferencial. Los de tipo RAR actúan como heterodímeros obligados y los de tipo RXR pueden funcionar como homodímeros (Mangelsdorf and Evans 1995). En los últimos años se ha estudiado su participación en el desarrollo. Para ello se han deletado de los diferentes genes por medio de recombinación homóloga o "knock out". Algunos ratones mutantes no presentan alteraciones en el desarrollo, pero otros presentan malformaciones que son más evidentes o graves cuando se entrecruzan los mutantes. Algunos tienen malformaciones que recapitulan parcialmente las provocadas por la ausencia de vitamina A (Lohnes, et al. 1994; Mendelsohn, et al. 1994), malformaciones que colectivamente se conocen bajo el nombre de síndrome fetal por deficiencia de vitamina A o VAD (Wilson, et al. 1953). Estas malformaciones son muy variadas; por ejemplo, hay anomalías craneofaciales y del esqueleto (paladar y labio hendido, hipertelorismo, lisencefalia, microftalmia, sirenomelia etc.), alteraciones en órganos como el corazón, pulmones, riñones, gónadas, tracto genito-urinario, ojos, etc. Es importante resaltar que muchas malformaciones por deficiencia de vitamina A son semejantes o iguales a las que genera el exceso de vitamina A y AR.

Existen sitios consenso en el DNA denominados RAREs a los cuales se unen los receptores de AR para activar la transcripción. Consisten de secuencias

repetidas directas AGGTCA separadas por uno (DR1) o más nucleótidos (DR 2, 3, 4, 5), a los que se unen los receptores RAR y RXR con afinidades que dependen de los nucleótidos que separan las DR y de su homo o heterodimerización (Leid, et al. 1992). Estas secuencias son también sitios de unión para los receptores de hormona tiroidea y vitamina D, con las que en ocasiones heterodimerizan los receptores RXR. Otro elemento adicional de complejidad está dado por las proteínas CRABP (proteína de unión a AR) y CRBP (proteína de unión a retinol) (Ong and Chytil 1978; Ong and Chytil 1978) las cuales se ha propuesto que regulan la cantidad y/o accesibilidad del AR y retinol a los diferentes compartamentos celulares y los protegen de la degradación por enzimas como la citocromo P-450.

En suma el AR participa en diversos procesos celulares: diferenciación, proliferación y muerte celular. En la morfogénesis participa en el establecimiento de patrones corporales en el eje antero-posterior (e.g. regula genes homeóticos), especificando la parte posterior del embrión, también en el establecimiento del eje corporal izquierdo-derecho, en la organogénesis del corazón, del pulmón, de la retina, del cerebro posterior, en el inicio de la formación de la extremidad, el establecimiento de su eje antero-posterior, etc.

AR y su participación en la muerte celular del desarrollo.

Es conocido que durante la metamorfosis de insectos y anfibios la

MCP de muchas estructuras está regulada por la ecdisona y la hormona tiroidea, moléculas que actúan a través de receptores de la misma familia a la que pertenecen los receptores de AR (Hall and Thummel 1998; Das, et al. 2002). También se sabe que la administración de dosis teratogénicas de AR genera un incremento en la muerte celular en aquellas regiones del embrión donde normalmente ya está ocurriendo este proceso (Sulik and Dehart 1988; Sulik, et al. 1988), o en aquellas regiones donde esta próxima a ocurrir. Así mismo la expresión de algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis de AR (e.g. *Raldh-2*) y algunos receptores (en particular el RAR- β) colocaliza con varias regiones apoptóticas. Nuestro laboratorio ha reportado que la administración de AR provoca apoptosis en células de cuerpos embrionarios, células derivadas de la masa celular interna de un blastocisto. Esta muerte celular se encuentra asociada a un incremento en la producción de radicales libres y puede prevenirse suministrando proteínas antioxidantes como catalasa o superóxido dismutasa (Castro-Obregón and Covarrubias 1996). Por otra parte, existe una cepa de ratones mutantes denominada "hammertoes" los cuales nacen con los dedos fusionados debido a que no sufren el proceso natural de muerte celular interdigital. Sin embargo cuando se administra AR a las ratonas gestantes se logra reactivar la muerte interdigital y el fenotipo se revierte (Zakeri and Ahuja 1994).

Una evidencia muy importante sobre la participación del AR en la MCP

proviene del análisis del ratón mutante para los receptores RAR β /RAR γ . Este ratón presenta una reducción en la muerte celular interdigital, por lo que también nacen con los dedos fusionados. Esta reducción en la muerte celular está acompañada por una disminución notoria en la expresión del gene *Bmp-7* en el tejido interdigital (Dupé, et al. 1999). Recientemente otro grupo demostró que el AR regula directamente la MCP en los interdígitos de pollo. En estos experimentos incrementan la muerte interdigital aplicando AR exógeno y la impiden aplicando un antagonista que bloquea la acción transcripcional de los receptores RAR. En esta condición también hay una reducción en la expresión de *Bmp-7* (Rodríguez-Leon, et al. 1999). Las anteriores son dos de las evidencias mas sólidas que existen acerca de la regulación por AR de la muerte celular embrionaria.

AR como teratógeno.

Desde hace muchos años se conocen los efectos teratogénicos provocados por dosis excesivas de vitamina A y sus derivados. Uno de los mas potentes es el AR all-trans. El efecto teratogénico depende de las dosis y etapa del desarrollo en el que se suministre. Se ha reportado toda una serie de malformaciones principalmente craneofaciales y en extremidades (Abbott, et al. 1989). El AR induce la generación de exoencefalia y espina bífida, en algunos casos genera ciclopia, micrognatia, generación de extremidades posteriores

extras, mesomelia, transformaciones homeóticas en vértebras, duplicaciones o deleciones de dígitos, situs inversus, paladar hendido, malformaciones del oído, ojos etc. Esta amplia gama de alteraciones se debe en parte a la cantidad de eventos celulares en los que está involucrado el AR de manera normal. Otras se explican por su capacidad para inhibir la expresión de moléculas importantes para el desarrollo, como *Shh* (Helms, et al. 1997). Otras más se deben a su capacidad para exacerbar la muerte celular o para inducir la en regiones donde normalmente no la hay. Se ha propuesto que la etiología de algunas de estas malformaciones, como tubo neural abierto y mesomelia, se deben al incremento en la muerte celular durante su morfogénesis. Por ejemplo, el acortamiento de las extremidades, (mesomelia) se debe en parte a la muerte celular excesiva que provoca en el ectodermo apical, estructura reponsable del crecimiento de la extremidad (Sulik and Dehart 1988). En principio, cualquier alteración en la muerte morfogenética tendrá un efecto teratogénico.

Desarrollo del paladar

Origen y desarrollo.

El paladar secundario tiene la función principal de separar la orofaringe de la nasofaringe. Es una estructura presente únicamente en los vertebrados amnióticos, aunque existen primordios o estructuras homólogas en algunos peces (Shah, et al. 1990).

En el ratón se origina alrededor del día 12 de la gestación. Inicialmente

son dos primordios simétricos que emergen del proceso maxilar, los cuales se forman a su vez a partir del primer par de arcos branquiales. Poco después se forman dos placas que crecen primero en posición vertical con respecto al techo de la boca y alrededor de los 14 días de gestación se elevan y adquieren una posición horizontal. En este momento se encuentran muy cerca una placa de la otra y alrededor de los 14.5 días post coito (dpc) hacen contacto, se adhieren y se fusionan (Ferguson 1988). La fusión implica la desaparición del epitelio que separa ambas placas llamado epitelio medial (EM). Mas adelante el paladar se osifica en la parte central de la región anterior (paladar duro) quedando sin osificar la parte posterior (paladar blando).

En las aves no se da el proceso de fusión, de manera que existe una abertura a lo largo de ambas placas. Esto es igual en la mayoría de los reptiles aunque en los cocodrilos si hay fusión y formación de una sola estructura. (Ferguson 1987).

En el humano la formación de paladar hendido puede revertirse mediante cirugía, sin embargo y a pesar de que es una alteración leve en un órgano simple, es letal en otros mamíferos ya que altera la capacidad para comer y respirar adecuadamente. El paladar hendido es una de las malformaciones más comunes en el ser humano, su incidencia es de alrededor de 1 en 700 nacimientos en los Estados Unidos, 1 en 400 en poblaciones

asiáticas y americanas y la más baja incidencia ocurre en poblaciones africanas que es de 1 en 1500 nacimientos. Esta malformación tiene múltiples etiologías, cualquier alteración de los procesos que participan en su formación pueden generar paladar hendido. Diferentes compuestos químicos (Abbott and Birnbaum 1989; Abbott, et al. 1989) y alteraciones en varios genes (Lohnes, et al. 1994; Kaartinen, et al. 1995; Miettinen, et al. 1999) generan paladar hendido. De hecho el paladar embrionario se utiliza como modelo *in vitro* para probar diferentes compuestos con potencial teratogénico (Abbott and Buckalew 1992).

Proceso de fusión.

La fusión del paladar ocurre después de una serie ordenada de procesos. El primero es el crecimiento, elevación y acercamiento de ambas placas. Después sigue el contacto y la adhesión entre los epitelios del borde más exterior. Este es el llamado EM y presenta características diferentes al epitelio de la región oral, (el cual esta estratificado y se queratiniza posteriormente) y al de la parte nasal (éste se convierte en un epitelio secretorio). El EM esta conformado por dos tipos de células, las epiteliales basales y las peridermales. Las primeras tienen una morfología cuboidal y se encuentran en contacto con la lámina basal. Las segundas son células que se encuentran encima de las basales, están

en contacto con el líquido amniótico y tienen morfología redonda y aplanada. Después de que los epitelios de ambas placas se adhieren, forman una sola capa de células epiteliales denominada juntura epitelial media. Esta capa celular tiene que desaparecer para permitir la continuidad del mesénquima subyacente y completarse la fusión. Cualquier alteración de estos procesos potencialmente puede generar paladar hendido.

Adhesión.

El EM presenta características morfológicas y moleculares particulares. Produce proteoglicanos que le confieren propiedades adhesivas (Pratt and Hassell 1975); de hecho, la adhesión entre ambas placas es tan fuerte que al tratar de separarlas es más fácil que se rompa el epitelio de alguna de ellas antes de que se separen.

El EM expresa diferentes factores de crecimiento como *Tgf-β3*, el receptor *III* a *Tgfb*, *Egf*, el receptor a *Egf*, *Tgf α*, *Bmp-7*, *Fos*, *colagenasa 3*, *α actina* de músculo liso y otros (Fitzpatrick, et al. 1990; Dixon, et al. 1991; Ferguson, et al. 1992; Citterio and Gaillard 1994; Blavier, et al. 2001). Es importante mencionar que el ratón mutante para *TGFβ-3* presenta como única malformación paladar hendido (Proetzel, et al. 1995). El análisis del EM en este ratón demuestra que hay una deficiencia en la capacidad adhesiva, las células peridermales no producen

proteoglicanos y no emiten prolongaciones citoplasmáticas que normalmente interdigitan al momento del contacto (Martínez-Alvarez, et al. 1996).

Muerte celular.

Desde hace muchos años se demostró que durante la degeneración del EM, las células que lo conforman presentaban características de tipo apoptótico (DeAngelis and Nalbandian 1968; Farbman 1968; Smiley and Dixon 1968; Mori, et al. 1994; Taniguchi, et al. 1995). Aunque en esa época el término se desconocía o no se utilizaba, las descripciones morfológicas (principalmente haciendo uso de la microscopía electrónica) indican que esta es muerte celular de tipo apoptótica. Esta idea predominó hasta que nuevos estudios sugirieron que el EM desaparecía por migración o transformación epitelio-mesénquima. La idea, o propuesta, de que el EM desaparece mediante este mecanismo celular, a pesar de no presentar evidencias claras, fue sustituyendo a la de la muerte celular y es la que prevalece actualmente (Martínez-Alvarez, et al. 2000) (Young, et al. 2000).

Migración.

Existe un sólo reporte donde se muestra que la desaparición del EM, y por lo tanto la fusión, ocurre por migración. En este trabajo marcan el EM con un colorante lipofílico fluorescente y siguen su destino mediante

microscopía confocal. Observaron una acumulación de células marcadas en los vértices del epitelio oral y nasal al mismo tiempo que desaparecían de la parte central del epitelio. En consecuencia asumieron que las células del EM se estaban integrando a estos epitelios (Carette and Ferguson 1992).

Transformación epitelio-mesénquima

La transformación epitelio mesénquima (TEM) es la trans diferenciación de una célula de tipo epitelial, en una de tipo mesenquimático. Una vez transformada, la célula mesenquimática adquiere la capacidad migratoria necesaria para su localización lejos de su lugar de origen donde participa en la formación de distintos tipos celulares y estructuras (Boyer, et al. 1996). La célula transformada siempre tiene una función posterior.

Este fenómeno se ha reportado con detalle y rigor en varias estructuras embrionarias. Durante el desarrollo del corazón, por ejemplo, se sabe que las células endoteliales que recubren la región correspondiente al canal atrioventricular se transforman en mesénquima, migran a través de la matriz extracelular subyacente y forman los precursores de las válvulas del corazón (Markwald, et al. 1975). También las células de la cresta neural se forman cuando el epitelio dorsal del tubo neural se transforma en mesénquima. Estas células migran a diferentes regiones del embrión formando células nerviosas,

melanocitos, cartílago, tejido conectivo y otras (Duband, et al. 1995).

Durante la TEM ocurren cambios importantes en las células transformadas, estos cambios son bastante drásticos, implican el cambio total del fenotipo epitelial al mesenquimático o viceversa, lo que se asocia con cambios en la expresión de diferentes moléculas de adhesión (Prieto and Crossin 1995), matriz extracelular y citocinas (e.g. EGF, FGF-1, TGF- β etc.).

Existen varios reportes en los que observan TEM de las células del EM (Fitchett and Hay 1989; Shuler, et al. 1991; Griffith and Hay 1992; Shuler, et al. 1992; Kaartinen, et al. 1997; Martinez-Alvarez, et al. 2000). El primer trabajo que reporta este fenómeno de TEM fue realizado mediante microscopía electrónica. En los otros artículos generalmente utilizan colorantes lipofílicos para marcar el epitelio y seguir el destino de estas células. En todos los casos la presencia de células transformadas es muy baja y algunos datos son poco claros. A pesar de esto se menciona en la literatura al paladar como uno de los pocos órganos donde la TEM ocurre, y es esta idea la que prevalece actualmente.

El paladar como modelo de estudio de muerte celular en el desarrollo.

El paladar es una estructura que puede ser cultivada *in vitro* mediante la técnica denominada cultivo de órganos. El desarrollo *in vitro* es muy

similar a lo que sucede *in vivo*. Durante el desarrollo del paladar hay MCP en dos regiones, las crestas y el EM. Ambas muertes son reproducibles bajo las condiciones de cultivo. En las crestas, la MCP esta asociada a la proliferación y crecimiento de esa estructura. En cambio, la MCP en el EM no está asociada a proliferación (de hecho este tejido no prolifera desde los 13.5 dpc, mucho tiempo antes de que ocurra la fusión). Podemos decir que la primera es muerte celular de tipo histogénética y la segunda de tipo morfogenética. Estos dos tipos de MCP en el mismo órgano permiten ensayar los efectos de diferentes compuestos sobre ambos tipos de muerte a la vez y realizar comparaciones que nos faciliten discernir diferencias y similitudes en la regulación de la MCP. De hecho en los explantes que se emplearon en este trabajo están presentes también los primordios de los futuros molares. En la parte central de estos primordios hay una abundante MCP en las mismas etapas del desarrollo en que nosotros estudiamos la muerte de las crestas y EM. Aunque no hemos analizado esta MCP, que es de tipo morfogenética, resulta interesante también hacer comparaciones con las otras dos regiones de MCP.

El paladar al estar conformado por dos estructuras simétricas permite, por ejemplo, realizar cultivos mixtos entre placas de diferentes etapas del desarrollo o con otras que pudieran sobre expresar o ser deficientes en algún

gen relacionado con apoptosis, adhesión o migración celular. Por esta razón consideramos que el paladar es un buen modelo para abordar el estudio de la MCP.

Muerte celular en la morfogénesis de la extremidad.

La extremidad en desarrollo es uno de los modelos más estudiados y que más ha aportado a la biología del desarrollo en los últimos años. Es un modelo relativamente sencillo en el que se han estudiado procesos de determinación celular, competencia, segmentación, establecimiento de los patrones antero-posterior, dorso-ventral, proximo-distal y muerte celular.

La muerte interdigital se ha estudiado principalmente en el embrión de pollo. En la parte posterior de la extremidad hay una zona de muerte celular denominada región necrótica posterior. Muchos de los primeros experimentos sobre MCP se hicieron transplantando esta región en otras adyacentes. La intención de estos experimentos era determinar la competencia de este tejido para morir y la influencia del entorno. La remoción del epitelio distal del interdígito es un experimento clásico con el que se demostró que existen señales provenientes de ese epitelio que controlan la MCP (Zuzarte-Luis and Hurle 2002).

En los últimos años se ha abordado el estudio de la MCP en la extremidad a nivel molecular. Entre las moléculas

que regulan la muerte interdigital están miembros de la familia de BMP, en particular BMP-2, 4 y 7, los cuales se expresan en estas y otras regiones de muerte celular y son capaces de acelerar el proceso cuando se aplican exógenamente (Macías, et al. 1997). De manera contraria, si se bloquea la actividad de los receptores a BMP se evita la MCP (Zou and Niswander 1996). Hay también factores transcripcionales como MSX-1 y 2 que regulan la muerte celular; se sabe que si se expresa *Msx-2* en regiones proximales de la extremidad se induce muerte celular (Ferrari, et al. 1998). Otra molécula importante es el AR; la ausencia simultánea de los receptores beta y gama provoca sindactilia como consecuencia de la reducción en la muerte interdigital (Dupé, et al. 1999). Por otro lado, la inhibición de la actividad transcripcional de los receptores de tipo RAR también impide la muerte interdigital y abate la expresión de *Bmp-7* (Rodríguez-Leon, et al. 1999).

JUSTIFICACION.

La premisa “el AR endógeno participa en la muerte celular del desarrollo” fue la idea principal con que inició este trabajo. La idea general, que es la hipótesis con la cual empezamos, se originó a partir de los trabajos realizados en el laboratorio con el modelo de cuerpos embrionarios y el efecto del AR (Castro-Obregón and Covarrubias 1996). En este estudio se

demonstró que el AR era capaz de inducir muerte celular apoptótica concomitante a un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Al disminuir las ERO con antioxidantes como catalasa y SOD se impide la MCP en los cuerpos embrionarios. También basamos nuestros estudios iniciales con el trabajo que se realizó en nuestro laboratorio utilizando el modelo de cultivo de extremidades embrionarias. En este sistema el AR es capaz de inducir e incrementar la muerte celular en las regiones distales de la extremidad e interdígitos y puede revertirse al bloquearse la síntesis de AR (datos no publicados). Paralelamente se realizó otro trabajo en el cual se demostró que las ERO son más abundantes en las regiones destinadas a morir, en particular en los interdígitos (Salas-Vidal, et al. 1998). Esta muerte, al igual que en los cuerpos embrionarios, se puede revertir por medio de la adición de antioxidantes. Adicionalmente, otro trabajo de nuestro laboratorio muestra que el incremento de muerte celular provocado por AR en los interdígitos es acompañado por un incremento en la cantidad de ERO y por una disminución en la actividad de peroxidases (Schnabel-Peraza, artículo sometido). La hipótesis de trabajo también se basó en las evidencias expuestas en el apartado denominado "Acido retinoico y su participación en la muerte celular del desarrollo" y "AR como teratógeno". Cabe mencionar que cuando iniciamos este trabajo no

existían evidencias directas de la participación del AR en la muerte celular embrionaria. Con esto en mente nos propusimos demostrar el efecto *in vitro* e *in vivo* del AR sobre la muerte del paladar y su relación con la formación de paladar hendido. El estudio de la MCP nos llevó a profundizar en el proceso de la fusión de epitelios y, en conjunto, al relacionar y entender un poco más los fenómenos alrededor de la fusión tales como adhesión, extensión convergente, migración, etc, nos llevó a concretar este trabajo sobre morfogénesis.

RESULTADOS

I. Control de la muerte celular por AR.

Desarrollo de órganos *in vitro* (ventajas del sistema de cultivo)

El desarrollo del paladar y la extremidad, usando el sistema de cultivo de órganos, es muy eficiente y recapitula los eventos de crecimiento y MCP que ocurren *in vivo*. La extremidad cultivada desde etapas en las que la muerte celular no ha comenzado se desarrolla hasta etapas en las que la individualización de los dígitos es bastante avanzada. A su vez el paladar puede ser cultivado en etapas previas a la fusión y todos los procesos celulares que *in vivo* permiten la degeneración del EM ocurren *in vitro*. Este mismo sistema es utilizado para cultivar una gran variedad de órganos y estructuras embrionarias, como gónadas,

riñones e hígado, y el ejemplo de desarrollo *in vitro* mas impresionante ocurre en el pulmón, el cual si se cultiva cuando presenta solo un par de lóbulos puede generar una estructura con abundantes ramificaciones y alveolos.

Muerte celular durante el desarrollo del paladar.

Con la finalidad de entender mejor la participación de la muerte celular en el desarrollo, determinamos los patrones naturales de muerte utilizando anaranjado de acridina. Cuando este colorante es utilizado en tejidos vivos es capaz de revelar las células en estado de apoptosis de manera selectiva, es decir, no detecta células necróticas (Abrahams and White, 1993). El mecanismo de su acción selectiva se debe a que la célula apoptótica se vuelve mas permeable y la cromatina se condensa; esto favorece la entrada y el marcaje mas intenso de los cuerpos apoptoticos. También analizamos la muerte utilizando la técnica denominada TUNEL.

A los 12.5 días post coito (dpc) hay muerte celular en las dos primeras crestas del paladar y en la bolsa de Rathke (precursor de la pituitaria) (Fig 2A del artículo). A los 13.5 dpc se observa MCP en las crestas anteriores pero no en el EM (Fig 2A del artículo). A los 14.5 dpc en ningún momento previo al contacto de las mitades hay MCP.

Con una evaluación mas cuidadosa de la MCP al momento del contacto observamos las siguientes características: a) cuando se establece el

contacto en la parte anterior (al nivel de la cresta 3 a 6) podemos detectar células muriendo en la parte posterior del paladar, región que no ha entrado en contacto (Fig 2A, 14.5 d,e,f, del artículo). b) mas adelante en el desarrollo, empiezan a aparecer las primeras células muriendo en la parte anterior (Fig 2A, 14.5 e,f, del artículo), esta muerte celular depende o se desencadena por el contacto y sabemos que *in vitro* se requiere de al menos tres horas de contacto para que comience (Fig 3A del artículo). Esta muerte celular es precedida por una adhesión muy fuerte. Cuando se intentan separar las placas es mas fácil que se rompa el epitelio de alguna de ellas a que se despeguen. c) en la parte correspondiente al paladar posterior observamos un patrón punteado de MCP que posiblemente esté asociada a la formación de papilas gustativas (Fig 2, 15.5 del artículo).

Estos resultados evidencian dos regiones diferentes en el paladar, una zona anterior donde están las crestas y cuya muerte celular depende de contacto y una zona de fusión posterior, que no requiere de contacto para iniciar la muerte celular y en la que hay papilas gustativas que también presentan MCP.

Efecto del AR *in vitro*.

Al aplicar 20 μ M de AR en el medio de cultivo observamos dos efectos sobre la muerte celular. Por un lado se incrementa la muerte en las regiones donde normalmente ya está ocurriendo (Fig 4 A del artículo) y por el otro induce la que aún no empieza,

como la del EM antes del contacto (Fig 3A del artículo). El retinol provoca también los mismos efectos aunque hay que administrarlo en mayor concentración, 200 μ M. El retinol por sí mismo no tiene actividad biológica, debe convertirse en AR para poder tener un efecto, por lo tanto el incremento de muerte celular provocado por el retinol implica que en el paladar existen las enzimas encargadas de su síntesis. Este efecto del AR sobre la muerte celular también ocurre *in vivo* (ver más adelante).

Los datos anteriores muestran una especificidad tanto del efecto como de las células que responden al AR. Es interesante mencionar que la capacidad del AR para inducir muerte celular sea temporal ya que solamente ocurre en paladares próximos a fusionarse y no en aquellos de 13.5 dpc (Fig 3B del artículo). Esta capacidad aparece poco a poco en el desarrollo a partir de los 14.0 dpc (Fig. I) y posiblemente se relacione con la aparición de *Tgf β -3*, ya que éste no se expresa a los 13.5 dpc pero sí a los 14.5 (Fig. II).

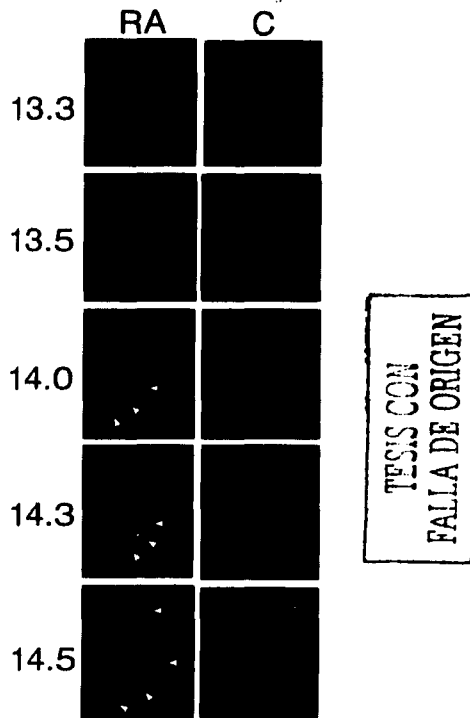


Fig. I. Tratamiento con AR por 10hr en placas de diferentes etapas del desarrollo. El AR induce muerte celular en el EM alrededor de los 14.0 dpc (flechas). La placa complementaria se utilizó como control.



Fig. II. Hibridación contra *Tgf β -3*. La expresión aparece alrededor de los 14.0 dpc. En 13.5 no se detecta señal.

Además existe en 14.5 dpc una capacidad del epitelio para morir en respuesta al contacto que no existe en placas de 13.5 dpc. Cuando se impide el contacto de una placa de 14.5 dpc con su contraparte, la MCP no es tan abundante o evidente (Fig 3A, -contacto del artículo) como cuando hay el estímulo del contacto (Fig 3A, +contacto del artículo) aun cuando eventualmente empieza a aparecer después de 6 hr aproximadamente. Si se administra AR en ausencia de contacto es posible inducir muerte celular abundantemente en un lapso de tiempo similar al que ocurre si se pusieran en contacto (Fig 3A, at-RA del artículo).

Inhibición de la síntesis de AR.

Se han usado diversas estrategias para evitar la acción del AR y poder analizar el efecto biológico de su ausencia. Una de ellas es utilizar inhibidores de las enzimas encargadas de su biosíntesis o de la actividad transcripcional de los receptores. El citral es un inhibidor reversible de las alcohol y aldehído deshidrogenasas que se ha utilizado con éxito en muchos modelos (ratón, pollo y *Xenopus*) para bloquear la producción de AR (Kikonyogo, et al. 1999) (Schuh, et al. 1993). Además de bloquear las dos enzimas tiene la ventaja de que existe el nerol, compuesto que tiene un grupo alcohólico en vez de un grupo aldehído y que puede ser utilizado como control pues no presenta actividad inhibitoria. En el presente trabajo utilizamos

también un agonista y un antagonista de los RAR (Johnson, et al. 1995).

El tratamiento con 50 μM de citral en paladares próximos a fusionarse provoca la inhibición del proceso de MCP analizado después de 8 hr de cultivo (Fig 4A del artículo) (después de 24 hr de cultivo la inhibición se mantiene). Con el tratamiento simultáneo de citral (50 μM) más retinol (200 μM) se mantiene la inhibición, el citral evita la biosíntesis de AR a partir del retinol tanto endógeno como exógeno. En el tratamiento simultáneo con citral y AR observamos que la muerte celular no disminuye. En este caso el citral estaría inhibiendo la biosíntesis del AR endógeno pero la administración de AR exógeno permite que el proceso de muerte ocurra de manera casi normal. Los tratamientos con nerol no tienen efecto sobre la muerte celular y el paladar se fusiona adecuadamente. Los paladares tratados simultáneamente con nerol y AR o retinol presentan un comportamiento parecido a los tratamientos con AR y retinol solos, es decir, un incremento en la muerte.

Para confirmar los datos anteriores utilizamos un agonista sintético específico de los receptores de AR de tipo RAR llamado AGN191183. Este compuesto incrementa la muerte celular de la misma forma en que lo hace el AR, sugiriendo fuertemente que su efecto es mediado por receptores de tipo RAR. Utilizando el antagonista

AGN193109 se reduce la cantidad de muerte celular presente en el paladar y disminuye la que genera el AR o el agonista sintético (Fig 4B del artículo).

Algunos genes regulados por AR en el paladar.

Consideramos importante analizar tres moléculas que participan en la MCP en otros sistemas y que se expresan en el paladar, así como determinar si están reguladas transcripcionalmente por AR. Se ha reportado la expresión de *Shh* en las crestas del paladar (Bitgood and McMahon, 1995) y *Tg β -3* en el EM (Fitzpatrick, et al. 1990; Pelton, et al. 1990). Nosotros determinamos que *Bmp-7* se expresa en ambas regiones del paladar. Las tres moléculas han sido estudiadas ampliamente y sus rutas de señalización y transducción son bien conocidas, de manera que su estudio podría revelar algún mecanismo molecular involucrado en la muerte celular mediada por AR.

Los experimentos muestran que *Shh* deja de expresarse en las crestas en presencia de AR y también de citral (20 y 50 μ M respectivamente) después de 10 hr de cultivo (Fig 5 B, C del artículo). Esta inhibición la hemos observado desde las 5 hr de cultivo. Ambos efectos pueden parecer contradictorios pero existen reportes que apoyan estos resultados. En algunos casos el AR inhibe la expresión de *Shh* (Helms, et al. 1997) y en otros el AR es necesario para su expresión (Helms, et al. 1994). Estos resultados no correlacionan con el efecto

sobre la muerte celular que tiene el AR, de manera que es poco probable que *Shh* participe directamente en la muerte de las crestas. Un dato que apoya esta afirmación lo obtuvimos aplicando un inhibidor de la señalización por *Shh* llamado ciclopamina. Este inhibidor es muy potente y se ha utilizado por muchos grupos de investigación para estudiar las funciones de *Shh* (Incardona, et al. 1998). Este inhibidor utilizado en concentraciones similares (5 μ M) y aún mas altas a las reportadas para bloquear la señal de SHH (10 y 20 μ M), no altera el patrón de MCP que se observa en las crestas (datos no mostrados). Probablemente su función tenga mayor relación con la alta proliferación celular que ocurre en esta estructura.

La expresión de *Tg β -3* disminuye con el tratamiento con AR (Fig 5 L del artículo), con citral se incrementa (Fig 5 M del artículo), y el resto de las condiciones no alteran la transcripción de este gene. Este comportamiento no correlaciona con la muerte celular. Resulta improbable entonces que *Tg β -3* sea regulado por el AR positivamente y que participe directamente en la muerte celular del EM. Aún así decidimos realizar algunos experimentos aplicando la proteína de manera exógena y bloqueando la endógena con anticuerpos neutralizantes.

La expresión de *Bmp-7* coincide con la MCP tanto en el EM como en las

crestas y su expresión disminuye con citral (Fig 5H del artículo) y aumenta con AR (Fig 5G del artículo), tal y como ocurre con la muerte celular. Este resultado coincide con otros reportes que muestran datos similares, por ejemplo, el AR regula la muerte interdigital a través de aumentar la expresión de *Bmp-7* en las extremidades de pollo. Nuestros datos muestran que si se bloquea la producción de AR disminuye la expresión de *Bmp-7* coincidiendo con lo reportado por otros grupos. Considerando lo anterior decidimos estudiar en mayor detalle esta correlación.

BMP-7 en la muerte celular de la extremidad y el paladar

Inicialmente se aplicó la proteína BMP-7 embebida en micro esferas. Las esferas fueron implantadas en diferentes regiones del paladar (Figura 6A del artículo) y la muerte celular se analizó después de 10 y 24 hr de cultivo. En ninguna región observamos que BMP-7 provocara MCP. En presencia de AR no detectamos un incremento de muerte celular mayor a la que induce el propio AR.

Para bloquear la acción de la proteína endógena aplicamos de la misma manera la proteína Noggin. Tampoco observamos disminución en la MCP en las crestas y el EM.

Realizamos experimentos similares utilizando la extremidad como modelo. Tanto BMP-7 como Noggin mostraron los efectos esperados, es decir, BMP-7 induce

una abundante muerte celular cuando se aplica en el interdígito y Noggin la previene (Fig. 6C, D del artículo). Observamos que BMP-7 también es capaz de provocar muerte celular en otras regiones de la extremidad como la punta de los dígitos y tarso, regiones donde no se expresa normalmente *Bmp-7*. Los datos anteriores muestran que las proteínas utilizadas tienen la actividad esperada y concuerdan con datos reportados en la literatura por otros grupos (Macias, et al. 1997) (Merino, et al. 1998). Por lo tanto la falta de efecto en el paladar no se debe a que las proteínas no sean funcionales.

Otra serie de experimentos los realizamos infectando con un adenovirus que produce la proteína SMAD-6 con la finalidad de bloquear la transducción por BMP-7. La infección la realizamos incubando paladares de 13.5 dpc durante 1.5 hr con 15 μ l de sobrenadante que contiene el adenovirus. Después de este tiempo se lavaron los paladares con medio de cultivo L15 y se pusieron en cultivo. Cabe mencionar que previamente realizamos una infección con otro adenovirus que produce Lac-Z para determinar las mejores condiciones de infección (Figura 6E del artículo). Después de 24 hr de la infección analizamos la muerte celular y no detectamos cambios en los patrones y cantidad de MCP en las crestas y en la zona de fusión.

Los resultados anteriores los corroboramos nuevamente en el tejido interdigital. En estos experimentos inyectamos con una micropipeta una pequeña cantidad del mismo sobrenadante

(aprox 0.01 μ l). Previamente hicimos pruebas con el mismo adenovirus que expresa Lac-Z para determinar la cantidad y extensión de la infección (Figura 6F del artículo). Después de 24 hr de la infección detectamos una reducción en la MCP de la zona interdigital inyectada (Figura 6 G,H del artículo). Estos resultados muestran que el adenovirus es capaz de infectar eficientemente y generar el efecto esperado.

Las estrategias que utilizamos son iguales a las reportadas por otros grupos y logramos reproducir los efectos que se atribuyen a BMP-7 en el control de la MCP de la extremidad. Por lo tanto los resultados negativos obtenidos en el paladar fueron inesperados y sugieren que BMP-7 no participa directamente y no es esencial en la MCP de esta estructura como ocurre en el interdígito. Nuestros datos difieren de los reportados para otras estructuras embrionarias como los interdígitos y los rombómeros (Graham, et al. 1996; Macias, et al. 1997).

TGF β -3 y la MCP.

TGF β -3 es un factor de crecimiento necesario para la formación del paladar. La acción de TGF β -3 no se ha relacionado con MCP, al menos en el caso del paladar. Por esta razón realizamos experimentos enfocados a determinar su posible participación en la MCP. Mediante inmunohistoquímica detectamos tanto a TGF β -3 como a uno de sus receptores, el receptor de tipo 3 o betaglicano. El patrón de ambas proteínas ya se ha reportado por

otros grupos y se encuentra restringido al EM (Fitzpatrick, et al. 1990; Cui and Shuler 2000).

Realizamos experimentos en los que adicionamos la proteína TGF β -3 recombinante a cultivos de paladar. Estos cultivos los realizamos en paladares de 13.2, 13.5, 14.0 y 14.5 dpc. Agregamos la proteína al medio o embebida en esferas de acrílico (1mg/ml). En ningún caso observamos un aumento de la MCP en el EM. También aplicamos un anticuerpo neutralizante específico para TGF β -3 bajo las mismas condiciones. En ningún caso detectamos una reducción en la MCP del EM. Estos datos nos muestran que, con estas estrategias, TGF β -3 no regula la MCP de manera directa o única, como lo hace BMP-7 al aplicarse en la extremidad. Además los resultados al inhibir la migración de las células peridermales indican que su función tiene más relación con la adhesión y la migración (ver discusión).

La muerte celular en la etiología del paladar hendido.

Inhibición de la MCP y su efecto en la fusión.

Un paso fundamental para la fusión del paladar es la desaparición del EM, por lo tanto, nos preguntamos si la inhibición de la MCP de este epitelio impide la fusión. Puede resultar simplista, pero la idea prevaleciente en la literatura es que la desaparición de

este epitelio ocurre por TEM y no por muerte celular.

La aplicación de 100 μM de z-VAD (inhibidor de amplio espectro de caspasas) inhibe la MCP en las crestas y en el EM. También bloquea la muerte celular inducida por AR y retinol, indicando que esta muerte es de tipo apoptótica (Fig. 7A del artículo) El análisis histológico después de 24 hr de cultivo demuestra que el EM no desaparece en presencia de 100 μM de z-VAD. El citral, al bloquear la síntesis de AR y disminuir la MCP genera un efecto similar al del z-VAD (Fig. 7B del artículo). Por lo tanto, la MCP es necesaria para la fusión. Alteraciones en la muerte de este epitelio, ya sea una disminución o un aumento, potencialmente pueden generar paladar hendido.

Incremento de la MCP y su efecto en la fusión (efecto teratogénico del AR).

Se sabe que la aplicación de AR o retinol provoca una alta incidencia de paladar hendido en ratonas gestantes, sin embargo nunca se ha propuesto ni relacionado la muerte celular como causa etiológica de esta malformación. Por lo anterior y con base en los resultados obtenidos *in vitro* decidimos aplicarlo *in vivo* en embriones de aproximadamente 14.2 dpc, etapa previa a la fusión de las placas.

El análisis de los paladares disecados a los 18.5 dpc muestra una incidencia de un 73 % de paladar hendido (Fig 8 G, H del artículo). Este

fenotipo pudiera deberse a un incremento prematuro en la muerte celular del EM, tal y como ocurre en los experimentos *in vitro*. Por lo tanto evaluamos la MCP después de 6-8 hr de la inyección, en etapas (14.8 dpc) en las que el paladar debería estar ya fusionado. Observamos que los paladares muestran una abundante MCP en las crestas y en el EM en etapas previas al contacto (Fig 8 C, D del artículo) así como en los que ya están fusionándose (Fig 8 A, B del artículo).

Utilizando la técnica de TUNEL sobre cortes histológicos, confirmamos esta inducción prematura de muerte celular en el EM (Fig 8 E, F del artículo). Proponemos que la alteración en el orden de los eventos, es decir, MCP antes de adhesión (contrario a lo que sucede normalmente), genera paladar hendido.

Los datos anteriores muestran que tanto una disminución como un incremento en la muerte celular se relacionan con la formación de paladar hendido.

II. Análisis de los procesos celulares que participan en la fusión.

La transformación epitelio-mesénquima.

En el laboratorio hemos estudiado el proceso de MCP asociado a la fusión. Nuestros resultados muestran que las células del EM del paladar sufren muerte celular apoptótica. Sabemos también que si bloqueamos la MCP se evita la degradación de este epitelio. Sin

embargo no podemos descartar la posibilidad de que también esté ocurriendo la diferenciación de este epitelio en mesénquima.

Las evidencias reportadas en las que se apoya la hipótesis de la TEM consideramos que son pobres y poco claras, por lo tanto, decidimos analizar este fenómeno y determinar si mantiene relación con la MCP y cual pudiera ser la función de estas células una vez transformadas.

Decidimos estudiar el destino de las células del EM siguiendo diferentes estrategias, algunas previamente utilizadas por otros grupos: (1) marcamos el epitelio con colorantes fluorescentes y seguimos el destino de las células mediante histología a diferentes tiempos del cultivo. (2) implementamos una metodología recientemente publicada utilizada para estudiar migración celular (Knight, et al. 1999). (3) infectamos el EM con un adenovirus que produce Lac-Z para posteriormente seguir el destino de las células infectadas. (4) para la última estrategia se utilizó una línea de ratones que expresa la proteína verde fluorescente constitutivamente. Cultivamos una mitad fluorescente con otra normal y posteriormente seguimos el destino de las células fluorescentes.

1) Marcaje y seguimiento del EM en cortes alternados.

La degeneración del EM en nuestro sistema de cultivo ocurre en poco menos de 24 hr, de manera muy similar a lo que

ocurre *in vivo*. Así entonces, cualquier fenómeno celular que participe en la fusión debe ser detectado en este lapso. Inicialmente marcamos el EM con un colorante fluorescente que una vez dentro de la célula no puede pasar a otras células ni atravesar la lámina basal llamado ester de 5-6-carboxi 2-7- diclorofluorescein diacetato (CSFCE). Marcamos el epitelio y realizamos un seguimiento del mismo a 3, 6, 12 y 24 hr. Previamente reportamos que existen diferencias entre la parte anterior del paladar (paladar duro) y la parte posterior (paladar blando) con relación al inicio de la MCP (Cuervo, et al. 2001), por lo tanto, decidimos analizar el EM tanto en la parte anterior (aproximadamente al nivel de las crestas 2-4) como en la posterior (a la mitad del paladar posterior).

Después de 3 hr de contacto la adhesión es bastante fuerte y no hay signos de degeneración o migración celular en el EM (Fig. 1A, CCFSE, del segundo artículo). Seis horas después del contacto, el epitelio comienza a fragmentarse y empiezan a conformarse los triángulos epiteliales (engrosamientos del epitelio en los vértices oral y nasal). Tampoco detectamos células fluorescentes fuera del EM. Doce horas después del contacto la fragmentación es mayor y la degradación del epitelio es completa a las veinticuatro horas. En ninguna de las etapas analizadas detectamos células adquiriendo la típica morfología mesenquimatosa ni tampoco células migrando fuera del epitelio como lo han reportado otros grupos (Fitchett and Hay 1989; Shuler, et al. 1991; Griffith and

Hay 1992; Shuler, et al. 1992; Kaartinen, et al. 1997; Martínez-Alvarez, et al. 2000).

Con esta misma estrategia de marcaje realizamos un análisis histológico sistemático cada 12 μm a lo largo de toda la zona de fusión en paladares cultivados por 24 hr. Inicialmente analizamos 364 cortes y solamente detectamos 22 células fluorescentes en la región donde previamente se encontraba el EM y que posiblemente pudieran representar células epiteliales transformadas en mesénquima. Sin embargo todas estas células presentaban una morfología lobulada típica de la apoptosis. Posteriormente realizamos un experimento similar donde además analizamos simultáneamente la MCP mediante la técnica de TUNEL. En esta serie de experimentos analizamos 92 cortes y detectamos 12 células que potencialmente pudieran ser mesenquimáticas. En estas células detectamos una señal positiva para la reacción de TUNEL, indicando que están en proceso apoptótico (Tabla 1, segundo artículo). Con este análisis descartamos la posibilidad de interpretar erróneamente a estas células como mesenquimáticas. Estas son en realidad los restos de células epiteliales apoptóticas que quedan al final del proceso de fusión.

2) Seguimiento en rebanadas vivas.

Recientemente fue publicada una metodología que permite el seguimiento de células migratorias *in vivo* utilizando un sistema de cultivo de rebanadas (Knight, et al. 1999). Consiste básicamente en embeber el tejido en agarosa al 5%, cortar

con un vibratomo rebanadas de 200 μm y cultivarlas. Esta metodología nos permitió seguir el destino de las células del EM en un mismo corte y de manera continua. Después de 3 hr de contacto el EM está íntegro y no hay signos de degeneración (Fig. 2 del segundo artículo). Después de 6 hr empieza a adelgazarse y los triángulos epiteliales se han formado claramente (flechas). Después de 12 hr el epitelio está fragmentado y no hay células marcadas fuera de él. A las 24 hr, aunque hay una gran cantidad de fragmentos fluorescentes en donde previamente estuvo el EM, no hay células transformadas que hayan migrado hacia el mesénquima adyacente. Estas células fragmentadas coinciden en su mayoría con células apoptóticas (TUNEL). En ningún momento observamos TEM ni migración celular.

3) Marcaje LacZ por infección adenoviral.

La infección con un adenovirus que produce Lac-Z se realizó en paladares de 13.5 dpc los cuales fueron cultivados por 24 hr + 3, 6, 12 o 24 hr. Básicamente observamos el mismo resultado que con los ensayos anteriores (Fig. 1 del segundo artículo). No detectamos células azules con morfología de mesénquima fuera de la línea de fusión. Después de 24 hr de cultivo el EM prácticamente había desaparecido y las únicas células azules observadas corresponden al epitelio oral y nasal. Analizamos 60 cortes de 50 μm tomados a todo lo largo de la línea de fusión y no detectamos células azules que presentaran morfología mesenquimatosas. Este dato también muestra que es muy baja

la probabilidad de que alguna célula infectada del epitelio se haya transformado en mesénquima.

4) Cultivos mixtos con paladares de ratones GFP.

Utilizamos para estos experimentos un ratón que expresa la proteína verde fluorescente en todos los tejidos. Después de 3 hr de cultivo hay una adhesión fuerte y el epitelio se encuentra íntegro (ver campo claro) (Fig 1 del segundo artículo). Después de 6 hr el epitelio presenta condensaciones celulares que corresponden a cuerpos apoptóticos, los cuales se hacen más abundantes y evidentes a las 12 hr de cultivo (flechas). A las 24 hr el epitelio ha desaparecido, solamente registramos una pequeña cantidad de cuerpos apoptóticos y no presenciamos en ningún momento migración celular o células con morfología mesenquimatosa. Este análisis también muestra que las células del MES una vez adheridas se intercalan (Fig 1. asteriscos, 6 y 12 hr del segundo artículo), fenómeno celular que no sabíamos que ocurría. Esta intercalación de células se ha observado y estudiado en otros organismos y se le ha denominado extensión convergente. Su función es la de permitir el crecimiento o extensión de una estructura sin que exista proliferación celular.

Adicionalmente, observamos que el epitelio adyacente a la zona de fusión migra de una mitad a la otra (Fig. 1B del segundo artículo). Posiblemente este movimiento de rearrreglo tenga como finalidad cerrar el espacio epitelial que

queda después de que ha ocurrido la MCP en los triángulos epiteliales.

Función de las células peridermales.

El EM esta conformado por células epiteliales cuboidales y por células peridermales que presentan prolongaciones que se interdigitan cuando entran en contacto una placa del paladar con la otra (Martínez-Alvarez, et al. 2000). Estas interdigitaciones están ausentes en el ratón mutante para la proteína TGF β -3, el cual presenta paladar hendido. Se ha propuesto que las células peridermales participan en la adhesión que precede a la fusión.

Conformación de los triángulos epiteliales

Marcamos las células peridermales con un pulso por 30 segundos de colorante CSFCE (molécula fluorescente). Este tiempo es suficiente para marcar y poder seguir las células peridermales selectivamente. El epitelio basal, no se marca notoriamente y es fácil distinguir ambos tipos celulares.

Después de 2 hr de contacto observamos a las células peridermales en medio del epitelio basal y no detectamos MCP (Fig. 5 del segundo artículo). Después de 4 hr observamos una acumulación de células en los vértices del EM formando los llamados triángulos epiteliales y unas cuantas células apoptóticas. Seis horas después es clara la acumulación de células peridermales en los extremos del epitelio y empiezan a desaparecer de la zona central. En esta etapa detectamos con la técnica de TUNEL una abundante MCP en la zona de los

triángulos epiteliales. Una parte de estas células apoptóticas son peridermales (células doblemente marcadas, amarillas) y otras son del epitelio basal (células rojas) (Fig. 5 del segundo artículo). Podemos decir con estos resultados que los triángulos epiteliales se conforman a partir de las células peridermales y poco tiempo después mueren.

Adhesión

Se ha propuesto que las células peridermales desempeñan una función en la adhesión de las placas del paladar. Para corroborar esta idea decidimos removerlas con tripsina. Después de ensayar diferentes condiciones pudimos eliminarlas selectivamente sin dañar el epitelio basal (ver materiales y métodos). Observamos que efectivamente al eliminar las células peridermales no se forman los triángulos epiteliales y no son necesarias para que el epitelio basal degenera, es decir, puede haber fusión *in vitro* sin que exista el peridermo. Sin embargo se genera una área de fusión menor y el grosor del paladar se reduce (Fig. 7A del segundo artículo). Si removemos las células peridermales y mantenemos las placas sin contacto observamos que el epitelio basal empieza a morir (Fig. 7B del segundo artículo). Por lo tanto, las células peridermales al parecer favorecer la sobrevivencia del epitelio basal. Es posible, aunque difícil de comprobar experimentalmente, que la sobrevivencia de las células peridermales también dependa de su interacción con las basales. Cuando migran las células peridermales y forman los triángulos

epiteliales dejan descubiertas a las células basales. Este mecanismo podría ser el que desencadena la MCP de ambos tipos celulares.

Migración y MCP.

Para discernir el efecto que tiene la migración de las células peridermales en el control de la MCP utilizamos un inhibidor de la polimerización de actina, la citocalasina D, la cual inhibe la migración celular y la formación de filopodios. Observamos que 5 μ M de citocalasina evita la migración de las células peridermales y por lo tanto la formación de los triángulos epiteliales (Fig. 6A del segundo artículo). En consecuencia también el área de fusión es menor y el grosor del paladar disminuye. Lo más notable de este experimento es que se inhibe la MCP de manera específica en el EM y no en las crestas. Lo anterior sugiere una relación directa entre la migración y la muerte celular (Fig. 6B, C del segundo artículo).

Una característica de la MCP en el desarrollo es que depende de la síntesis de proteínas. Nosotros realizamos algunas pruebas con cicloheximida (20 μ g/ml) y observamos que efectivamente la MCP se inhibe tanto en las crestas como en el EM (Fig. III)



Fig. III. El tratamiento con cicloheximida bloquea la muerte celular en el EM y las crestas.

Mediante análisis histológicos confirmamos que la MCP es necesaria para la desaparición del EM, pero además, observamos que no hay formación de triángulos epiteliales pues también se inhibe la migración de las células peridermales (Fig IV).

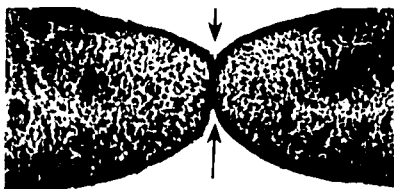


Fig. IV. Histología de un paladar tratado con cicloheximida durante 6 hr. La migración de las células peridermales se inhibe y no hay formación de triángulos epiteliales (flechas).

Esta inhibición es casi inmediata, después de 2 hr de tratamiento no hay signos de que las células peridermales se hayan movido hacia los vértices del paladar. Este efecto lo observamos a lo largo de todo el cultivo y se mantiene hasta por 24 hr, que fue el tiempo máximo al que lo evaluamos. Entonces la migración es necesaria para que haya MCP y requiere de

la síntesis de proteínas. Es importante mencionar que el fenotipo obtenido al bloquear la migración es una fenocopia del observado en el paladar mutante para $TGF\beta$ -3.

Dinámica y participación de la lámina basal durante la MCP.

Se sabe que la viabilidad de los epitelios depende de su interacción con proteínas de matriz extracelular (lámina basal) vía integrinas. Todo epitelio que pierde contacto con la lámina basal entra en apoptosis. A este fenómeno celular se le ha denominado anoikis. (del griego, "sin casa"). Existía la posibilidad de que la MCP del EM pudiera ser inducida a través de este mecanismo. Es posible, como ocurre por ejemplo con el conducto de Wolff o con el epitelio glandular mamario, que las células del mesénquima subyacente, degraden la lámina basal, y a consecuencia de esto ocurra la degeneración del epitelio.

Normalmente después de 12 hr de cultivo la lámina basal se rompe en múltiples sitios y su degradación es notoria. Cuando bloqueamos la MCP con 100 μ M de z-VAD, la lámina basal permanece íntegra, indicando que su degradación depende de, o es conducida por, las células epiteliales, pero solamente cuando están en proceso de apoptosis (Fig. 3 del segundo artículo). Este dato demuestra que la muerte del EM no es de tipo anoikis. Determinamos también que la degradación de la lámina basal es dependiente de la MCP y no del contacto de las placas del paladar. Induciendo

muerte celular con AR en ausencia de contacto, observamos degradación de la lámina basal únicamente donde normalmente hay MCP, en particular en las zonas donde hay células apoptóticas (Fig. 4 del segundo artículo). Este efecto lo corroboramos induciendo muerte celular con un inductor de apoptosis muy potente, la estauroporina (Fig. 4 del segundo artículo) En este caso también la degradación de la lámina basal ocurre preferentemente debajo de las células apoptóticas pero exclusivamente en la zona del EM.

Las metaloproteinasas son necesarias para la fusión pero no para la MCP.

La degradación de la lámina basal ocurre por medio de las metaloproteinasas, por lo tanto una manera de corroborar los resultados anteriores es bloqueando su actividad y determinar si en esta condición se afecta la muerte celular (solo si fuera un caso de anoikis) o solamente la degradación de la lámina basal (como hacían suponer los resultados anteriores).

Por otra parte, la TEM requiere de metaloproteinasas, las cuales permiten la separación y migración del epitelio transformado. Si este fenómeno ocurriera en el paladar deberíamos poder bloquearlo al inhibir la acción de las metaloproteinasas.

Efectivamente la aplicación de un inhibidor de amplio espectro para metaloproteinasas (10 μ M de BB-3103) evitó la degradación de la lámina basal pero no la MCP (Fig. 3 del segundo artículo) Este dato confirma las

observaciones anteriores: la degradación de la lámina basal es posterior al proceso de MCP y es a través de la acción de metaloproteinasas. Por lo tanto, no estamos ante un fenómeno apoptótico de tipo anoikis en el cual la sobrevivencia de una célula epitelial depende de la integridad de la lámina basal. Nuestros datos contradicen otros publicados recientemente por otro grupo (Blavier, et al. 2001). Ellos reportan que la aplicación de este mismo inhibidor a la misma concentración que nosotros la usamos, evita la degradación del EM.

DISCUSION

El paladar como modelo de MCP durante el desarrollo embrionario.

A pesar de que el paladar no es uno de los modelos más estudiados, presenta características que lo hacen un buen sistema para abordar preguntas que actualmente interesan a la biología del desarrollo. Es uno de los órganos o estructuras más simples del embrión, tanto en su formación como en su función. En biología del desarrollo es importante utilizar modelos sencillos, como organismos filogenéticamente primitivos o bien organismos más avanzados pero al inicio de la ontogenia. De estos organismos se pueden aislar y cultivar, para su mejor estudio, estructuras, regiones u órganos en las etapas iniciales del desarrollo.

El paladar es una estructura de aparición relativamente reciente en los vertebrados, sólo se encuentra en amniotes, peces y anfibios no tienen esta estructura.

En su morfogénesis participan fenómenos celulares como la competencia celular, interacciones epitelio-mesénquima, polaridad dorso-ventral, antero-posterior y próximo-distal, extensión convergente, adhesión, MCP, etc.

A lo largo de los últimos años se ha encontrado que muchos de los mecanismos moleculares y celulares responsables del desarrollo se encuentran conservados filogenéticamente a un nivel mucho más profundo del esperado, al grado que los conceptos homólogo y análogo entran en conflicto (e.g. en la formación de alas, aletas y extremidades o en la formación de los órganos de la visión, ojos, ocelos, etc), (Rodríguez-Esteban et.al. 1997) (Gehring 2002). De igual manera están conservados los mecanismos moleculares y celulares que operan al inicio de la morfogénesis de la mayoría de los órganos. Por ejemplo, al inicio del desarrollo de la extremidad, los arcos branquiales, los primordios dentales, la vesícula ótica, las eminencias gangliónicas y otras estructuras, se expresan repetidamente factores de la familia de DLX, FGF's y BMP's. Reiteradamente se han reclutado estrategias ya probadas por la evolución para la formación de estructuras nuevas. Para el caso del paladar, no se han estudiado las etapas iniciales del desarrollo por lo que es interesante entender los mecanismos que fueron reclutados para la formación de esta estructura que, como ya se mencionó, apareció *de novo* con los amniotes.

El paladar se origina a partir del primer par de arcos branquiales (Ferguson

1988). Estos se forman con células provenientes de la cresta neural las cuales también participan en la formación de diversas estructuras faciales. La cresta neural está conformada por células migratorias que se originan en la parte dorsal del tubo neural y dan origen a una gran variedad de tipos celulares según su localización a lo largo del eje antero-posterior. En los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio del desarrollo de las estructuras craneofaciales y la participación de las células de la cresta neural e interacciones epitelio-mesénquima.

MCP asociada a la fusión (EM) y a la proliferación (crestas)

A los 14.5 dpc el EM del paladar es un tejido que ya no prolifera a diferencia de las crestas, las cuales se encuentran proliferando activamente. Estas diferencias hacen del paladar un buen sistema para estudiar dos tipos o condiciones de MCP en el mismo órgano. Existen diferencias y similitudes a nivel molecular y también en su respuesta a diferentes estímulos apoptóticos. Ambas regiones expresan *Bmp-7*, y responden de manera similar al AR, es decir, en ambas estructuras el AR induce un incremento de la muerte celular. Sin embargo, la competencia para morir en el EM aparece a partir de los 14.0 dpc, a diferencia de las crestas, las cuales responden en etapas previas desde el momento en que morfológicamente son distinguibles. Ambas muertes pueden evitarse al bloquearse la síntesis de proteínas o con el uso de z-VAD, pero

solamente la del EM puede ser bloqueada al inhibir la migración celular utilizando citocalasina.

El AR en el control de la MCP.

Competencia

La capacidad para responder de manera específica a un estímulo dado es llamada competencia. El EM no siempre responde al AR. La competencia para poder morir aparece gradualmente a partir de los 13.8 dpc. En etapas previas, el AR no induce muerte celular. Esta competencia correlaciona con la expresión de *Tgf β -3*, el cual no se expresa en el EM antes de los 13.5 dpc. También correlaciona con la detención de la proliferación, que ocurre alrededor de los 13.5 dpc (ver esquema al final). *Tgf β -3* es un factor relacionado con la inhibición de la proliferación en muchos tipos epiteliales; de hecho su acción sobre epitelios es citostática, a diferencia de su acción sobre células mesenquimáticas, donde es mitogénica. Es posible que el EM adquiera la competencia para poder morir cuando ha cesado la proliferación, a consecuencia de la expresión de *Tgf β -3*. Adicionalmente, la capacidad teratógena del AR para inducir paladar hendido estaría entonces relacionada con esta ventana de competencia. Si se induce muerte celular antes del contacto, la adhesión queda comprometida y el proceso de fusión no ocurre de manera normal.

Existe también una competencia para poder morir en respuesta al contacto; esta se observa a los 14.5 dpc. En esta

etapa el contacto acelera o induce el proceso de MCP. Si se impide, la muerte celular es menos abundante, pero aparece eventualmente. Esta competencia no la presentan paladares de 13.5 dpc. Si ponemos en contacto una mitad de 13.5 dpc y una de 14.5 dpc, la MCP solo se observa en aquella de 14.5 dpc. Al parecer no es un factor difusible el que permite esta competencia ya que el paladar de 14.5 dpc no activa la MCP en la mitad de 13.5 dpc. Existen reportes previos que muestran que esta competencia para morir en respuesta al contacto no es específica, es decir, puede ser inducida por contacto físico con un filtro u otro órgano (Miller and Shapiro 1968). Nosotros hemos visto que poniendo en contacto una mitad con un pedazo de cubreobjetos se induce MCP.

No tenemos conocimiento de que en la literatura exista algún fenómeno similar en el que el contacto acelere o desencadene la muerte celular. Es posible que el contacto sea la señal que promueva la migración de las células peridermales y como consecuencia de esta migración comience la MCP.

El AR endógeno en el control de la MCP.

Cuando bloqueamos la síntesis de AR en el paladar la MCP se inhibe. Esta muerte puede ser restablecida al adicionar AR pero no retinol. La acción de un inhibidor de la actividad transcripcional de los RAR (AGN193109) disminuye la MCP natural y reduce la inducida por un agonista sintético de los RAR (AGN191183). Este último dato sugiere que la acción apoptótica del AR es

mediada por receptores de tipo RAR. Sabemos por datos recientemente obtenidos en el laboratorio (L. Rendón) que los receptores de tipo RAR gama y RXR alfa se expresan en el mesénquima adyacente al EM (Fig. V). Es posible que la señalización del AR provenga del mesénquima hacia el epitelio. Todos los datos anteriores demuestran que el AR endógeno participa en la MCP del paladar.



Fig. V. Hibridación contra los receptores RAR γ y RXR α . La expresión se restringe al mesénquima adyacente al EM.

En la literatura existen solo dos reportes recientes en los que se propone que el AR participa en la MCP. Estas evidencias fueron obtenidas utilizando la extremidad como modelo y sugieren que la muerte por AR ocurre a través de inducir la expresión de *Bmp-7* y *Bmp-4* así como de *Msx-2*. Al bloquear la actividad transcripcional de los RAR, la expresión de *Msx-2* se inhibe (Rodríguez-Leon, et al. 1999). Por otro lado, *Msx-2* es capaz de inducir la expresión de *Bmp-4*, expresión asociada también con apoptosis (Ferrari, et al. 1998). Por lo tanto, se ha propuesto que la muerte interdigital es iniciada por el AR al inducir a *Bmp-7* y éste a *Msx-2* (estos dos últimos pueden regularse mutuamente). Nuestros resultados demuestran que el AR endógeno controla

la MCP de dos estructuras embrionarias más: las arrugas o crestas y el EM. Esto implica que podría existir un mecanismo común utilizado por otras estructuras embrionarias para regular la apoptosis. Por ejemplo, en la región de los rombómeros 3 y 5 (cerebro posterior) hay expresión de *Msx-2* y *Bmp-4* y también se sabe que hay producción de AR.

Sin embargo, en el caso del paladar no hay expresión de *Msx-1* y *2* y BMP-7 no tiene actividad proapoptótica. En los rombómeros se ha determinado que es necesaria la expresión de *Msx-2* para que *Bmp-4* tenga actividad proapoptótica (Graham, et al. 1994).

Miembros de la familia de TGF beta en la MCP de la extremidad y el paladar.

En el paladar se expresan al menos tres miembros de la familia de los factores BMPs, *Bmp-4*, *Bmp-7* y *Tgf β -3*. La relación de estas tres moléculas con la MCP y su respuesta al AR (ninguna para *Bmp-4*, positiva para *Bmp-7* y negativa para *Tgf β -3*) nos hizo pensar en la posibilidad de la regulación de la MCP a través de alguna de estas moléculas. *Bmp-7*, a diferencia de las otras dos, respondió de manera positiva al AR, además se expresa en las dos regiones donde hay MCP. Otros reportes demuestran que el AR participa en la muerte de la extremidad. Por estas razones realizamos experimentos enfocados a definir la participación de BMP-7 en la MCP del paladar. Nuestros resultados fueron inesperados en el sentido de que no hubo ningún efecto sobre la muerte al

administrar la proteína BMP-7 exógenamente. Tampoco logramos reducir la MCP al agregar Noggin, proteína antagonista de BMP-7. Este mismo tipo de experimentos los realizamos también con la extremidad en desarrollo.

En este modelo BMP-7 es capaz de inducir notoriamente la muerte celular cuando se aplica tópicamente en la región interdigital. Si se aplica una esfera embebida de BMP-7 en la punta de los dígitos también es capaz de inducir muerte celular. Noggin revierte el efecto proapoptótico de BMP-7 y reduce la MCP que normalmente ocurre durante la regresión del interdígito. En presencia de citral, BMP-7 no es capaz de inducir muerte celular. Esto concuerda con otros reportes que muestran que la acción de BMP-7 sobre la MCP es mediada por AR (Rodríguez-Leon, et al. 1999). Así mismo, la sobre expresión de SMAD-6, antagonista de la transducción de BMPs, reduce la muerte interdigital pero no la del paladar. Estos resultados demuestran que BMP-7 no participa directamente en la muerte de las crestas y EM. Su expresión pudiera estar más relacionada con la atracción de macrófagos a los sitios donde hay MCP. Esta es una hipótesis que nos gustaría explorar más adelante.

En la extremidad, a diferencia del paladar, se expresa *Msx-2*. Este factor transcripcional también está presente en los rombómeros y otras regiones donde hay MCP. *Msx-2* por sí mismo es capaz de inducir muerte celular (Ferrari, et al. 1998). Además se ha propuesto que hay una relación directa entre AR y un

incremento en la expresión de *Bmp-7* y *Msx-2*. Nuestros datos demuestran que *Msx1* y *2* no se expresan en el paladar (Fig. VI). Por lo tanto la ausencia de *Msx-2* en el paladar pudiera explicar la nula respuesta apoptótica a BMP-7 (también a BMP-2 el cual probamos en algunas ocasiones). También pudiera ser relevante que las células que expresan y responden a BMP-7 en la extremidad son mesenquimáticas derivadas del mesodermo lateral a diferencia de las células del paladar, que son epiteliales derivadas del endodermo.



Fig. VI. Hibridación contra *Msx 1* y *2*. No hay expresión en el paladar solamente en las zonas correspondientes a los incisivos (flechas).

Observamos también que el mesénquima de regiones digitales y proximales (futuro tarso y metatarso) responden a la acción proapoptótica de BMP-7. Este resultado sugiere que la actividad proapoptótica de BMP-7 no es específica ya que en estas regiones no se expresa normalmente. Por otra parte el mesénquima del paladar no responde a la acción proapoptótica de BMP-7. Se sabe que estas células mesenquimáticas derivan de la cresta neural. Resulta interesante, por lo tanto, analizar si el origen embrionario

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

del mesénquima determina la respuesta apoptótica a BMP-7.

Fusión y muerte celular, analogías con otras regiones embrionarias.

Nuestros resultados demuestran que la MCP es necesaria para la fusión del paladar. Muchas estructuras embrionarias presentan muerte celular al momento de la fusión. El tubo neural es una de ellas, y se sabe que si se bloquea la MCP con inhibidores de caspasas se impide el contacto y la fusión del mismo (Weil, et al. 1997). El esternón también presenta MCP al momento de su formación (Fig. VII).

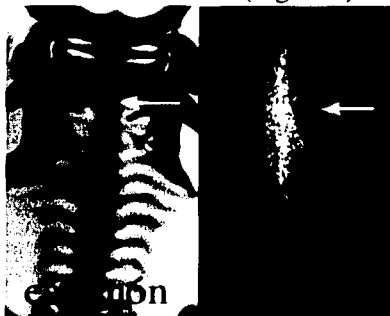


Fig. VII. Detección de cartilago con azul alciano y de MCP con anaranjado de acridina en esternones de ratón de 13.5 dpc.

Existen algunas mutaciones que impiden la fusión del esternón, pero en ningún caso se ha estudiado si hay una reducción o incremento de la MCP. Los párpados también se forman por crecimiento de dos placas que convergen pero no se fusionan y durante este crecimiento hay una abundante MCP (Fig. VIII). No existen estudios de la participación de la muerte en estas estructuras, sin embargo, en ocasiones el

AR genera la ausencia de párpados lo que pudiera deberse a un incremento de la muerte durante su formación.

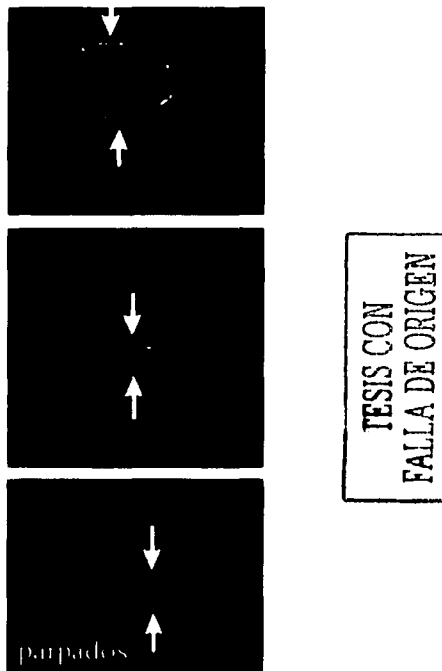


Fig. VIII. Detección de muerte celular con anaranjado de acridina durante la formación de los párpados de ratón a los 15 y 16 dpc.

Nuestros datos sugieren que el proceso regulatorio que controla la MCP en el paladar es parte de un programa morfogénico más amplio. En este programa las células que mueren participarían primero en la adhesión, luego en el crecimiento de la estructura por medio de la extensión convergente, y después, al morir, en la fusión propiamente dicha. Aunque están programadas o determinadas para morir, poco antes tienen otras funciones importantes. Este programa

podría también ocurrir en otras regiones embrionarias, por ejemplo durante la formación del esternón, la fusión del tubo neural o la fusión cloacal. En estas zonas hay MCP asociada a la fusión y en algunas como el tubo neural, extensión convergente.

Exceso de AR.

Los efectos teratogénicos del AR sobre el paladar son a diferentes niveles. La mayor parte de los reportes muestran que el AR genera paladar hendido al alterar el movimiento de las placas, evitando la elevación de las mismas. Otros reportes mencionan que el AR altera la migración de las células de la cresta neural hacia las placas. La mayoría muestran que el AR evita el crecimiento de las placas y en consecuencia la fusión (Abbott, et al. 1989). Ningún reporte anterior propone que el incremento en la muerte celular previo a la adhesión genere paladar hendido. Con base en nuestros resultados podemos proponer a la muerte celular como causa etiológica de paladar hendido. En este sentido, tanto el incremento de la muerte celular previo a la fusión (por un exceso de AR), como la inhibición de la misma (por ausencia de AR), afecta un mismo proceso morfogenético (ver esquema al final). A este respecto se sabe que muchas de las malformaciones que ocurren cuando hay un exceso de AR o una ausencia del mismo son similares. Podemos decir que prácticamente nunca se ha propuesto algún mecanismo que explique estos efectos, aunque

probablemente serán específicos para cada órgano afectado.

Transformación epitelio mesénquima en el paladar.

Evidencias reportadas por otros grupos.

La idea de la TEM como fenómeno celular responsable de la desaparición del EM es relativamente reciente (Fitchett and Hay 1989). Fitchett muestra imágenes (por microscopía electrónica) en las que células cercanas al EM presentan características de tipo mesenquimático. Sin embargo la evidencia es solamente correlativa, puesto que no hay un seguimiento de la célula epitelial al momento de transformarse. Subsecuentes trabajos se enfocaron a marcar y seguir el destino de estas células (Shuler, et al. 1991; Griffith and Hay 1992; Shuler, et al. 1992; Kaartinen, et al. 1997; Martínez-Alvarez, et al. 2000). En estos reportes las imágenes que se muestran presentan muy pocas células transformadas en mesénquima, contrario a lo que se esperaría si la TEM fuera el mecanismo celular preponderante para la remoción del EM. En algunas imágenes las células tienen morfologías y tamaños muy heterogéneos (parecieran precipitados del colorante) y no están localizadas en algún lugar en particular. Las inconsistencias entre estos datos y los nuestros pudieran deberse tanto a los colorantes como al sistema de cultivo utilizados.

Los colorantes lipofílicos continúan fluoresciendo aún después de que la célula marcada es fagocitada. Estas células, por su morfología y movimiento (los fagocitos), pueden interpretarse

erróneamente como células transformadas. También por nuestra experiencia sabemos que al momento de cultivar las placas del paladar es posible que el epitelio oral o nasal sobrelape con el EM. Esta condición ocurre cuando no se ponen exactamente una placa enfrente de la otra. En estos casos desaparece sólo el EM y los epitelios oral y nasal quedan íntegros. Esto puede llevar a interpretaciones falsas respecto a la degradación del epitelio, o a detectar células que no derivan del EM si no más bien del epitelio oral o del nasal. Por otra parte el paladar está altamente vascularizado y los eritrocitos presentan autofluorescencia, y estos pueden interpretarse como células transformadas.

Las células transformadas en mesénquima tienen una función muy importante posterior a su transformación. Las derivadas de la cresta neural originan una gran variedad de tipos celulares (neuronas, cartílago, melanocitos, etc) (Duband, et al. 1995). En el corazón las células transformadas del endocardio forman parte de las válvulas del atrio (Bernanke and Markwald 1982). Entonces este cambio tan dramático (la transdiferenciación) tiene una función y por lo tanto, podríamos decir, una justificación. Para el caso del paladar no hay una función posterior conocida que pueda ser desempeñada por las células transformadas fuera de quizás incorporarse al tejido óseo en el que se convierte el mesénquima del paladar. Nuestros datos muestran que la MCP es el mecanismo responsable de la degeneración del EM. Aun así, realizamos una serie de

experimentos, algunos de ellos iguales a los reportados, para detectar y evaluar la TEM. Con ninguna estrategia logramos identificar células transformadas en mesénquima. Realizamos dos análisis sistemáticos en diferentes muestras a lo largo de todo el EM y no detectamos células migrando o transformadas. En todos estos análisis lo que consistentemente detectamos fueron células apoptóticas. De cualquier modo, nos obligamos a profundizar en el estudio celular del proceso de fusión.

Actualmente se considera que la TEM es el fenómeno celular responsable de la fusión. De hecho, en algunos reportes se menciona que la muerte celular en el paladar es un concepto viejo ya superado por las evidencias de la TEM (Young, et al. 2000). Con base en nuestros resultados podemos decir que el fenómeno preponderante y único para la fusión es la MCP. Esta aseveración la podemos hacer basados en las siguientes observaciones: 1.- La MCP es un evento temprano que precede a la fusión. 2.- Siempre detectamos un gran número de células muriendo en la región del EM que contrasta con las pocas células que aparentemente se transforman en mesénquima reportadas en otros trabajos. 3.- Al bloquear la MCP con un inhibidor de amplio espectro de caspasa se impide la degeneración del EM y por lo tanto la fusión. De hecho este mismo efecto se describe para el paladar del ratón mutante en la proteína Apaf-1, proteína central en el apoptosoma (Ceconi, Alvarez-Bolado et al. 1998).

Primeros reportes sobre MCP en el paladar.

Como ya se mencionó, la idea de la TEM del EM es relativamente reciente y presenta una serie de inconsistencias con respecto a nuestros estudios y los realizados con anterioridad por otros grupos. Existen toda una serie de reportes acerca de las características celulares del EM al momento de la fusión que fueron publicados hace algunos años (DeAngelis and Nalbandian 1968; Farbman 1968; Smiley and Dixon 1968; Mori, et al. 1994; Taniguchi, et al. 1995). En esos reportes analizaron el proceso de degradación del EM en diferentes organismo (humanos, ratones, ratas, hamsters). En todos los casos describen características celulares que corresponden con lo que actualmente conocemos como apoptosis. En algunos de estos trabajos muestran que las células peridermales interdigitan al momento de la adhesión y forman desmosomas entre ellas. En ninguno de estos reportes se muestra ni se menciona que existan células epiteliales que cambien de forma o estén migrando. Estos datos concuerdan con los resultados que tenemos por lo que pensamos que la TEM no es responsable de la degeneración del EM y no tiene función en la fusión del paladar.

Migración de las células peridermales y su relación con la MCP.

Después del contacto de las placas hay una adhesión bastante fuerte entre ellas. Las células peridermales son las responsables de la adhesión. Estas células

presentan en la superficie abundantes proteoglicanos que le confieren propiedades adherentes. En la literatura no existen estudios detallados sobre las proteínas de adhesión y receptores que pudieran participar en este fenómeno. El ratón deficiente en TGF β -3 tiene células peridermales pero sin la presencia de proteoglicanos y carecen de extensiones citoplasmáticas (parecidas a filopodios) que son las responsables de las interdigitaciones entre estas células (Martínez-Alvarez, et al. 1996).

Nuestros resultados muestran que las células peridermales poco después del contacto migran hacia los vértices oral y nasal del paladar. En estas regiones se acumulan y conforman los denominados triángulos epiteliales. Su función en ese lugar pudiera ser la de formar un sello que refuerza la unión mientras ocurren los otros fenómenos de intercalación y muerte celular en el epitelio basal. Mas adelante estas células también sufren el proceso de apoptosis. La remoción del peridermo genera una área de fusión menor a la normal y, si se bloquea su migración con citocalasina D, no se forman los triángulos epiteliales. Sin embargo lo más interesante es que al evitar su migración también se inhibe la MCP (ver esquema al final). Este es un fenómeno interesante que no hemos encontrado reportado en la literatura con anterioridad.

La migración de las células peridermales parece ser un requisito para que ocurra la MCP del epitelio basal. Como también las células peridermales mueren una vez que se encuentran en los

triángulo epiteliales es posible que ambos tipos celulares tengan una interdependencia para su sobrevivencia la cual se pierde al momento de la migración. A este respecto sabemos que al remover las células peridermales con tripsina el epitelio basal sufre muerte celular. Por otra parte, también al bloquear la síntesis de proteínas se inhibe la migración de las células peridermales y por lo tanto la MCP, trayendo también como consecuencia la ausencia de triángulos epiteliales y una menor área de fusión. La morfología del paladar al inhibir la migración es una fenocopia de la que presenta el paladar del ratón deficiente para TGFβ-3.

Participación de TGFβ-3 en la MCP del EM.

TGFβ-3 es necesario para la fusión del paladar. El análisis del ratón mutante muestra que hay una deficiencia en la capacidad adherente del epitelio y una disminución notoria en la MCP (Taya, et al. 1999) (Martinez-Alvarez, et al. 2000). En el trabajo de Martinez-Alvarez muestran en la figura 5 una histogía del paladar mutante en el que claramente se observa que no hubo formación de triángulos epiteliales y la MCP esta drásticamente reducida (Fig. IX)



Fig. IX. Histología mostrada por Martinez-Alvarez et.al. de un paladar mutante para Tgfβ-3. Los triángulos epiteliales no se forman y prácticamente no hay muerte celular.

Estos resultados son muy similares a los nuestros y que mostramos en la figura 6 del segundo artículo. Taya en su reporte muestra en la figura 3 imagenes histológicas también de paladares mutantes en los que claramente el grosor del mismo se encuentra reducido (Fig. X) de manera similar a lo que observamos cuando removemos las células peridermales y que mostramos en la figura 7 del segundo artículo.

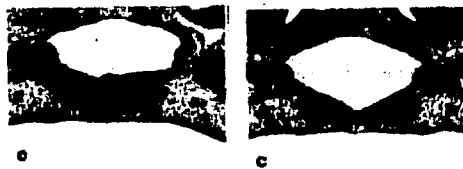


Fig. X. Histología mostrada por Taya et.al. de un paladar mutante para Tgfβ-3. El grosor del paladar mutante se encuentra notablemente reducido.

Ambos trabajos solamente describen estas observaciones pero no mencionan algún mecanismo que las explique. Nuestros experimentos nos permiten proponer que la migración de

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

estas células es necesaria para que ocurra la MCP y explican parte del mecanismo por medio del cual está actuando TGF β -3 (ver esquema al final).

Nuestros resultados muestran que TGF β -3 no regula la MCP de manera directa, como lo hace BMP-7 en la extremidad. Al adicionar la proteína exógenamente no hay un aumento de la MCP. Tampoco disminuye si neutralizamos su actividad con anticuerpos. El control de la MCP podría estar regulado de manera mas compleja y no directa, de manera que la simple estrategia de adicionar o bloquear la acción de TGF β -3 no permite abordar. Los datos anteriores sugieren que parte de la acción de TGF β -3 que lleva al epitelio a morir es a través de regular la migración celular.

TGF β -3 está involucrado en la MCP de otros epitelios; por ejemplo durante la involución del epitelio de la glándula mamaria (Nguyen and Pollard 2000), de las suturas craneales (Opperman et al. 2000) y en los interdígitos (Dunker, et al. 2002). Su función en el epitelio del paladar podría ser a diferentes niveles, pudiera ser el factor citostático que detiene la proliferación de este epitelio y mas tarde, o al mismo tiempo, favorecer o hacer competentes a estas células para morir. En todo caso, el ratón mutante no sufre MCP en el EM y por lo tanto el proceso debe estar alterado en algún nivel.

Intercalación del epitelio basal.

La extensión convergente participa en muchos procesos morfogenéticos como

la gastrulación, neurulación, elongación de eje corporal y elongación de la notocorda. Participa por ejemplo en la elongación de tubos epiteliales como el intestino de *Drosophila* o el arquenterón del erizo de mar (Wallingford, Fraser et al. 2002). Recientemente se reportó que en el paladar ocurre este fenómeno de elongación en el eje oro-nasal (Tudela and et.al. 2002)

Nosotros también hemos observado este fenómeno y nos ha permitido entender mejor el proceso morfogenético de la fusión de tejidos. Sabemos que después de la adhesión sigue la migración de las células peridermales, entonces el epitelio basal se intercala generando una mayor área de fusión y un crecimiento en el eje oro-nasal. Es hasta después de estos tres eventos celulares que proponemos ocurre la MCP.

Existen otras regiones como el septo nasal, cloaca y esternón donde hay MCP asociada a la migración y convergencia de tejidos. Resulta muy interesante estudiar si la muerte es el proceso celular posterior a la extensión convergente de estas estructuras y quizás de otras más como el tubo neural, donde también se ha reportado que ocurre extensión convergente (Davidson and Keller 1999) y donde sabemos que hay MCP. Podría ser parte de un esquema o plan morfogenético más extenso, o común a diferentes estructuras y organismos.

Función de la lámina basal en el proceso de fusión.

Toda célula epitelial muere cuando pierde contacto con la lámina basal que la

sustenta (Coucovanis and Martin 1995). Se ha propuesto que este comportamiento pudiera ser un mecanismo de protección para evitar procesos de tipo canceroso (Frisch and Hunter 1994); de hecho la mayoría de los cánceres son de origen epitelial. En el embrión existen epitelios cuya MCP es regulada a través de la degeneración de la lámina basal que los sustenta. La degeneración del epitelio de la glándula mamaria (Pullan et.al. 1996) o del conducto de Muller (Roberts, et al. 2002) son algunos ejemplos. Existía la posibilidad de que en el caso del paladar ocurriera algo similar. Además la TEM requiere de la degradación de la matriz extracelular para que la célula epitelial pueda migrar (Song, et al. 2000). Con base en estas dos ideas, analizamos la lámina basal al momento de la fusión y adicionamos un inhibidor de metaloproteinasas. Las metaloproteinasas se encargan principalmente de la degradación de proteínas de matriz extracelular. Con estos estudios demostramos que la lámina basal no es degradada si las células epiteliales no están en proceso de MCP. Al bloquear el proceso apoptótico no hay degradación de la lámina basal, aún cuando temporalmente debiera estar ocurriendo. La degradación de la lámina basal no depende del contacto, ya que si inducimos muerte celular con AR sin que haya contacto, la lámina basal se degrada.

La degradación de la lámina basal es llevada a cabo por metaloproteinasas. Esto lo sabemos ya que cuando bloqueamos su actividad con un inhibidor

de amplio espectro impedimos la degradación de la misma (ver esquema al final). Muy probablemente sea la MMP-13 la responsable de degradar la lámina basal ya que el patrón de expresión se restringe únicamente al EM a diferencia de otras que se expresan de manera mas amplia en todo el paladar (Blavier, et al. 2001). La actividad proteolítica de las metaloproteinasas es controlada por las proteínas llamadas TIMPs. En el EM se expresa la TIMP-2, por lo que pudiera ser ésta la encargada de controlar la actividad proteolítica de la MMP-13.

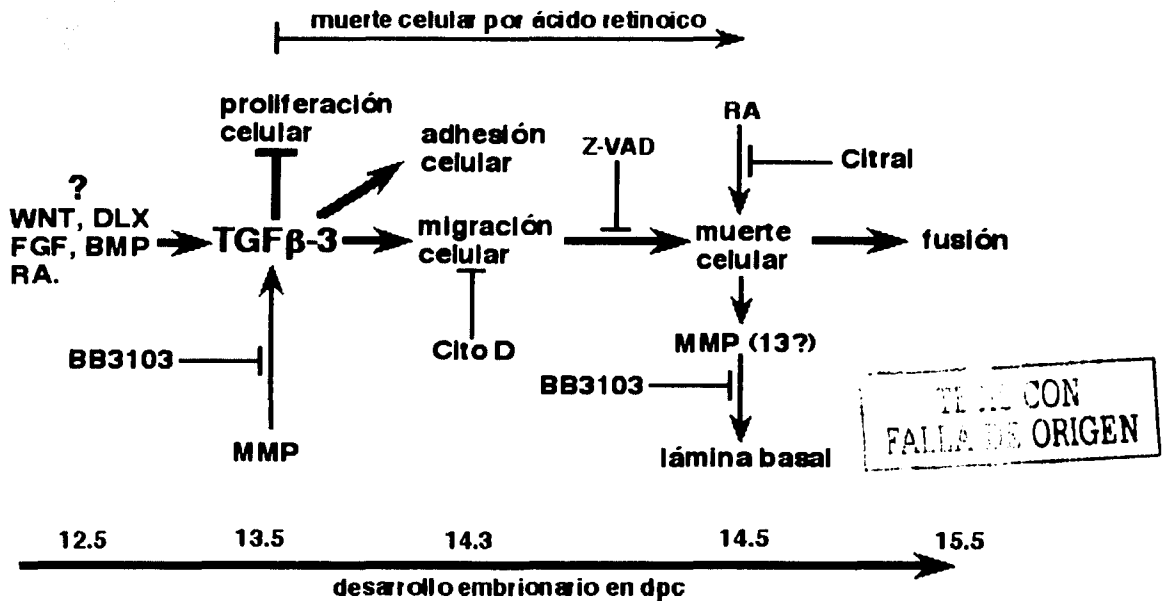
Por otra parte, este inhibidor no bloquea la MCP, esto es, para que haya muerte no se requiere de metaloproteinasas. En conjunto, estos datos indican que la MCP del epitelio no es inducida a través de la degeneración de la lámina basal, como ocurre en los ejemplos mencionados, sino al contrario, el epitelio es el que degrada la lámina basal pero solamente cuando está muriendo. En este caso el proceso apoptótico es necesario para la activación de las metaloproteinasas.

Nuevamente nuestros datos no concuerdan con un reporte reciente. En ese trabajo utilizando el mismo inhibidor a la misma concentración y en el mismo sistema observan que el EM no desaparece o lo hace parcialmente (Blavier, et al. 2001). Los autores proponen que la degradación de las proteínas de matriz extracelular es un requisito para la desaparición del este epitelio por medio de la TEM y que es mediada por la acción de TGF β -3. Como la *Mmp-13* se expresa con el mismo patrón espacio-temporal que

Tgfβ-3, en el EM, proponen que la acción de *TGFβ-3* es mediada por las metaloproteinasas. Este grupo sostiene la hipótesis de la TEM, y concluyen que las metaloproteinasas, y por lo tanto *TGFβ-3*, son parte de éste proceso. Nuestros resultados muestran claramente que la lámina basal no se degrada en presencia de este inhibidor y que la MCP no es afectada.

Algún componente de la maquinaria de muerte debe estar activando

alguna metaloproteinasas. Realizamos una búsqueda de sitios consenso por cortes por caspasas en la MMP-13, MMP-2, MT-MMP y TIMP-2 pero no encontramos ninguno sitio que pudiera ser blanco de alguna caspasa y que pudiera activar a la metaloproteinasas. Datos recientes obtenidos en el laboratorio (L.Rendón) muestran que la actividad de metaloproteinasas aumenta drásticamente en paladares donde la MCP ha empezado.



Esquema final.

TGFβ-3 es una de las moléculas central en la diferenciación del EM. Su actividad sobre este epitelio es citostática. Promueve también la producción de proteoglicanos involucrados en la adhesión así como la migración de las células

peridermales. La migración es necesaria para que ocurra la muerte celular. Así mismo, la activación de las MMP depende del proceso apoptótico.

Z-VAD. Inhibidor de amplio espectro de caspasas.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

**FALTA
PAGINA**

1

Citral. Inhibidor de alcohol y aldehído deshidrogenasas.

Citocalasina D. Inhibidor de la polimerización de actina.

BB3103. Inhibidor de amplio espectro de metaloproteinasas.

RA. Acido retinoico "all-trans".

CONCLUSIONES

1. La MCP en el EM, aparece después del contacto en la parte anterior y antes en la parte posterior. Este dato concilia observaciones realizadas por otros grupos; donde en algunos se afirma que la muerte celular ocurre antes del contacto y en otros después del mismo. En las crestas parece estar asociada a su formación.
2. El EM adquiere la competencia para morir gradualmente a partir de los 14.0 dpc y el contacto, probablemente al provocar la migración, es una señal que desencadena la MCP.
3. El AR endógeno regula la MCP en el paladar.
4. El AR exógeno genera un incremento en la muerte celular alterando la adhesión.
5. La muerte celular excesiva que induce el AR es un factor etiológico en la generación de paladar hendido.
6. La MCP es el mecanismo por el cual el EM desaparece; es necesaria para la fusión.
7. *Bmp-7* se expresa en las regiones donde hay MCP, es regulado positivamente por AR pero no participa en la MCP directamente.
8. No hay TEM durante la fusión del paladar.

9. Las células peridermales conforman los triángulos epiteliales, participan en la adhesión y también sufren el proceso de apoptosis.

10. Las células del epitelio basal se intercalan (extensión convergente) después del contacto y participan en el alargamiento del paladar en el eje dorsoventral. Poco tiempo después mueren por apoptosis.

11. La migración de las células peridermales es un requisito para que ocurra la MCP.

12. El fenotipo obtenido al bloquear la migración de las células peridermales fenocopia el que ocurre en el paladar deficiente para el factor TGF β -3.

13. La degradación de la lámina basal es activada por la célula apoptótica y se lleva a cabo por metaloproteinasas.

PERSPECTIVAS

El receptor III a TGF- β , también llamado Betaglicano, es una de las moléculas que se expresan específicamente en el EM. Es una de las moléculas cuyo estudio aportaría un mejor conocimiento del proceso de fusión y permitiría entender el nivel al cual participa TGF β -3 en la MCP. El Betaglicano es una glicoproteína muy grande, con una región intracitoplasmica pequeña sin actividad de cinasa. A pesar de que no tiene actividad transductora se propone que facilita el acceso de TGF β -3 al receptor I, el cual dimeriza con el II y fosforila a proteínas SMAD. Se ha demostrado que es estrictamente necesaria

para la TEM en el corazón (Brown, Boyer et al. 1999). Resulta interesante analizar su posible participación en la MCP. Por sus características es posible que participe en la adhesión del EM (de cualquier forma podemos realizar experimentos sobre expresándolo mediante infección con vectores adenovirales).

Pretendemos abundar en el estudio de la participación del mismo TGF β -3 realizando experimentos con el ratón mutante. Esta opción nos permitiría realizar un análisis más completo utilizando las mismas estrategias empleadas en este trabajo.

Un aspecto que nos interesa estudiar, aunque los resultados son preliminares, es la relación del AR con SHH. La mayor parte de la evidencia actual indica que el AR regula positivamente la expresión de *Shh*. Estos datos han sido obtenidos estudiando la zona polarizante en la extremidad, lugar donde *Shh* se expresa normalmente. Sin embargo nuestros datos muestran el efecto contrario. Tanto *in vitro* como *in vivo* la expresión de *Shh* en las crestas se abate completamente por el efecto del AR. Este efecto es relativamente corto (al menos 6 hr). En la literatura hemos encontrado dos evidencias similares, tanto en pollo (Helms, et al. 1997) como en *Xenopus* (Franco, et al. 1999). Si bien estos resultados son interesantes, no se ha profundizado en su estudio. El solo hecho de que parte del efecto teratogénico del AR se deba a su capacidad para bloquear la expresión de *Shh*, es muy interesante de estudiar. De hecho, alguna malformaciones

provocadas por la ausencia de *Shh* son similares a las provocadas por el exceso de AR (ciclopía, situs inversus y otras).

MATERIALES Y METODOS

Implantación de esferas con factores de crecimiento.

La implantación de esferas sintéticas (de acrílico y Affi-gel) permite liberar tópicamente proteínas en diferentes regiones del paladar donde se desee.

El procedimiento es el siguiente: Tomar 10 μ l de esferas de acrílico con heparina (SIGMA, H-5263, 5 ml) ponerlas en un tubo ependorff. Lavar tres veces con PBS filtrado. Entre cada lavado se centrifugan 5 segundos solamente para bajarlas. Al final se retira el PBS y se dejan durante 2 minutos a temperatura ambiente (t/a) para reducir el exceso de humedad. No dejar que se sequen por completo. Sobre un pedazo de parafilm dentro de una cámara húmeda poner una gota de 5 a 10 μ l del factor de crecimiento a utilizar, agregar de 20 a 50 esferas (de más o menos 100 μ m de diámetro) previamente seleccionadas bajo el microscopio. Se incuban por al menos 1 hr a t/a antes de utilizarlas. Se toman con pinzas y se implantan en una incisión hecha con un aguja de tungsteno. Las esferas se pueden manipular y acomodar en el sitio seleccionado utilizando una asa de tungsteno. Probamos las proteínas BMP-2 (1 mg/ml) (Genetics Institute, Cambridge, MA), BMP-7 (1 mg/ml) (Creative Molecules, Cambridge, MA) y Noggin (1- 0.5 mg/ml) (Regeneron, Tarrytown, NY). En el laboratorio se han utilizado también para embeber las proteínas FGF 2, 4, 8 y Shh. Las esferas pueden guardarse en la cámara húmeda hasta por 2 semanas a 4°C.

Cultivo de órganos.

La disección del paladar se realiza haciendo un corte transversal sobre el ojo del embrión y otro a través de la boca en la misma dirección. Se debe tener cuidado de no maltratar el epitelio de la región oral al momento de la disección. Sobre la rebanada que queda se realizan

dos cortes siguiendo las líneas naturales del paladar (ver figura 1 del artículo). El paladar se puede manipular más fácilmente sujetándolo por la parte posterior, en la zona cartilaginosa de la tráquea. Después se ponen sobre un filtro millipore (Durapore GVWP01300, 0.22 μm) que se encuentra flotando en 2 ml de medio definido McCoy (Microlab, México) en una caja de 24 pozos.

Aplicación *in vivo* de AR.

Se disuelve la cantidad requerida de AR en aceite de sésamo en un tubo eppendorf. Se agita en un vórtex y se inyecta intraperitonealmente con una aguja para insulina. En nuestros experimentos administramos 100 mg de AR por kg de ratón en un volumen final de 300 μl de aceite. La concentración de AR de los stocks originales es 100 mM en DMSO.

Marcaje de epitelio con CSFCE.

Para marcar el epitelio y poder seguir el destino de las células utilizamos una solución 10 μM de CSFCE (Molecular Probes, Eugene, OR) disuelto en PBS, a partir de un stock de 10 mM disuelto en DMSO guardado a -20°C . Los tejidos se lavan en PBS y se sumergen en esta solución por 15 minutos a 37°C . Posteriormente se lavan dos veces con PBS y se cultivan. Para marcar selectivamente las células peridermales realizamos el mismo procedimiento pero únicamente se incubaron por 20 segundos.

Cultivo de rebanadas vivas

Se marca el epitelio como se describió anteriormente y se cultivan solamente las placas del paladar durante 3 hr. Al cabo de este tiempo se embeben en agarosa de bajo punto de fusión al 5% disuelta en medio McCoy. La agarosa debe estar a 37°C antes de utilizarse para la inclusión. En un vibratomo se cortan rebanadas de 200 μm y se recolectan en PBS frío. Las rebanadas se fijan al fondo de una caja Petri de 35 mm con una capa delgada de agarosa de bajo punto de fusión al 1% disuelta en medio McCoy a 37°C . Se deja solidificar y se cubren con 2 ml de medio McCoy. Al final del cultivo las rebanadas vivas se lavan con PBS y se fijan con paraformaldehído al 4%, se remueve toda la agarosa posible y se procesan para

realizar la técnica de TUNEL en tejidos completos. **TUNEL en "whole-mount"**.

1-Fijar los embriones o tejidos en paraformaldehído al 4% en PBS por 2 hr a 4°C .

2-Se lavan los embriones con PBT frío (PBS con 0.1% de Tween-20)

3-Se transfieren a metanol al 100% y se guardan a -20°C

4-Los embriones se tratan por 5-6 hr con metanol:peróxido de hidrogeno al 30%, 5:1 a *u.a* (es importante que sean 6 o más horas y realizar al menos dos cambios durante las 6 hr)

5-Lavar varias veces con metanol, los embriones se pueden almacenar a -20°C

6-Rehidratar en metanol-PBT 75, 50, 25% y PBT solo, por 40 min. *c/u.* (el tiempo es importante no debe ser menor a 40 min)

7-Digerir con 20 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K por 3 min. a *t.a.* Lavar rápidamente dos veces con PBT

9-Fijar con 0.2% de glutaraldehído / 4% paraformaldehído en PBS por 20 min.

10-Lavar rápidamente tres veces con PBT

11-Se tratan los embriones con 0.1% de Borohidruro de sodio en PBT por 20 min. para remover los aldehídos reactivos.

12-Lavar rápidamente tres veces con PBT

13-Se lavan los embriones una vez con buffer TdT (30 mM Tris, 140 mM cacodilato pH 7.2, 1 mM CoCl_2)

14-Se reemplaza el bufer con 200 μl de la mezcla de reacción (20 μM de fluoresceína-dUTP, 20 μM dTTP, 0.3 U/ μl de terminal transferasa en buffer TdT).

15-Se incuban los embriones a 37°C por 2 hr moviendo ocasionalmente.

16-Los embriones se lavan rápidamente con PBT varias veces (no se requirieron seguir los siguientes pasos, no hubo ruido ni tinción inespecífica)

17-Observar en el microscopio, si hay mucho ruido probar el siguiente paso.

18-Se incuban en PBT por 20 min a 70°C

Remoción de células peridermales.

Para retirar selectivamente las células peridermales, se incuban los paladares en una solución al 0.25% de tripsina disuelta en Versene

(Invitrogene, Grand Island, NY) durante 5 min a 4° C. Después con una pipeta se rocía constantemente el borde del paladar hasta observar la aparición de una película delgada de células que se desprende del epitelio. Se remueve con las pinzas y se continua rociando hasta que no aparezcan mas. Se lavan en PBS un momento y se pasan a medio DMEM con 10 % de suero para inactivar la tripsina durante 10 minutos. Se remueven las placas del paladar del resto del tejido y se cultivan sobre un filtro.

Infeccción con vectores adenovirales productores de β -galactosidasa.

Se coloca un paladar sobre parafilm dentro de una caja Petri y con una pipeta se retira el exceso de medio de cultivo. Se agregan 10 μ l de sobrenadante con adenovirus (aproximadamente 10⁸ pfu/ul) sobre el paladar y se incuba a 37° C por 1.5-2 hr (el adenovirus fué proporcionados por el Dr. Kohei Miyazono). Se lavan en medio L15 y se cultivan *in vitro*. Al cabo del cultivo se realiza la histoquímica para detectar actividad de β -galactosidasa.

Histoquímica para β -galactosidasa.

Solución fijadora.

Paraformaldehído	1%
250 μ l	
Glutaraldehído	0.2 %
4 μ l	
MgCl ₂	2mM
2 μ l	
EGTA	5 mM
10 μ l	

NP40 (o igePAL) 0.02 % 0.2 μ l

PBS

732 μ l

Solución para lavado.

MgCl ₂	2mM
2 μ l	
Desoxicolato de Na	0.01 %
10 μ l	
NP40 (o igePAL) 0.02 %	0.2 μ l
EGTA	5 mM
10 μ l	

PBS

958

Solución para tinción

Ferro/Ferri	5 mM
20 μ l	
MgCl ₂	2mM
2 μ l	
Desoxicolato de Na	0.01 %
10 μ l	
NP40 (o igePAL) 0.02 %	0.2 μ l
X gal	1mg/ml
50 μ l	
PBS	
926 μ l	

Lavar las muestras, fijar 30 min a 4° C, lavar tres veces con solución de lavado, agregar la solución para tinción e incubar o/n. Lavar con PBS.

Reactivos utilizados.

Los stocks de citral y nerol se preparan al momento de utilizarse. Se disuelven en etanol absoluto grado biología molecular a una concentración 100 mM. Después se disuelven en medio McCoy a una concentración final de 50 μ M

El AR y retinol se disuelven en DMSO y se guardan como un stock 100 mM a -70°C. Se utilizaron a una concentración final de 20 μ M y 200 μ M respectivamente.

El ZVAD se disuelve en DMSO a una concentración 100 mM, se guarda a -70°C. Se aplicaron al medio de cultivo en un concentración 100 μ M.

El colorante vital anaranjado de acridina se disuelve en PBS para formar un stock de 5mg/ml. Se utiliza 1:1000 disuelto en PBS.

Inhibidor de metaloproteinasas. Se utilizó un inhibidor sintético de amplio espectro denominado BB3103 a una concentración final 10 μ M a partir de un stock 50 mM disuelto en DMSO.

Cicloheximida. Se utilizó a una concentración final de 20 μ g/ml a partir de un stock 20 mg/ml en etanol.

Estaurosporina. Concentración final 5 μ M a partir de un stock 10 mM en DMSO.

Citocalasina D. Concentración final 5 μ M a partir de un stock 2 mM en DMSO.

Inmunocitoquímica contra laminina y TUNEL sobre el mismo corte.

Se incluyen los tejidos en parafina, se cortan, desparafinan y rehidratan. Se ponen en PBS por 5 min.

Tratar con tripsina al 0.025 % disuelta en PBS durante 5-10 min a 37°C

Postfijar durante 5 minutos con PFA al 4%.

Lavar con PBS dos veces por 5 minutos.

Bloquear con BSA (albúmina bovina) al 4% en PBS durante 1 hr. Filtrarla con filtros de baja afinidad a proteínas de 0.22 µm.

Retirar el exceso de albúmina y agregar el anticuerpo primario antilaminina (hecho en conejo, SIGMA) diluido 1:100 en BSA al 1% en PBS durante 2 hr a temperatura ambiente.

Lavar tres veces por 5 minutos con PBS

Se incuba con el anticuerpo secundario anticonejo alexafluor 594 diluido 1:1000 en albúmina bovina al 1% en PBS durante 2 hr a temperatura ambiente.

Lavar 3 veces por 5 minutos con PBS.

Continuar con el protocolo para TUNEL tal y como lo indica el manual del kit, utilizando proteinasa K para permeabilizar.

Montar con glicerol al 70 % en PBS.

BIBLIOGRAFIA

Abbott, B. D. and L. S. Birnbaum (1989). "TCDD alters medial epithelial cell differentiation during palatogenesis." Toxicology and Applied Pharmacology 99(2): 276-86.

Abbott, B. D. and A. R. Buckalew (1992). "Embryonic palatal responses to teratogens in serum-free organ culture." Teratology 45(4): 369-82.

Abbott, B. D., J. J. Diliberto, L. S. Birnbaum. (1989). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters embryonic palatal medial epithelial cell differentiation *in vitro*." Toxicology and Applied Pharmacology 100(1): 119-31.

Abbott, B. D., M. W. Harris, L. S. Birnbaum. (1989). "Etiology of retinoic acid-induced cleft palate varies with the embryonic stage." Teratology 40(6): 533-53.

Abrahams, J. M., C. White, L.I. Fessler., H. Steller. (1993). "Programmed cell death during

Drosophila embryogenesis." Development 117: 29-43.

Acehan, D. and C. W. Akey (2002). "Three-Dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly procaspase-9 binding, and activation." Molecular Cell 9: 423-432.

Adachi-Yamada, T. and M. B. O'Connor (2002). "Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients." Developmental Biology 251: 74-90.

Arnoult, D. et.al. (2001). "On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducin factor during *Dictyostelium discoideum* cell death." Molecular Biology of the Cell 12: 3016-3030.

Bernanke, D. H. and R. R. Markwald (1982). "Migratory behavior of cardiac cushion tissue cells in a collagen-lattice culture system." Developmental Biology 91(2): 235-45.

Bitgood, M. J. and A. P. McMahon (1995). "Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo." Developmental Biology 172(1): 126-38.

Blavier, L. (2001). "TGF-beta 3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases." Molecular Biology of the Cell 12: 1457-1466.

Blumberg, B. (1997). "An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural specification and neuronal differentiation." Seminars in Cell and Development Biology 8: 417-428.

Blumberg, B. et al. (1996). "Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 93(10): 4873-4878.

Boyer, B., A. M. Valles, J.P. Thiery. (1996). "Model systems of epithelium-mesenchyme transitions." Acta Anatomica 156: 227-239.

Brown, C. B., A. S. Boyer., R.B.Runyan., J. B. Barnett. (1999). "Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart." Science 26(283): 2080-2082.

- Carette, M. J. and M. W. Ferguson (1992). "The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion *in vitro*: an analysis by Dil labelling and confocal microscopy." Development **114**(2): 379-88.
- Castro-Obrigón, S. and L. Covarrubias (1996). "Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation." Febs Letters **381**(1-2): 93-7.
- Cecconi, F., G. Alvarez-Bolado., B.I. Meyer., K.A. Roth., P. Gruss. (1998). "Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development." Cell **94**(6): 727-37.
- Citterio, H. L. and D. A. Gaillard (1994). "Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha), epidermal growth factor receptor (EGF-R) and cell proliferation during human palatogenesis: an immunohistochemical study." International Journal Of Developmental Biology **38**(3): 499-505.
- Coucouvanis, E. and G. R. Martin (1995). "Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo." Cell **83**(2): 279-87.
- Cuervo, R., C. Valencia., R.A.S. Chandraratna., L. Covarrubias. (2001). "Programmed Cell Death is Required for Palate Shelf Fusion and is Regulated by Retinoic Acid." Developmental Biology **245**:145-156.
- Cui, X. M. and C. M. Shuler (2000). "The TGF-beta type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion." International Journal of Developmental Biology **44**(4): 397-402.
- Das, B., A. M. Schreiber., H. Huang., D.D. Brown. (2002). "Multiple thyroid hormone-induced muscle growth and death programs during metamorphosis in *Xenopus leavis*." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **99**(19): 12230-12235.
- Davidson, L. A. and R. E. Keller (1999). "Neural tube closure in *Xenopus leavis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension." Development **126**: 4547-4556.
- DeAngelis, V. and J. Nalbandian (1968). "Ultrastructure of mouse and rat palatal processes prior to and during secondary palate formation." Archives Of Oral Biology **13**(6): 601-8.
- Dixon, M. J., J. Garner., M.W. Ferguson (1991). "Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor alpha (TGF alpha) during murine palatogenesis *in vivo* and *in vitro*." Anatomical Embryology (Berl) **184**(1): 83-91.
- Du, C., M. Fang., Y. Li., X. Wang. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Duband, J. L., F. Monier., M. Delannet., D. Newgreen. (1995). "Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development." Acta Anatomica (Basel) **154**(1): 63-78.
- Duester, G. (1996). "Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis." Biochemistry **35**(38): 12221-7.
- Dunker, N., K. Schmitt., K. Kriegelstein. (2002). "TGF- β is required for programmed cell death in the interdigital web of the developing mouse limb." Mechanism of Development **113**: 111-120.
- Dupé, V., N. et al. (1999). "Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods." Developmental Biology **208**(1): 30-43.
- Dupe, V. and A. Lumsden (2001). "Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling." Development **128**(12): 2199-2208.
- Enari, M. et.al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Farbman, A. I. (1968). "Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos." Developmental Biology **18**(2): 93-116.

- Ferguson, M. W. (1987). "Palate development: mechanisms and malformations." Irish Journal Of Medical Science 156(11): 309-15.
- Ferguson, M. W. (1988). "Palate development." Development 103 Suppl: 41-60.
- Ferguson, M. W., P. M. Sharpe., B.L. Thomas., F. Beck . (1992). "Differential expression of insulin-like growth factors I and II (IGF I and II), mRNA, peptide and binding protein I during mouse palate development: comparison with TGF beta peptide distribution." Journal Of Anatomy 181: 219-38.
- Ferrari, D. et al. (1998). "Ectopic expression of Msx-2 in posterior limb bud mesoderm impairs limb morphogenesis while inducing BMP-4 expression, inhibiting cell proliferation, and promoting apoptosis." Developmental Biology 197(1): 12-24.
- Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Mitochondria-the suicide organelles." BioEssays 23: 111-115.
- Fitchett, J. E. and E. D. Hay (1989). "Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse." Developmental Biology 131(2): 455-74.
- Fitzpatrick, D. R., F. Denhez., P. Kondaiah., R.J. Akhurst (1990). "Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis." Development 109(3): 585-95.
- Frade, J. M. and T. M. Michaelidis (1997). "Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism?" BioEssays 19(9): 827-832.
- Franco, P. G., A. R. Paganelli., S.L. López., A.E. Carrasco (1999). "Functional association of retinoic acid and hedgehog signaling in *Xenopus* primary neurogenesis." Development 126(19): 4257-4265.
- Frisch, S. M. and F. Hunter (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." The Journal of Cell Biology 124(4): 619-626.
- Gehring, W. J. (2002). "The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types." International Journal of Developmental Biology 46: 65-73.
- Glucksmann, A. (1951). "Cell death in normal vertebrate ontogeny." Biol.Rev 26: 59-86.
- Graham, A., P. Francis-West., P. Brickell., A. Lumsdem (1994). "The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest." Nature 372(6507): 684-6.
- Graham, A., G. Koentges., A. Lumsdem (1996). "Neural crest apoptosis and the establishment of craniofacial pattern: an honorable death." Molecular And Cellular Neurosciences 8(2-3): 76-83.
- Griffith, C. M. and E. D. Hay (1992). "Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels." Development 116(4): 1087-99.
- Guha, U. et al. (2002). "*In vivo* evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb." Developmental Biology 249: 108-120.
- Halestrap, A. P., G. P. McStay., S.J. Clarke (2002). "The permeability transition pore complex: another view." Biochimie 84: 153-166.
- Hall, B. L. and C. S. Thummel (1998). "The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor." Development 125(23): 4709-4717.
- Helms, J., C. Tallar., G. Eichele (1994). "Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud." Development 120(11): 3267-3274.
- Helms, J. A., C. H. Kim., D. Hu., R. Minkoff., C. Tallar., G. Eichele (1997). "Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid." Developmental Biology 187(1): 25-35.
- Horvitz, H. R. and H. M. Ellis (1983). "Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol 48(2): 453-463.
- Incardona, J. P., W. Gaffield., R.P. Kapur., H. Roelink (1998). "The teratogenic veratrum

alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction." Development **125**(18): 3553-3562.

Johnson, A. T. et al. (1995). "Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors." Journal of Medicinal Chemistry **38**(24): 4764-7.

Jowett, A. K. et al. (1993) "Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx-1 and msx-2 gene expression in the developing murine molar tooth." Development **93**(2): 461-470.

Joza, N. et al. (2001). "Essential role of mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-554.

Kaartinen, V. et al. (1997). "Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane." Developmental Dynamics **209**(3): 255-60.

Kaartinen, V. et al. (1995). "Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction." Nature Genetics **11**(4): 415-21.

Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, A.R. Currie. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." British Journal of Cancer **26**: 239-257.

Kikonyogo, A., D. P. Abriola., M. Dryjanski., R. Pietruszko (1999). "Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist." European Journal of Biochemistry **262**(3): 704-12.

Knight, B. et al (1999). "Visualizing muscle cell migration in situ." Current Biology **10**: 576-585.

Kuwana, T. et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**: 331-342.

Lang, R. A. and J. M. Bishop (1993). "Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye." Cell **74**: 453-462.

Leid, M., P. Kastner., P. Chambon (1992). "Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways." Trends In Biochemical Sciences **17**(10): 427-33.

Lindsten, T. et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Molecular Cell **6**: 1389-1399.

Liu., X., C. N. Kim., J. Yang., R. Jemmerson., X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C." Cell **86**: 147-152.

Lockshin, R. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." Nature Reviews **2**: 545-550.

Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1964). "Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms." Journal of Insect Physiology **10**: 643-649.

Lohnes, D., M. et al (1994). "Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants." Development **120**(10): 2723-48.

Macias, D. et al. (1997). "Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development." Development **124**(6): 1109-17.

Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**: 841-850.

Markwald, R. R., T. P. Fitzharris., W.N. Smith (1975). "Structural analysis of endocardial cytodifferentiation." Developmental Biology **42**(1): 160-80.

Martin, P. and W. Wood (2002). "Epithelial fusions in the embryo." Current Opinion in Cell Biology **14**: 569-574.

Martinez-Alvarez, C. et al (2000). "Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion." International Journal Of Developmental Biology **44**: 331-335.

Martinez-Alvarez, C., S. O'Kane., Y. Taya., M.W. Ferguson (1996). "Palate development in the TGF-beta 3 knockout mouse. Low vacuum

scanning electron microscopy reveals changes in the medial edge epithelium." International Journal of Developmental Biology Suppl 1: 115S-116S.

Martinez-Alvarez, C. et al. (2000). "Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion." Developmental Biology 220(2): 343-57.

McCaffery, P. and U. C. Dräger (1994). "Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 91(15): 7194-7.

McCaffery, P., M. O. Lee., M.A. Wagner., N.E. Sladek., U.C. Drager (1992). "Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina." Development 115(2): 371-82.

Mendelson, C. et al (1994). "Function of retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants." Development 120: 2749-2771.

Merino, R. et al (1998). "Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling." Developmental Biology 200(1): 35-45.

Miettinen, P. et al (1999). "Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure." Nature Genetics 22(1): 69-73.

Miller, H. G. and B. L. Shapiro (1968). "Determinants of epithelial breakdown in palatal fusion." IADR Program and Abstracts of Papers, 27.

Miura, M. et al (1993). "Induction of apoptosis in fibroblast by IL beta converting-enzyme, mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*." Cell 75(4): 653-660.

Montero, J. A. et al (2001). "Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development." Development 128(11): 2075-2084.

Mori, C., N. Nakamura., Y. Okamoto., M. Osawa., K. Shiota (1994). "Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation." Anatomy And Embryology 190(1): 21-8.

Newmeyer, D. D. and S. Ferguson-Miller (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death." Cell 112: 481-490.

Nguyen, A. V. and J. W. Pollard (2000). "Transforming growth factor β 3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution." Development 127: 3107-3118.

Niederreither, K., V. Subbarayan., P. Dolle., P. Chambon (1999). "Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development [see comments]." Nature Genetics 21(4): 444-8.

Ong, D. E. and G. Chytil (1978). "Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis." Journal of Biological Chemistry, 253: 4551-4554.

Ong, D. E. and G. Chytil (1978). "Cellular retinol binding protein from rat liver." Journal of Biological Chemistry 253: 828-832.

Opperman, L. A., K. Adab., P.T. Gakunga (2000). "Transforming factor-beta 2 and beta 3 regulate fetal rat cranial suture morphogenesis by regulating rates of cell proliferation and apoptosis." Developmental Dynamics 219(2): 237-247.

Pelton, R. W., B. L. Hogan., D. A. Miller., H. L. Moses (1990). "Differential expression of genes encoding TGFs beta 1, beta 2, and beta 3 during murine palate formation." Developmental Biology 141(2): 456-60.

Pratt, R. M. and J. R. Hassell (1975). "Appearance and distribution of carbohydrate-rich macromolecules on the epithelial surface of the developing rat palatal shelf." Developmental Biology 45(1): 192-8.

Prieto, A. L. and K. L. Crossin (1995). "Cell-cell adhesion molecules in epithelial-mesenchymal transformation." Acta Anatomica 154: 21-33.

Proetzel, G. et al (1995). "Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion." Nature Genetics 11(4): 409-14.

Pullan, S. et al (1996). "Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium." Journal of Cell Science 109(3): 631-642.

- Reddien, P. W., S. Cameron., H.R. Horvitz (2001). "Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*." Nature **412**: 198- 202.
- Roberts, L. M., J. A., H. A. Ingraham (2002). "Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development." Development **126**(6): 1487-1496.
- Rodriguez-Esteban, C. et al (1997). "Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb." Nature **386**: 360-365.
- Rodriguez-Leon, J., R. Merino., D. Macias., Y. Gañan., E. Santesteban., J. M. Hurlle (1999). "Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling." Nature Cell Biology **1**(2): 125-6.
- Salas-Vidal, E. et al (1998). "Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death." Experimental Cell Research **238**(1): 136-47.
- Salas-Vidal, E., C. Valencia, L. Covarrubias. (2001). "Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis." Developmental Dynamics **220**. 295-306.
- Sanz-Ezquerro, J. J. and C. Tickle (2000). "Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development." Development **127**: 4811-4823.
- Schuh, T. J., B. L. Hall., J. C. Kraft., M.L. Privalsky., D. Kimelman (1993). "v-erbA and citral reduce the teratogenic effects of all-trans retinoic acid and retinol, respectively, in *Xenopus* embryogenesis." Development **119**(3): 785-98.
- Shah, R. M., E. M. Donaldson., G.G. Scudder. (1990). "Toward the origin of the secondary palate. A possible homologue in the embryo of fish, *Onchorhynchus kisutch*, with description of changes in the basement membrane area." American Journal Of Anatomy **189**(4): 329-38.
- Shuler, C. F., Y. Guo., A. Majumder., R. Y. Luo (1991). "Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium *in vitro*." International Journal Of Developmental Biology **35**(4): 463-72.
- Shuler, C. F., D. E. Halpern., Y. Guo., A. C. Sank (1992). "Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation *in vivo*." Developmental Biology **154**(2): 318-30.
- Siegenthaler, G. and J. H. Saurat (1989). "Retinoid binding proteins and human skin." Pharmac Ther **40**(1): 45-54.
- Smiley, G. R. and A. D. Dixon (1968). "Fine structure of midline epithelium in the developing palate of the mouse." Anatomical Record **161**(3): 293-310.
- Song, W., K. Jackson., P. G. McGuire (2000). "Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelia-mesenchyme transformation of the endocardial cushions." Developmental Biology **227**(2): 606-617.
- Stratford, T., C. Horton., M. Maden (1996). "Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud." Current Biology **6**(9): 1124-33.
- Sulik, K. and D. Dehart (1988). "Retinoic acid induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death." Teratology **37**: 527-537.
- Sulik, K. K., C. S. Cook., W. S. Webster (1988). "Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death." Development **103 Suppl**: 213-31.
- Sulston, J. and H. R. Horvitz (1977). "Postembryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Developmental Biology **56**: 110-156.
- Susin, S. A. et al (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 387-389.
- Swindell, E. C. et al (1999). "Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chicken embryo." Developmental Biology **216**(1): 282-296.
- Taniguchi, K., N. Sato., Y. Uchiyama (1995). "Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves

during fusion." Archives Of Histology And Cytology 58(2): 191-203.

Taya, Y., S. O'Kane., M. W. Ferguson (1999). "Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice." Development 126(17): 3869-79.

Thaller, C. and G. Eichele (1987). "Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud." Nature 327(6123): 625-8.

Tudela, C. et al (2002). "TGF beta-3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion." International Journal of Developmental Biology 46(3): 333-336.

Viviano, C. N. and J. P. Brockes (1996). "Is retinoic acid an endogenous ligand during urodele limb regeneration?" International Journal of Developmental Biology 40(4): 817-822.

Wallingford, J. B., S. E. Fraser., R. M. Harland (2002). "Convergent extension: The molecular control of polarized cell movement during embryonic development." Cell 2: 695-706.

Weil, M., M. D. Jacobson., M. C. Raff (1997). "Is programmed cell death required for neural tube closure?" Current Biology 7(4): 281-4.

Wilson, J. G., C. B. Roth., J. Warkany (1953). "An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation." American Journal of Anatomy 92: 189-217.

Young, D. L., R. A. Schneider., D. Hu., J. A. Helms (2000). "Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development." Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 11(3): 304-317.

Zakeri, Z. F. and H. S. Ahuja (1994). "Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation." Biochemistry and Cell Biology 72(11-12): 603-13.

Zou, H. and L. Niswander (1996). "Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation [see comments]." Science 272(5262): 738-41.

Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurlle (2002). "Programmed cell death in the developing limb."

International Journal of Developmental Biology 46: 871-876.

TEJIS CON
FUELA DE ORIGEN



Programmed Cell Death Is Required for Palate Shelf Fusion and Is Regulated by Retinoic Acid

Rodrigo Cuervo,* Concepción Valencia,* Roshantha A. S. Chandraratna,†
and Luis Covarrubias*¹

*Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México; and †Retinoid Research, Departments of Biology and Chemistry, Allergan, Irvine, California 92623-9534

The actual role of programmed cell death (PCD) in embryonic processes and the extrinsic signals that define the death fate in developing cells are still poorly understood. Here, we show that during secondary palate shelf fusion in the mouse, PCD appeared in the medial edge epithelia (MEE) of the anterior region only after shelf contact. Contact was necessary for efficient cell death activation in the MEE. However, exogenous all-trans-retinoic acid (RA) increased cell death independently of contact. Competence to induce cell death by contact or by RA exposure was obtained when the MEE were close to touch. Endogenous RA is a relevant regulator of the secondary palate PCD since this was reduced by a retinol dehydrogenase inhibitor and an RAR specific antagonist. *Bmp-7* expression was positively regulated by RA. However, BMP-7 was unable to activate cell death within the palate tissue and NOGGIN, a natural BMP antagonist, did not block PCD. Reduction of PCD at the MEE directly with a caspase inhibitor or by inhibiting retinol dehydrogenase resulted in unfused palate shelves, but adhesion was not affected. In contrast, exogenous RA also blocked fusion, but in this situation the increased cell death within the MEE appeared to affect adhesion, thereby causing cleft palate *in vivo*. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: programmed cell death; palate development; tissue fusion; retinoic acid.

INTRODUCTION

The formation of the secondary palate is a good model for studying the mechanisms involved in tissue fusion, a recurrent process during the morphogenesis of many structures. In the mouse, secondary palate shelves arise from the developing maxillary process at 12.5 days *post coitus* (d.p.c.) by initially growing in a vertical direction and then reaching a horizontal position at 14.5 d.p.c. (Ferguson, 1988). At this time, the palate shelves are ready to make contact with each other and thereupon to fuse. Contact occurs at the leading growing borders of the shelves, a region known as the medial edge epithelium (MEE). After contact, adhesion between shelves progresses within the MEE to form the midline epithelial seam (MES). The MES is first a multi-layer epithelium, which then thins to form a single cell epithelium at the time some cells derived from the MEE accumulate at its oral and nasal ends. MES elimination

results in shelf fusion and separation of the nasal and oral cavities.

PCD accompanied by the typical characteristics of apoptosis has been observed in the MES (DeAngelis and Nalbandian, 1968; Farbman, 1968; Mori *et al.*, 1994; Smiley and Dixon, 1968; Taniguchi *et al.*, 1995). However, controversial data have left many unanswered questions such as: How important is shelf contact for the initiation of PCD? What is the role of PCD during shelf fusion? What is the major fate of MEE cells? While cell death may be considered the most obvious way to degenerate the MEE, other mechanisms such as epithelial-mesenchyme transformation (Fitchett and Hay, 1989) or formation of the epithelial triangles by migration of epithelial cells across the fusion line (Carette and Ferguson, 1992), have also been proposed as being relevant for the fusion process. A recent study (Martínez-Alvarez *et al.*, 2000), suggested that MEE cell death, transformation into mesenchyme, and migration, all contribute to the fusion process. Nonetheless, there is currently no conclusive evidence indicating the essential function of any of these processes for shelf fusion.

The activation phase of PCD is likely to result from a

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: 52-777-317-2388. E-mail: covs@ibt.unam.mx.

balance between survival and cell death-inducing signals (Raff, 1992). However, little is known about the specific extrinsic molecules that determine the death fate of developing cells *in vivo*. Because BMP-2, BMP-4, and BMP-7 are potent inducers of cell death in several model systems (Graham et al., 1994; Macias et al., 1997), they are potential candidates for controlling PCD in the palate. In fact, several BMPs are expressed in the palate (Bitgood and McMahon, 1995; Lu et al., 2000) but their function has not been clearly defined. Retinoic acid (RA) could be another factor that may control PCD. Exogenous RA has been shown to activate apoptosis of different cell types when injected into pregnant mice (Sulik et al., 1988). RA is a strong teratogen with very sensitive dose and stage dependent effects on palate formation (Abbott et al., 1989; Newall and Edwards, 1981a,b). RA-induced cleft palate could be caused by inhibition of shelf growth or of shelf fusion itself. However, the possibility that RA regulates PCD at the MES has not been evaluated.

In the present work, we investigated the regulatory elements that control PCD at the MEE of secondary palate shelves. We have identified contact as a relevant event for MEE PCD activation and RA as a molecule that mediates this activation. Interestingly, MEE cells become competent to undergo cell death at the developmental stage when the shelves are in close proximity to each other. We also studied the relevance of MEE PCD in shelf fusion and found that PCD is required for the fusion process. Therefore, alterations in the regulatory events controlling PCD could produce cleft palate *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Animal Handling and Palate Dissection

Mouse strain CD-1 was used in this study. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation between 12.5 and 18.5 d.p.c. (vaginal plug was found at 0.5 d.p.c.). Apposition and contact of palate shelves occur between 14.3–14.5 d.p.c., although some differences exist even within the same litter. Palates were isolated from embryos by performing two transversal cuts (Fig. 1), one just above the eye, and the second throughout the mouth over the tongue. From this slice, we removed the rest of the tissue with two cuts following the natural form of the palate. Dissected palates were either immediately processed for cell death detection as described below, or transferred to cold L15 medium (Microlab, México) until they were placed in culture.

To evaluate the *in vivo* effect of exogenous RA, a single intraperitoneal injection of 100 mg/kg RA suspended in 200 μ l of sesame oil (100 mg/ml stock solution in DMSO, stored at -70°C) was administered to pregnant females at 14.2 d.p.c. Controls were treated with the equivalent amount of DMSO according to their weight. After 8 h and at 18.5 d.p.c., fetuses were extracted and palates analyzed for cell death or teratogenic alterations, respectively.

Organ Culture

The protocol used to culture embryonic palates was based on the one used by Taketo and Koide to culture embryonic gonads (Taketo

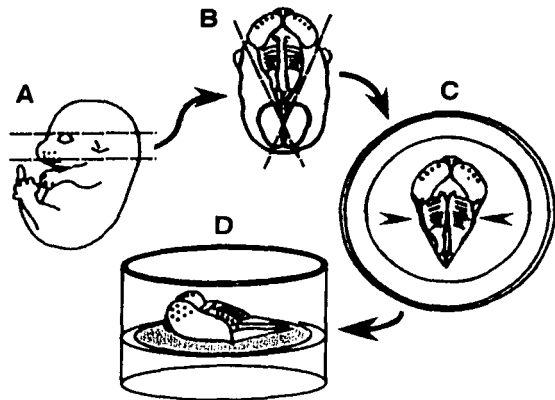


FIG. 1. Schematic representation of dissection and culture procedures used in the present study. Palates were dissected from embryos by performing two transversal cuts, one just above the eye, and the second throughout the mouth over the tongue, such that the nasal cavity remained intact (A). From this slice we removed the rest of the tissue by two cuts following the natural form of the palate (B). Palates were set nasal side down in a Millipore filter and shelves were forced to touch (C). Finally, the filter was floated on a serum-free medium (D).

and Koide, 1981). Selected palates, generally before shelf contact, were cultured on 0.22 μm -pore Durapore membrane filter (Millipore) floating in defined McCoy 5a Modified Medium (Microlab), without serum and supplemented with 200 U/ml penicillin G sodium, 200 mg/ml streptomycin sulfate, and 2 mM glutamine (Gibco, Grand Island, NY). Once in the filter, when required, shelves were brought into proximity with tweezers to ensure culture time 'zero' as the time of first contact. Cultures were maintained up to 20 h in a humidified incubator at 37°C , in 5% CO_2 , 95% air. Although occasionally in this work we cultured isolated shelves, whole palates were preferred because shelf fusion occurs more efficiently. We think that the tissue around the shelves helps to hold the natural concave form of the palate, favoring contact and allowing the complete fusion process to occur before 20 h of culture. All reagents and proteins assayed were added directly to the culture medium or absorbed in acrylic beads, and initially tested to determine the optimal concentration for the studies presented. RA and retinol (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) were used at 20 and 200 μM final concentration, respectively, from a 100 mM stock solution dissolved in DMSO and stored at -70°C . Citral and Nerol (Sigma, St. Louis, MO) were added, from a freshly prepared 100 mM stock solution dissolved in absolute ethanol, at a 50 μM final concentration. z-VAD (Biomol, Plymouth, PA) was used at a 100 μM final concentration from a 100 mM stock solution in DMSO and stored at -70°C . Retinoic acid receptor (RAR) agonist, AGN 191183 (TTNPB) (Allergan, Irvine, CA) was used from a 100 mM stock solution in DMSO, at 20 μM final concentration. Retinoic acid receptor antagonist AGN 193109 (Allergan, Irvine, CA) was used, from a 20 mM stock solution in DMSO, at a 100 and 200 μM final concentration. Human BMP-7 (Creative Molecules, Cambridge, MA), BMP-2 (Genetics Institute, Cam-

bridge, MA), and NOGGIN (Regeneron, Tarrytown, NY) proteins were absorbed in PBS washed acrylic beads (80–120 μm in diameter; Sigma, St. Louis, MO) directly from a 1 mg/ml stock solution. Adenovirus infections were carried out by incubating palates from 13.5 embryos with 10 μl of a virus suspension of approximately 10^4 pfu/ μl for 1.5 h at 37°C. After this period of time, palates were washed with L15 medium, shelves put in contact and cultured as indicated above for 24 h. For the limbs, adenovirus was injected in the interdigital region of limbs from 12.5 d.p.c. embryos and immediately cultured for 24 h as previously reported [Salas-Vidal *et al.*, 1998].

Cell Death Detection

For whole mount cell death detection, we incubated whole palates for 15 min at 37°C with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ acridine orange (AO) in PBS (from a 5 mg/ml stock in PBS) followed by one wash with PBS. For cell death detection on sections, we performed TUNEL assays in 4% paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded 8 μm serial sections of palates using the "In Situ Cell Death Detection-fluorescein" kit ("TUNEL-fluorescein"; Boehringer-Mannheim, Germany) and according to the manufacturer's instructions. Images were taken on a confocal microscope Bio-Rad MRC-600 equipped with a krypton/argon laser. AO and TUNEL-fluorescein stained tissues were excited with blue light (488 nm), and the red high-sensitivity filter was used to detect AO fluorescence, and the blue high-sensitivity filter for TUNEL-fluorescein fluorescence detection.

Whole Mount RNA *In Situ* Hybridizations

Hybridizations were performed following the protocol of D. G. Wilkinson and M. A. Nieto (Wilkinson and Nieto, 1993). All palates analyzed were previously cultured for 10 h in the continued presence of RA, citral, nerol, and their respective control mediums, and stained with AO to corroborate the changes in cell death. These palates were fixed and processed for whole mount *in situ* hybridizations with digoxigenin-labeled riboprobes. The digoxigenin-labeled riboprobes were produced using T3 or T7 RNA polymerase (Gibco BRL, Grand Island, NY), depending on the specific fragment in pKS, following the manufacturer's instructions. The antisense riboprobes were for: *Shh* (539 bp transcript corresponding to nucleotides 61–600), *Tg β 3* (609 bp transcript corresponding to nucleotides 831–1440), *Bmp-7* (1323 bp transcript corresponding to the full length cDNA), *Bmp-4* (1550 bp transcript corresponding to full length cDNA), *Msx-1* (650 bp long transcript corresponding to coding and noncoding regions 3' to the homeobox), *Msx-2* (260 bp transcript corresponding mostly to 3' untranslated regions).

RESULTS

Programmed Cell Death during Palate Shelf Fusion

To study the role of cell death during secondary palate shelf fusion, we first followed this process during normal *in vivo* development. The palate can be divided in two regions: the anterior or hard palate, which is characterized by the presence of rugae, and the posterior or soft palate, which lacks rugae. Palates from mouse embryos between 12.5 and

16.5 d.p.c. were dissected and stained with AO, an indicator of cell death (Fig. 2A). The patterns obtained with AO were confirmed by the TUNEL assay performed on palate slices (Fig. 2B). At 12.5 d.p.c., secondary palate shelves were emerging and little cell death was detected in the shelves. The first signs of cell death in the palate shelves were detected at 13.5 d.p.c. in the most anterior rugae and, as development proceeded, cell death started appearing in the posterior rugae, until it became undetectable in embryos at 16.5 d.p.c. These dying cells were located within the epithelial tissue (Fig. 2B, 14.5e/r1). Cell death in rugae may be associated with their formation.

As seen in Fig. 2A (14.5c), the first shelf contact occurred at 14.5 d.p.c. in the anterior region between rugae 3 and 4, and adhesion moved rapidly to the posterior end and slowly to the anterior end (Fig. 2A, 14.5c-h). Cell death at the MEE was initially only detected within the posterior palate, before shelf contact (Fig. 2A, 14.5 days). Cell death in this region extended rostrally from its most caudal portion as development proceeded (Fig. 2A, 14.5 days-f). After shelf contact, cell death could be detected in the MEE of the anterior palate, but only in the adhered region (Fig. 2A, 14.5e-f; Fig. 2B). Finally, cell death coming from the MEE of the anterior and posterior palate regions converged to form a single line of cell death (Fig. 2A, 14.5f-h) essentially covering the whole MEE area and also the nasal septum contact regions (Fig. 2B, 14.5h). At 15.5 d.p.c., shelf fusion was very advanced and cell death at the MES had almost completely disappeared (Fig. 2A). The posterior palate shelf region also showed cell death at well defined spots, which may correspond to emerging gustative papilla [see for instance Fig. 2A, 15.5]. In agreement with previous reports [Martinez-Alvarez *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 1994], very few dying cells were located outside the epithelial tissue.

The data described above illustrate two distinctive cell death patterns. One occurring in the posterior palate, where PCD is first observed in the MEE before shelf contact and also in the emerging gustative papilla. The other is seen in the anterior palate, in which PCD is first observed in the rugae, which follows an anterior-posterior direction, and in the MEE after shelf contact.

Role of Contact in Triggering Cell Death at the MES

To test the possibility that contact between shelves at the anterior region is one of the events required to trigger cell death, we studied cell death during palate shelf fusion *in vitro* (Fig. 3). One and a half-hour after contact, adhesion between shelves was very strong (i.e. shelves did not separate even when pulled with forceps) but no signs of cell death were as yet detected (Fig. 3, +contact/1.5). However, by 2 h, the first signs of cell death were observed within the adhered epithelia and became more evident by 3.5 h after contact (Fig. 3, +contact/3.5). Cell death continued to increase and, by 6 h after contact, cell death was present along the whole length of the MES (Fig. 3, +contact/6/0). Interestingly, if palate shelves were not

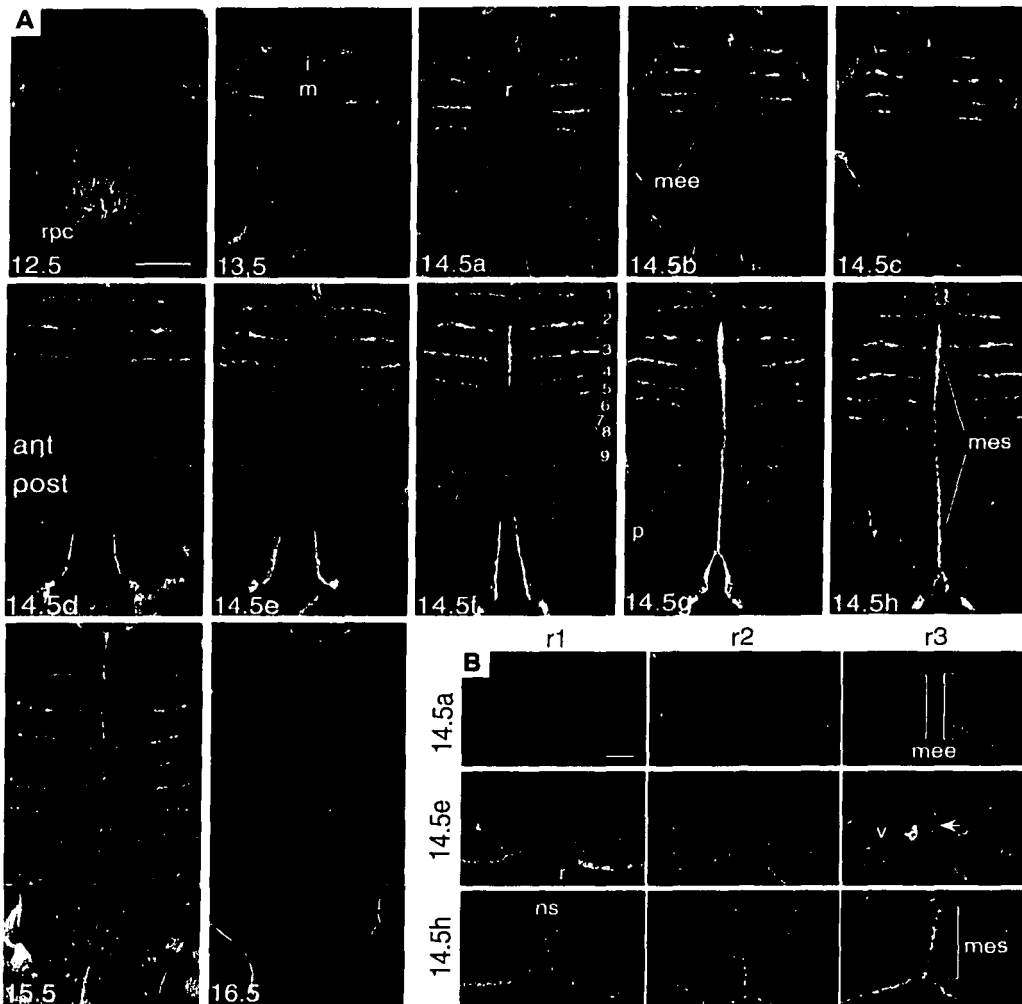


FIG. 2. PCD patterns during palate development. Palates were dissected at different developmental stages, and immediately stained with AO (A) or processed for the TUNEL assay (B) as described in Material and Methods. Transverse slices shown in B are from the stage indicated at the left and at the level of the rugae indicated at the top. Note that cell death in the medial edge epithelia (mee) of the anterior region (ant) is observed only after shelves have gotten in contact, thus, within the midline epithelial seam (mes), whereas in the MEE of the posterior region (post) cell death is observed before contact. Cell death was also detected in the palate contact area within the nasal septum (ns), and in the rugae (r) and the putative papillae (p) of hard and soft palate, respectively, and also in the Rathke's pouch closure (rpc), developing incisors (i) and molars (m). Autofluorescence by erythrocytes within a blood vessel (v) was occasionally observed. Bar (A) = 500 μ m, Bar (B) = 100 μ m.

allowed to make contact, cell death was detected in very low density and only after 6 h in culture (Fig. 3, -contact). Cell death in rugae was not affected by contact in

these experiments. These data indicate that contact between shelves is required to efficiently induce PCD in the anterior palate MES.

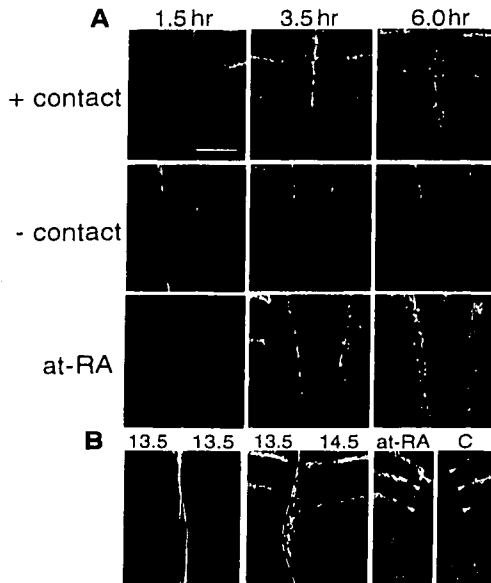


FIG. 3. Cell death patterns in palates cultured under different conditions. (A) Dissected palates from 14.5 d.p.c. embryos were cultured such that, at time '0', shelf contact was forced (+contact), or avoided (-contact) in the absence or presence of RA. Cell death pattern, determined by AO staining, is shown after the time in culture indicated. Cell death was observed only when contact was allowed or RA was added to the culture medium. These experiments were independently repeated at least three-times with similar outcome. (B) Palates from 13.5 d.p.c. embryos were also forced into contact, but cell death was not detected after 6 h in culture (left panel). Nonetheless, palates at this stage were able to activate cell death of 14.5 d.p.c. palates, but not *vice versa* (center panel). All-trans-RA increased cell death in rugae (arrowheads) but not in the MEE of 13.5 d.p.c. palates (right panel); C, palate cultured without RA). These experiments were independently repeated twice with similar outcome. Bar = 250 μ m.

Role of RA in the Control of Cell Death during Palate Shelf Fusion

Palate shelves of 13.5 d.p.c. embryos that were forced to form contact, adhered only weakly, did not display cell death in the MEE (Fig. 3B, left panel) and did not fuse (data not shown). Moreover, when one 13.5 d.p.c. embryo palate shelf is put in contact with one 14.5 d.p.c. embryo palate shelf, cell death was turned on only in the MEE of the shelf from the 14.5 d.p.c. embryo (Fig. 3B, center panel). These data are in agreement with the possibility that the palate shelf MEE produces a specific cell death inducing signal. This signal is already present in palates of 13.5 d.p.c. embryos and it activates cell death in a responsive cell population appearing around 14.5 d.p.c.

To test whether RA is a candidate cell death inducing molecule on palatal tissue, we cultured palates from 14.5 d.p.c. embryos for 8 h in the presence of all-trans-RA (RA) or retinol. As shown in Fig. 4A, RA increased cell death in the same regions that naturally display cell death, namely the rugae and the anterior and posterior regions of the MES. The same effect was observed in palates cultured with retinol, though, as expected, higher doses were required. In the absence of contact, RA was able to induce cell death along the whole length of the MEE of palate shelves from 14.5 d.p.c. embryos, and with a kinetic profile that was very similar to that induced by contact (Fig. 3A, bottom panels). Interestingly, palate shelves from 13.5 d.p.c. embryos treated with RA show an evident increase in cell death only in rugae and not within the MEE (Fig. 3B, right panel).

To confirm the effects described above for RA and retinol, and to determine whether endogenous RA could participate in triggering the PCD observed in the palate, we used citral, an inhibitor of alcohol dehydrogenases including retinol dehydrogenase (Kikonyogo *et al.*, 1999; Schuh *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1996), and AGN193109, a retinoic acid receptor (RAR) antagonist. Citral reduced the cell death observed naturally in the rugae and in the anterior and posterior MES (Fig. 4A), suggesting that endogenous RA is activating cell death in those palate regions. Supporting the specific inhibitory activity of citral on retinol-dehydrogenase, this compound reduced the effects on cell death produced by exogenous retinol but not by RA. Nerol, an analogous compound to citral without alcohol dehydrogenase inhibitory activity, did not show any effect. As expected, the effect of citral was reversible because cell death occurred after its removal from the culture medium (data not shown). AGN193109, a synthetic RAR antagonist (Johnson *et al.*, 1995), also reduced the natural cell death in both the rugae and MES, and the cell death activated by exogenous RA or AGN191183, a potent RAR agonist (Fig. 4B). Note that RA regulation is also observed in the regions of the posterior palate undergoing PCD. Therefore, RA is an endogenous mediator of the cell death occurring during palate development, and signaling by this molecule is likely to be initiated soon after contact of anterior shelf regions.

Gene Activation by RA in Regions Carrying Programmed Cell Death and the Role of TGF β Family Members

We selected *Bmp-4*, *Shh* (Bitgood and McMahon, 1995) and *Tgf β -3* (Fitzpatrick *et al.*, 1990; Pelton *et al.*, 1990) for these studies because they are prominently expressed in the rugae or MES. *Bmp-7* was also considered because recent evidence indicates that it is relevant for the control of interdigital cell death. At 13.5 d.p.c., *Shh*, *Bmp-4*, and *Bmp-7* were expressed but not *Tgf β -3* (data not shown). At 14.5 d.p.c., expression of all these genes was more evident and some differences started to appear. *Shh* (Fig. 5A) and

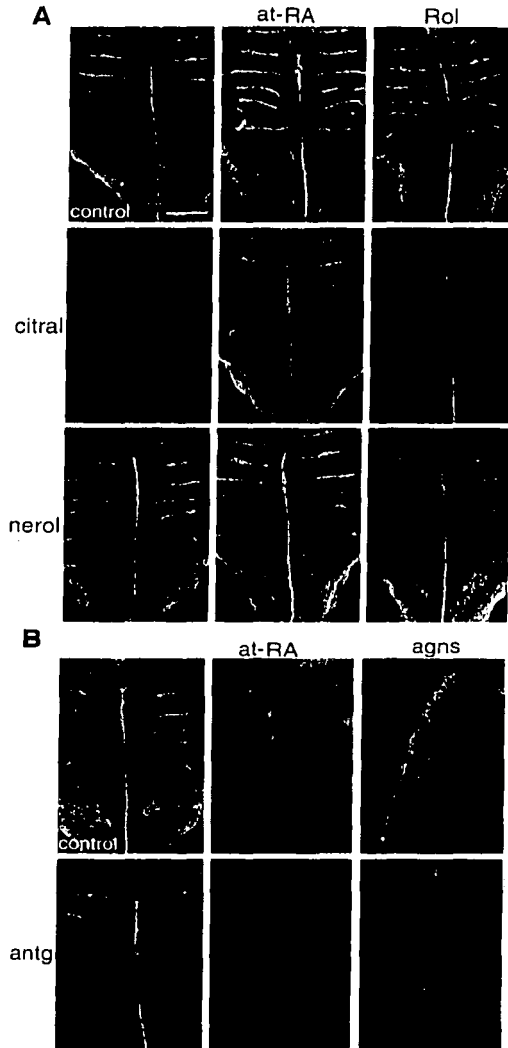


FIG. 4. Cell death effects of exogenous and endogenous RA. (A) All-trans-RA or retinol (Ret), alone or in combination with the retinol dehydrogenase inhibitor, citral, or the inactive control reagent, nerol, were added to the medium and palates cultured for 8 h. Note that cell death was activated by RA and its precursor retinol, whereas citral inhibited natural and exogenous retinol-activated cell death. Nerol did not show any effect on cell death. Similar results were obtained in at least five independent experiments. (B) All-trans-RA or the specific RAR agonist, AGN 191183 (agns), were added alone or in the presence of the specific RAR antagonist AGN193109 (antg). Note that both, RA and the RAR agonist activated cell death in rugae and MEE, whereas the RAR antagonist decreased natural and exogenously activated cell death. These experiments were repeated twice with similar outcome. Bar = 500 μ m.

Bmp-4 (data not shown) were expressed only in rugae, the former in the epithelial tissue and the latter in the mesenchymal component (see also Bitgood and McMahon, 1995). *Tgfb-3* was expressed only in the MES and MEE (Fig. 5J and K) with a pattern mainly restricted to the oral cavity side of MEE, both before (Fig. 5J) and after contact (Fig. 5K). *Bmp-7* was expressed in the epithelial component of the rugae and also in the MEE, though the expression region was broader than that seen for *Shh* or *Tgfb-3* (Fig. 5F). The expression pattern of *Bmp-7* in the MEE was similar to that of *Tgfb-3*, that is, expression was higher in the oral than in the nasal side of MEE and was detected before (Fig. 5E) and after contact (Fig. 5F).

To define the molecular cascade that drives palate cells towards apoptosis, we studied the expression of the selected genes under conditions of high (with exogenous RA added) or low (with citral) RA concentrations (Fig. 5). Whole palates were cultured in the presence of RA or citral and, after 10 h, they were processed for whole mount *in situ* hybridization. The expected effects on cell death were confirmed in these experiments. *Bmp-4* expression was not clearly affected by either high or low RA concentrations (data not shown); whereas *Bmp-7* expression increased at high RA concentration (Fig. 5G) and decreased at low RA concentrations (Fig. 5H). *Shh* expression, on the other hand, was negatively regulated in response to high (Fig. 5B), or low RA concentrations (Fig. 5C), and was never detected in the MES. RA also affected *Tgfb-3* expression but, in this case, high RA concentration decreased expression (Fig. 5L), while low RA concentration increased expression (Fig. 5M). In summary, although endogenous and exogenous RA regulated *Shh* and *Tgfb-3* expression, only the changes observed in *Bmp-7* expression correlated directly with the changes observed in cell death. Therefore, *Bmp-7*, which is expressed in both rugae and MEE, could be a direct mediator of the pro-apoptotic activity of RA.

Evaluation of BMP Function in Palate PCD

We tested the ability of BMP-7 (or of BMP-2) to induce cell death by adding it directly to the medium or by implanting acrylic beads containing the factor near rugae or MEE, before and during fusion (Fig. 6A; see Materials and Methods). No significant increases in cell death were detected under any of the conditions tested (data not shown). These experiments were also performed in the presence of RA and no cell death around the BMP-7 bead was observed.

We further investigated the possibility that endogenous BMP-7 participates in the natural PCD process. For this purpose, we tested the ability of two natural inhibitors of BMP signaling, NOGGIN (which acts at the extracellular level) and SMAD-6, (which acts at the intracellular level), to block PCD. As with BMP-7, we added NOGGIN directly to the medium or embedded it in acrylic beads (Fig. 6A), whereas to overexpress *Smad-6* in MEE cells, an adenovirus carrying the SMAD-6 coding sequence was used. Significant decreases in PCD were not observed with the introduction of either NOGGIN or SMAD-6 (data not shown). Infection

with an adenovirus carrying the *LacZ* gene showed very high transfection efficiency into MEE cells (Fig. 6E). The BMPs and NOGGIN used in the above assays were demonstrated to be active by their ability to increase interdigital cell death or to inhibit natural and BMP-7-induced interdigital cell death, respectively (Figs. 6B–6D). The activity of the SMAD-6 encoded in the recombinant adenovirus was demonstrated by its ability to inhibit natural interdigital cell death (Figs. 6F–6H). These data indicate that BMPs do not play a role in palate PCD.

Inhibition of Cell Death during Palate Shelf Fusion

The pattern of PCD at the palate MES correlated with the process of shelf fusion. We wished to determine whether cell death was necessary for MES degeneration or was merely a consequence of the process. Caspases are considered central for the activation of PCD, particularly for the process occurring by apoptosis, and inhibition of these enzymes will lead to blockage in cell death (Milligan *et al.*, 1995). To determine whether the apoptotic cell death in the MEE is necessary for shelf fusion, we cultured whole palates just before shelf contact in the presence or absence of a broad-spectrum caspase inhibitor, z-VAD. The caspase inhibitor used was very effective in inhibiting the cell death in the palate rugae and MES as determined by AO staining after 8 h in culture (Fig. 7A, z-VAD); notably, adhesion was not affected. The caspase inhibitor also reduced the cell death induced by RA and retinol, supporting the notion that the induced cell death is apoptotic in nature (Fig. 7A, RA/z-VAD and Ret/z-VAD). Histological examination of palates cultured for 20 h in the absence of z-VAD showed that the MEE completely had disappeared, indicating complete fusion (Fig. 7B, control). However, in the presence of z-VAD, although the fusion line epithelia thinned, the MEE did not disappear, thereby indicating poor fusion (Fig. 7B, z-VAD); intimate contact between epithelia was retained under this condition. Therefore, cell death at the MES is required for MEE degeneration and hence for palate shelf fusion.

In accordance with our data demonstrating that RA induced cell death at the MES, inhibition of retinol dehydrogenase also reduced MEE degeneration (Fig. 7B, citral). Exogenous RA also inhibited shelf fusion, but in this case the increase in cell death clearly affected shelf adhesion (Fig. 7B, RA). This latter effect was confirmed *in vivo* in pregnant mice treated intraperitoneally with RA at the stage where palate shelves are close to making contact (i.e. 14.2 d.p.c.). Eight-hours after injection a prominent increase in cell death was observed in all cases in the same areas where cell death occurs normally (Figs. 8A–8D). Of particular interest was the fact that cell death occurred at the MEE even in the absence of contact (Figs. 8C–8F), observation that is in agreement with the data presented above. At the end of pregnancy, approximately 73% of the RA treated embryos (14/19) had cleft palate (Fig. 8H) compared to 0% of control injected mice ($n = 16/16$). These data suggest that cells in the palate normally programmed to die are highly

responsive to a death stimulus by RA, and that increased cell death in the MEE before contact could interfere with shelf adhesion causing cleft palate.

DISCUSSION

The formation of secondary palate involves several ordered steps starting with shelf growth and elevation, and followed by contact, adhesion, and disappearance of the MEE. Disruption at any stage of palate development could potentially cause cleft palate. Actually, cleft palate is a phenotype associated with mutations in several genes that might act at different stages of palate development (Kaartinen *et al.*, 1995; Lohnes *et al.*, 1994; Miettinen *et al.*, 1999; Proetzel *et al.*, 1995).

Palate Shelf Contact Is Required for PCD Activation at the MEE

Our analysis focused on determining the role of cell death in the process of shelf fusion. PCD in the MEE of the anterior region always occurred after contact, whereas cell death in the MEE of the posterior region was seen before contact. PCD in the anterior and posterior regions finally converged to form a single area of cell death that corresponded precisely to the MES. Although cell death in the MEE has been observed by other groups, there is disagreement as to whether it occurs before (Martinez-Alvarez *et al.*, 2000; Mato and Katahira, 1967; Smiley, 1970; Taniguchi *et al.*, 1995) or after contact (DeAngelis and Nalbandian, 1968; Farbman, 1968; Mori *et al.*, 1994; Swency and Shapiro, 1970). Our study reconciles these conflicting observations since in previous work the MEE area studied was either from the posterior region or was not specified.

Because cell death in the anterior region was observed only after contact, we considered the possibility that the contact event itself was able to turn on a cell death activation mechanism as had been previously suggested (Miller and Shapiro, 1968). In support of this hypothesis, we observed that activation of cell death was very inefficient when contact was prevented. In contrast, rapid cell death activation occurred within the MEE when shelves were forced to come into contact. Contact might induce the fusion process and cell death could occur subsequently. However, the rapid activation of cell death after contact, together with additional results discussed below, suggest that PCD anticipates fusion. Contact could induce the production of molecules such as growth factors and their receptors that participate in cell death activation. Our data suggest that the death signaling molecule is already present at 13.5 d.p.c., but the competence to respond to this factor appears before contact in a time window between 13.5 and 14.5 d.p.c.

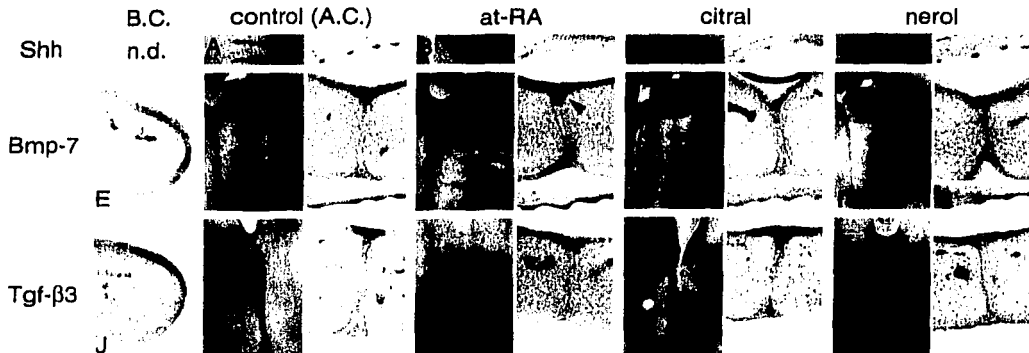


FIG. 5. Expression patterns of *Shh*, *Bmp-7*, and *Tgf-β3* during palate shelf fusion and their regulation by RA. Gene expression was analyzed in palates cultured in the absence of exogenous RA (control) or the presence of RA, cital, or nerol. After whole mount hybridization, palates were transected in 50 μm slices. Pattern seen in a slice between r4-r6 is shown (right picture). Expression of *Shh* was down-regulated by either RA and cital (A-D), whereas expression of *Bmp-7* was up-regulated by RA and down-regulated by cital (F-I). Conversely, *Tgf-β3* appeared down-regulated by RA and up-regulated by cital (K-N). Gene expression pattern in palates freshly fixed was identical to the expression pattern of palates cultured in control medium (data not shown). Expression of *Tgf-β3* was detected at 14.5 d.p.c. palates before (J) and after contact (identical to the pattern shown in K) but not in 13.5 d.p.c. palates (data not shown). The strongest expression of *Bmp-7* and *Tgf-β3* in 14.5 d.p.c. palates before contact (E, J) and after contact (F, K) was mainly restricted to the oral cavity side (top of each panel) of the MEE. Similar results were obtained in two independent experiments. B. C., 'before contact'; A. C., 'after contact'; n.d., 'not detected'.

RA Regulates PCD in the Developing Palate

Previous work has shown that the teratogenic effects of RA depend strongly on the time of its application. Single RA applications into pregnant mice from 11.5–14.5 d.p.c. produce cleft palate and other malformations (Abbott *et al.*, 1989; Newall and Edwards, 1981a,b). Shelf growth and elevation as well as shelf fusion arc processes that could be affected by the teratogenic doses of RA. We present here for the first time, data suggesting that the teratogenic effect of RA at the shelf fusion stage (i.e. 14.5 d.p.c.) results from a direct increase in MEE cell death.

By using an inhibitor of retinol dehydrogenase and an RAR antagonist, we also provide data indicating that endogenous RA is a relevant regulator of PCD. Supporting a role for endogenous RA in palate development, the double mutant *Rara*^{-/-}; *Rarg*^{-/-} mouse embryos display cleft palate with high frequency (Lohnes *et al.*, 1994). Transgenic mice expressing a dominant negative form of RARα also show this alteration (Damm *et al.*, 1993). However, it is important to note that in these previous cases, the phase(s) at which palate development is disrupted has not been defined. Our data indicate that endogenous RA is an important regulator of PCD within the MEE, which function appears essential for shelf fusion (see below).

RA and its receptors (RARs) are candidate molecules for mediating the cell death activation promoted by contact. We found a positive correlation in the gain of responsiveness to contact and the gain of responsiveness to RA. Furthermore, we observed that RA-induced cell death in the MEE occurred with a kinetic profile similar to that observed

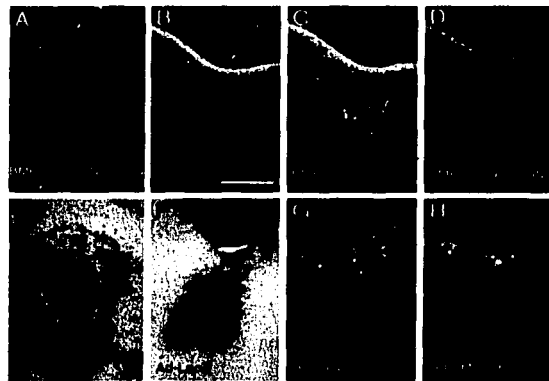


FIG. 6. Evaluation of BMP function in palate PCD. Acrylic beads embedded in BMP or NOGGIN were located in the areas of the developing palate indicated (A, red or blue circles). Except when the bead was located outside the shelves, in all other cases the bead was inserted underneath the epithelial tissue. No changes in the cell death pattern were observed in any of the places where the bead was inserted (data not shown). Similar beads were located in the limb interdigital region (id) and the expected activity for BMP7 (or BMP2) and NOGGIN was observed, that is, BMP increased interdigital cell death and NOGGIN reduced BMP-7-induced and natural interdigital cell death (B-D). MEE was very efficiently infected with an adenovirus expressing *LacZ* (E). However, when palates were infected with Ad-SMAD-6, a recombinant adenovirus containing the coding sequence for SMAD-6, cell death in the MEE observed during fusion was not modified (data not shown). Activity of the SMAD-6 coded by Ad-SMAD-6 was verified by infecting interdigital regions. As expected, cell death was reduced in Ad-SMAD-6 (H) but not in Ad-LacZ (F, G) infected interdigits. Bar = 50 μm.

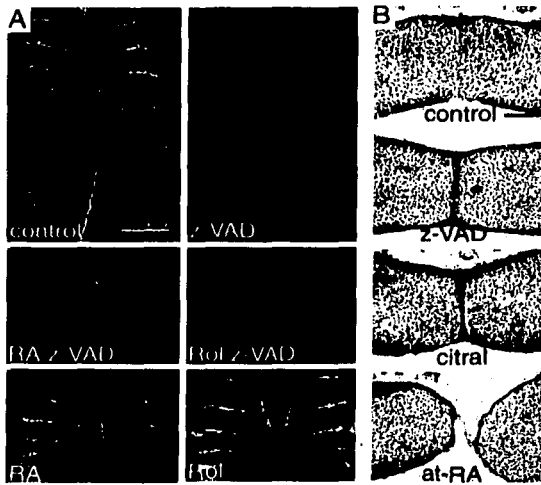
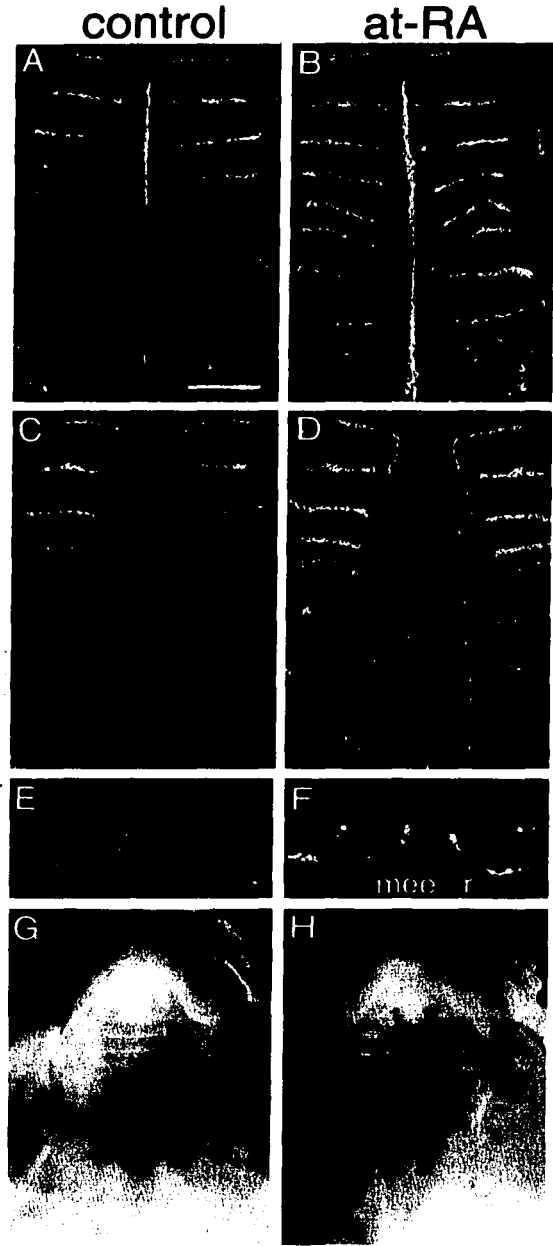


FIG. 7. Inhibition and RA activation of cell death and their effects on MES degeneration. Palates were cultured in medium with or without RA, retinol (Ret), or citral, in the absence (control) or presence of the broad-spectrum caspase inhibitor z-VAD. (A) Samples were analyzed for cell death after 8 h in culture by AO staining. Observe that normal cell death as well as that induced by RA or retinol was inhibited by z-VAD. These experiments were repeated three-times. (B) Samples were analyzed for MES degeneration after 24 h in culture by HE histochemistry. Observe that both z-VAD and citral inhibited MES degeneration, whereas RA appears to affect shelf adhesion. Bar (A) = 500 μm ; Bar (B) = 100 μm .

after contact. Northern blot analyses indicate that *Rara*, *Rarb*, and *Rary* are expressed in the developing palate, and that their levels of expression remain constant from 13.5–14.5 d.p.c. (Naitoh *et al.*, 1998). Therefore, competence to activate cell death in the MEE in response to RA or contact does not appear to be related to changes in expression levels of any of the *Rar*'s.

Recently, two studies have proposed a role for endogenous RA in interdigital PCD. Dupé *et al.* (1999) observed that in double mutant *Rarb*^{-/-}; *Rary*^{-/-} mouse embryos,

FIG. 8. *In vivo* activation of cell death by RA and its relationship with cleft palate. Pregnant mice were intraperitoneally injected with a RA at 14.2 d.p.c. After 8 h or at 18.5 d.p.c., fetuses were extracted and palates analyzed for cell death [A–F] or teratogenic alterations [G–H], respectively. Note that cell death was increased by RA treatment in both adhered (A, B) and nonadhered MEE (C–F), which caused cleft palate at high frequency (G, H). In concordance with the *in vitro* experiments, RA also increased cell death in the rugae (r). These experiments were repeated three times with similar outcome. Bar [A–D] = 500 μm ; Bar [E–F] = 100 μm .



interdigital cell death is significantly reduced and is accompanied by a reduction in expression of *Bmp-7* but not of *Msx-1* and *Msx-2*, among other genes studied. In a more direct study in chick limbs, Rodriguez-Leon et al. (1999) show that application of RAR antagonist impregnated beads in the interdigital region reduces cell death. Interestingly, they observed an increase in *Msx-2* and *Bmp-7* expression when RA was applied to the interdigital region, and a down-regulation of *Msx-2* when the RAR antagonist was used. Activation of interdigital cell death by exogenous RA required a BMP molecule since NOGGIN, a natural BMP antagonist, blocked its effect (Rodriguez-Leon et al., 1999).

To determine the mechanism by which RA regulates cell death in the developing palate, we studied genes that are expressed in regions undergoing PCD. Among the genes studied, *Bmp-7* was the only gene whose expression was restricted to all palate regions undergoing PCD and could possibly be directly correlated to the cell death inducing activity of RA. Therefore, it was quite surprising to us that BMP-7 and BMP-2 were unable to activate cell death in palatal tissue. Furthermore, we were also unable to reduce the PCD in the palate to any significant extent with the BMP signaling inhibitors NOGGIN and SMAD-6. These data are in contrast with several studies showing the ability of BMPs to activate cell death or the requirement of this type of factor for PCD. Of particular importance are the studies mentioned above where it is proposed that RA mediates its pro-apoptotic activity through the up-regulation of *Bmp-7* and *Msx-2*. Additional reports have shown the same interrelationship between members of the *Bmp* and *Msx* families in the control of developmental cell death (Ferrari et al., 1998; Graham et al., 1994; Marazzi et al., 1997). Consistent with a 'weak' signaling by BMPs related to PCD during palate development, we have not detected *Msx-1* and *Msx-2* expression in palate regions undergoing PCD (data not shown). On the basis of our data and a recent *in vitro* study using a teratocarcinoma cell line (Fujita et al., 1999), we propose that RA and BMPs both have independent mechanisms for cell death activation, but when they are present together a synergistic activation of PCD is obtained. Perhaps signaling by both factors is 'weak' in the interdigital region and their simultaneous action is required for efficient cell death activation. In the palate, cell death activation could be strongly induced by RA and only very weakly by BMPs and as a consequence, the presence of BMPs may not be required for PCD. In agreement with this proposal, *Bmp-7*^{-/-} mutant mice display limb defects but not cleft palate (Dudley et al., 1995; Luo et al., 1995).

PCD Is Required for Palate Shelf Fusion

During palate shelf fusion, concomitant to PCD, cell migration and epithelial-mesenchyme transformation have been reported to occur in the MES. There is evidence indicating that cells along the MEE could migrate to the nasal and oral cavities to form epithelial triangles, and thus contribute to fusion (Carette and Ferguson, 1992). On the other hand, several reports have shown that epithelial-

mesenchyme transformation occurs during palate shelf fusion (Fitchett and Hay, 1989; Griffith and Hay, 1992; Shuler et al., 1991). This latter process has been considered a major contributor to palate shelf fusion but its essential role has not been demonstrated. According to these reports, PCD could be a secondary event resulting from cell migration or differentiation. Contrary to this view, we propose that cell death is the primary process required for shelf fusion. Our conclusion is based on the following arguments: (1) PCD in the MEE is an early event preceding the fusion process itself. At least for the anterior region, PCD is an immediate response to shelf contact. (2) Large numbers of dying cells are detected within the MEE during the fusion process in contrast to the few cells that are transformed to mesenchyme. (3) *In vitro*, degeneration of the MEE occurs within a very narrow time window (no longer than 24 h) during which we observed a lot of dying cells and no cells being transformed to mesenchyme (R.C. and L.C., unpublished observations). (4) Blocking cell death with a broad-spectrum caspase inhibitor prevents MEE degradation and hence shelf fusion. Also, palate MEE degradation appears to be prevented in *Apaf-1*^{-/-} mutant mice (Ceconi et al., 1998).

It is important to note that our *in vitro* studies show that intimate adhesion between MEE can occur in the absence of PCD but the MES does not degenerate. On the other hand, excessive cell death before contact appears detrimental for adhesion and consequently for fusion. This latter phenomenon could be the cause of cleft palate in embryos treated with RA *in vivo*. Our *in vitro* studies indicate that RA is not involved in shelf adhesion but it is involved only in the degenerative stage of the MEE. Even though our data support the view that cell death is the major process controlling epithelial degeneration, contributions by cell differentiation or migration remain possible. In conclusion, we show that PCD at the MEE is a critical process for palate shelf fusion and that RA is a relevant activator of this process at the time of shelf contact without the apparent participation of BMP molecules.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Andrew McMahon, Dr. Joan Massagué, Dr. Brigid Hogan, Dr. Pierre Chambon, and Dr. B. Robert for kindly providing the mouse *Shh*, *Tgfb-3*, *Bmps*, *Rarb* cDNA clones, and *Msx*'s genomic fragment clones, respectively; Dr. Kohei Miyazono and Makiko Fujii for Ad-LacZ and Ad-SMAD-6 adenoviral constructs; Dr. Diana Escalante-Alcalde and Dr. Katia Del Río-Tsonis for the careful reading of the manuscript; and Elizabeth Mata, Sergio González, Graciela Cabeza, and Xochitl Alvarado for their technical assistance. This work was supported by DGAPA (IN208697 and IN210600) and CONACyT (31730-N).

REFERENCES

- Abbott, B. D., Harris, M. W., and Birnbaum, L. S. (1989). Etiology of retinoic acid-induced cleft palate varies with the embryonic stage. *Teratology* 40, 533-553.

- Bitgood, M. J., and McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Brm genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **172**, 126-138.
- Carette, M. J., and Ferguson, M. W. (1992). The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: An analysis by DII labelling and confocal microscopy. *Development* **114**, 379-388.
- Ceccconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., and Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* **94**, 727-737.
- Damm, K., Heyman, R. A., Umesono, K., and Evans, R. M. (1993). Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **90**, 2989-2993.
- DeAngelis, V., and Nalbandian, J. (1968). Ultrastructure of mouse and rat palatal processes prior to and during secondary palate formation. *Arch. Oral Biol.* **13**, 601-608.
- Dudley, A. T., Lyons, K. M., and Robertson, E. J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* **9**, 2795-2807.
- Dupé, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J. A., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev. Biol.* **208**, 30-43.
- Farbman, A. I. (1968). Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Dev. Biol.* **18**, 93-116.
- Ferguson, M. W. (1988). Palate development. *Development* **103** Suppl, 41-60.
- Ferrari, D., Lichtler, A. C., Pan, Z. Z., Dealy, C. N., Upholt, W. B., and Koshier, R. A. (1998). Ectopic expression of Msx-2 in posterior limb bud mesoderm impairs limb morphogenesis while inducing BMP-4 expression, inhibiting cell proliferation, and promoting apoptosis. *Dev. Biol.* **197**, 12-24.
- Fitchett, J. E., and Hay, E. D. (1989). Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Bio.* **131**, 455-474.
- Fitzpatrick, D. R., Denhez, F., Kondaiah, P., and Akhurst, R. J. (1990). Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* **109**, 585-595.
- Fujita, E., Soyama, A., Kawabata, M., and Momoi, T. (1999). BMP-4 and retinoic acid synergistically induce activation of caspase-9 and cause apoptosis of P19 embryonal carcinoma cells cultured as a monolayer. *Cell Death Differ.* **6**, 1109-1116.
- Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., and Lumsden, A. (1994). The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* **372**, 684-686.
- Griffith, C. M., and Hay, E. D. (1992). Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: Carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* **116**, 1087-1099.
- Johnson, A. T., Klein, E. S., Gillett, S. J., Wang, L., Song, T. K., Pino, M. E., and Chandraratna, R. A. (1995). Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. *J. Med. Chem.* **38**, 4764-4767.
- Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* **11**, 415-421.
- Kikonyogo, A., Abriola, D. P., Dryjanski, M., and Pietruszko, R. (1999). Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist. *Eur. J. Biochem.* **262**, 704-712.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., and Chambon, P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723-2748.
- Lu, H., Jin, Y., and Tipoe, G. L. (2000). Alteration in the expression of bone morphogenetic protein-2,3,4,5 mRNA during pathogenesis of cleft palate in BALB/c mice. *Arch. Oral Biol.* **45**, 133-140.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A. L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* **9**, 2808-2820.
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A., and Hurler, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-1117.
- Marazzi, G., Wang, Y., and Sassoon, D. (1997). Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway. *Dev. Biol.* **186**, 127-138.
- Martinez-Alvarez, C., Tudela, C., Perez-Miguelsanz, J., O'Kane, S., Puerta, J., and Ferguson, M. W. (2000). Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev. Biol.* **220**, 343-357.
- Mato, M. E., and Katahira, M. (1967). Appearance of various types of lysosomes in the epithelium covering lateral palatine shelves during a secondary palate formation. *Gumma J. Med. Sci.* **15**, 46-56.
- Miettinen, P. J., Chin, J. R., Shum, L., Slavkin, H. C., Shuler, C. F., Derynck, R., and Werb, Z. (1999). Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nat. Genet.* **22**, 69-73.
- Miller, H. G., and Shapiro, B. L. (1968). Determinants of epithelial breakdown in palatal fusion. *IADR Program and Abstracts of Papers* **27**.
- Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W., and Schwartz, L. M. (1995). Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Cell* **15**, 385-393.
- Mori, C., Nakamura, N., Okamoto, Y., Osawa, M., and Shiota, K. (1994). Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. *Anat. Embryol.* **190**, 21-28.
- Naitoh, H., Mori, C., Nishimura, Y., and Shiota, K. (1998). Altered expression of retinoic acid (RA) receptor mRNAs in the fetal mouse secondary palate by all-trans and 13-cis RAs: Implications for RA-induced teratogenesis. *Journal of Craniofacial Genet. Dev. Biol.* **18**, 202-210.
- Newall, D. R., and Edwards, J. R. (1981a). The effect of vitamin A on fusion of mouse palates. I. Retinyl palmitate and retinoic acid in vivo. *Teratology* **23**, 115-124.
- Newall, D. R., and Edwards, J. R. (1981b). The effect of vitamin A on fusion of mouse palates. II. retinyl palmitate, retinol, and retinoic acid in vitro. *Teratology* **23**, 125-130.
- Pelton, R. W., Hogan, B. L., Miller, D. A., and Moses, H. L. (1990). Differential expression of genes encoding TGFs beta 1, beta 2, and beta 3 during murine palate formation. *Dev. Biol.* **141**, 456-460.
- Proetzel, G., Pawlowski, S. A., Wiles, M. V., Yin, M., Boivin, G. P., Howles, P. N., Ding, J., Ferguson, M. W., and Doetschman, T. (1995). Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* **11**, 409-414.

- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.
- Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Santesteban, E., and Hurler, J. M. (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat. Cell Biol.* 1, 125-126.
- Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D., and Covarrubias, L. (1998). Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell Res.* 238, 136-147.
- Schuh, T. J., Hall, B. L., Kraft, J. C., Privalsky, M. L., and Kimelman, D. (1993). *v-erbA* and citral reduce the teratogenic effects of all-trans retinoic acid and retinol, respectively, in *Xenopus* embryogenesis. *Development* 119, 785-798.
- Shuler, C. F., Guo, Y., Majumder, A., and Luo, R. Y. (1991). Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* 35, 463-472.
- Smiley, G. R. (1970). Fine structure of mouse embryonic palatal epithelium prior to and after midline fusion. *Arch. Oral Biol.* 15, 287-296.
- Smiley, G. R., and Dixon, A. D. (1968). Fine structure of midline epithelium in the developing palate of the mouse. *Anat. Rec.* 161, 293-310.
- Sulik, K. K., Cook, C. S., and Webster, W. S. (1988). Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development* 103 Suppl, 213-31.
- Sweeney, L. R., and Shapiro, B. L. (1970). Histogenesis of Swiss white mouse secondary palate from nine and one-half days to fifteen and one-half days in utero. I. Epithelial-mesenchymal relationships—light and electron microscopy. *J. Morphol.* 130, 435-449.
- Taketo, T., and Koide, S. S. (1981). In vitro development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* 84, 61-66.
- Tanaka, M., Tamura, K., and Ide, H. (1996). Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesis, modifies chick limb development. *Dev. Biol.* 175, 239-247.
- Taniguchi, K., Sato, N., and Uchiyama, Y. (1995). Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion. *Arch. Histol. Cytol.* 58, 191-203.
- Wilkinson, D. G., and Nieto, M. A. (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* 225, 361-373.

Received for publication February 2, 2002

Revised February 4, 2002

Accepted February 4, 2002

Published online March 19, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Total word count, excluding references: 6955

**Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina
degradation during palatogenesis**

Rodrigo Cuervo¹ and Luis Covarrubias^{1,*}

¹Departament of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210,
México

Running title: PCD during palate shelf fusion

Keywords: morphogenesis, apoptosis, cell migration

***To whom correspondence should be addressed:**

Dr. Luis Covarrubias

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

Instituto de Biotecnología/ UNAM

AP 510-3

Cuernavaca, Mor. 62250, MEXICO

TEL: (52-5) 622-7636/ 7631; FAX: (52-73) 17-2388; EMAIL: covs@ibt.unam.mx

SUMMARY

A pair of shelves fuses to form the secondary palate, a process that requires the adhesion of the medial edge epithelial tissue (MEE) of each shelf and the degeneration of the resulting medial epithelial seam (MES). It has been reported that epithelial-mesenchymal transformation (EMT) occurs during shelf fusion and is considered a fundamental process for MES degeneration. On the other hand, we recently found that cell death is a necessary process for shelf fusion (Cuervo et al., 2002). These latter data uncover the relevance of cell death for MES degeneration; however, they do not discard the participation of other processes. In the present work, we focus in the evaluation of those processes that could contribute to palate shelf fusion. We tested EMT by traditional labeling of MEE cells with a dye or by infection with an adenovirus carrying the *LacZ* gene, and by fusing a wild-type shelf with one from mouse embryos expressing ubiquitously the EGFP protein. Fate of MEE labeled cells was followed by culturing whole palates, or by a novel slice culture system that allows individual cells to be followed during the fusion process. Very few labeled cells were found in the mesenchyme compartment, and almost all were undergoing cell death. Inhibition of metalloproteinases prevented basal lamina degradation without affecting MES degeneration and MEE cell death. Remarkably, independently of shelf fusion, activation of cell death promoted the degradation of the basal lamina underlying the MEE ("cataptosis"). Finally, by specific labeling of periderm cells (i.e., the superficial cells that cover the basal epithelium), we observed that

epithelial triangles at oral and nasal ends of the epithelial seam do not appear to result from MEE cell migration but rather from periderm cell migration. Inhibition of migration or removal of these cells suggests that they have a transient function controlling MEE cell adhesion and survival, and ultimately died within the epithelial triangles. We conclude that MES degeneration occurs almost uniquely by cell death, and for the first time we show that this process can activate basal lamina degradation during a developmental process.

INTRODUCTION

The secondary palate forms by fusion of the pair of shelves originated from the maxillary process (reviewed in Ferguson, 1988). Initially, shelves adhere at the medial edge epithelia (MEE), the leading border region of the growing shelves, which gives rise to the medial epithelial seam (MES). The MES is initially constituted by a multilayer epithelia that later becomes a single epithelial layer. MES degeneration continues by fragmentation of the adhered region forming epithelial islands (called epithelial pearls) along the MES. These islands degenerate resulting in the fused palate shelves.

The MEE is composed of a basal columnar cell layer covered by round flat cells that constitute the periderm. During shelf growth, MEE is not distinguished histologically from oral or nasal epithelium, though they become distinct tissues after fusion. At the molecular level, MEE region appears defined by the expression of several genes such as *Tgfb3* (Fitzpatrick et al., 1990), *Egfr* (Brunet et al., 1993), *Tgfa* (Citterio and Gaillard, 1994), and *c-Fos* (Yano et al., 1996). It is thought that periderm cells shed before fusion to allow intimate contact between shelves (Fitchett and Hay, 1989).

Epithelial-mesenchymal transformation (EMT) is considered relevant for MES degeneration (Fitchett and Hay, 1989; Griffith and Hay, 1992; Shuler et al., 1991). EMT involves the transdifferentiation of packed epithelial cells to more loose mesenchymal cells, a process that involves basal lamina degradation, and dramatic changes in cytoskeleton, and cell-cell and cell-extracellular matrix interactions (Boyer et al., 1996).

The migratory capacity of mesenchymal cells allows them to move far from their origin site. Once EMT process occurs, transformed cells can derive to specific cell types such as in the case of neural crest (Duband et al., 1995), or contribute to form structures such as in the case of the endocardial cells that give rise to heart valves (Markwald et al., 1975).

In the case of secondary palate, transformed mesenchymal cells would not have a specific function. Several reports have presented evidences suggesting that EMT actually occurs during palate shelf fusion (Fitchett and Hay, 1989; Griffith and Hay, 1992; Martinez-Alvarez et al., 2000; Shuler et al., 1991; Shuler et al., 1992). However, the few cells detected to be transformed and the lack of a quantitative analysis, obligate to consider additional mechanisms for MES degeneration. Migration of cells constituting the MEE toward the nasal and oral regions has also been proposed to participate in shelf fusion (Carette and Ferguson, 1992). Cell death is another way to eliminate the MES, and although it has been known to occur since many years ago (DeAngelis and Nalbandian, 1968; Farbman, 1968; Smiley and Dixon, 1968), its relevance in MES degeneration is only until recently been demonstrated (Cuervo et al., 2002; Martinez-Alvarez et al., 2000; Mori et al., 1994; Taniguchi et al., 1995). MES degeneration could also result from a combination of cellular mechanisms such as those described above.

The aim of the present work was to evaluate the relevance of EMT, epithelial cell migration, and cell death in palate shelf fusion. Our results support the fundamental requirement of cell death for MES degeneration, without a significant contribution of

EMT or basal MEE cell migration. However, we show data indicating that the ordered migration of periderm cells out from the basal MEE is necessary for normal fusion.

Furthermore, in contrast to the activation of cell death by basal lamina degradation (i.e., anoikis), we identified the activation of basal lamina degradation as a consequence of MEE cell death ("cataptosis").

MATERIALS AND METHODS

Animal handling and palate dissection

CD-1 and EGFP (Hadjantonakis et al., 1998) mouse strains were used in this study.

Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation between 12.5 and 18.5 d.p.c. (vaginal plug was found at 0.5 days post coitus-- d.p.c.). Palate dissection was done as previously described (Cuervo et al., 2002).

Organ culture

Whole palates were cultured on filters floating on serum-free medium as previously described (Cuervo et al., 2002). We also developed a palate slice culture system based in the report by Knight et al. (Knight et al., 1999). Initially shelves of whole palates were put in contact for 3 h and then embedded in 5% low-melting point agarose (SeaPlaque GTG, FMC Bioproducts, Rockland, ME.) in McCoy medium (Microlab, México). One-hundred-fifty μm slices were produced with a vibratome (Leica VT1000S, Wetzlar,

Germany) and collected in cold PBS (5.4 mM potassium chloride, 138 mM sodium chloride, 22 mM glucose, 2 mM sodium-potassium phosphate, pH 7.2). Slices were set at the bottom of a 35 mm petri dish and covered with a layer of 1% low-melting point agarose and 2 ml of McCoy medium. At the end of culture, live slices were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, and processed for TUNEL in whole mount (Conlon et al., 1995). Cytochalasin B (6 μ M; Sigma, St. Louis, MO), cycloheximide (20 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO), retinoic acid (20 μ M; Sigma, St. Louis, MO), staurosporin (20 μ M Sigma, St. Louis, MO) and z-VAD (100 μ M z-VAD; Biomol, Plymouth, PA) were added directly to the culture medium.

Cell labeling

Complete MEE labeling was obtained by submerging whole palates in a 10 μ M solution of 5-6-carboxy 2-7-dichlorofluorescein diacetate succinimidyl ester (CCFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS. Samples were incubated at 37 °C for 15 minutes and washed twice with PBS before culture. Selective labeling of periderm cells with the same dye was attained by incubation at room temperature for 30 seconds. Transfections with an adenovirus carrying the *LacZ* reporter gene (*Ad-LacZ*) were carried out at 37 °C for 1.5 h as previously described (Cuervo et al., 2002). Chimeric palates were formed using one shelf from CD1 and the other from EGFP embryos. Shelf fusion in this condition took

about 36 h. In all cases described above palates were cultured for different time periods, fixed with 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin or agarose, and sliced for histology, immunohistochemistry or cell death detection.

Periderm cell removal

To remove superficial cells, palates were incubated in 0.25% trypsin solution in Versene (Invitrogen, Grand Island, NY) at 4 °C for 5 minutes. After incubation, palate medial edges were constantly washed with the same solution up to thin layers came off. Samples were washed with PBS and then incubated in DMEM containing 10% serum at room temperature for 10 minutes. Shelves were separated from the rest of tissue and cultured on filters. Same treatment was given to control palates except that medial edge washing with 0.25% trypsin was not performed.

Histology, immunofluorescence and TUNEL procedures

Cell death detection by the TUNEL method was performed using commercial kits (Roche, Mannheim, Germany) or a procedure for whole mount as reported by Conlon et al. (Conlon et al., 1995). Immunohistochemistry for laminin (Rabbit anti-laminin, Sigma, St. Louis, MO) was performed according to standard protocols. Except for the Ad-*LacZ* labeling, labeled cells were detected by epifluorescence (Eclipse TE 300, Nikon, Japan). Double detections combined EGFP or fluorescein (in situ cell death detection kit,

fluorescein, Roche) with rhodamin (in situ cell death detection kit, rhodamin, Roche) or Alexa-fluor 594 (goat anti-rabbit; Molecular Probes, Eugene, OR). Photographs were taken with a digital camera (CoolSnap, Roper Scientific Inc., Trenton, NJ).

RESULTS

Fate of MEE cells after palate shelf fusion

To study the shelf fusion process that is required for secondary palate formation, we have cultured shelves integrated to the nasal portion of the head (Cuervo et al., 2002). Under this condition, complete shelf fusion occurs within 24 hours (Fig. 1A, T/L), in contrast with periods of time of around 48 hours when isolated shelves are used. Any cellular process participating in fusion must occur within the 24 hours time window. A typical protocol to determine the fate of MEE cells has been through the specific labeling of these cells with dyes that can not diffuse through the basal lamina. We used a dye (CCFSE) that once inside a cell is modified and can not diffuse to other cells. After MEE staining, we forced contact between shelves and followed the fate of the stained cells at different times during the fusion process. Previously, we reported that some differences in cell death activation within the MEE are observed. Cell death in anterior MEE region is activated shortly after shelf contact, whereas in the posterior region, cell death in the MEE is observed previous to shelf contact. Therefore, we considered possible that different mechanism could control fusion in anterior and posterior MEE regions; thus, the

fate of MEE cells was studied in both regions. After 3 hours of contact, adhesion between shelves was very strong and there were no signs of MEE cell death, migration, or EMT (Fig. 1A, 3 hours/CCFSE). Three hours later, the MES started to disrupt, accompanied by many dying cells (Fig. 1A, 6 hours/CCFSE); epithelial triangles were clearly identified at this time. Stained cells were not detected outside the MES. Twelve hours after contact, many dying cells and remnants of basal lamina were still present within the MES (Fig. 1A, 12 hours/CCFSE), but by 24 hours, all dead cells were removed and basal lamina was completely degraded (Fig. 1A, 24 hours/CCFSE). Very few stained cells were detected outside the MES after this period of time, and among those, the majority was detected as dying cells (Table 1) probably inside phagocytes.

An alternative strategy to follow the fate of developing cells is by using viral vectors that carry a reporter gene. A recent report shows that labeling of cells with a retroviral vector carrying the *LacZ* gene allows the detection of many labeled cells within the mesenchyme compartment after fusion (Martinez-Alvarez et al., 2000). However, infection with a retroviral vector requires cell proliferation induction by serum. Since serum could cause artifacts during fusion, we preferred to use an adenovirus, also carrying the *LacZ* gene, which does not require serum for infection. Cell labeling with the adenovirus used here was more extensive than that reported using retroviruses. As with the dye, most of the MEE infected cells were dying and none detected outside the MES (Fig. 1A, LacZ; Table 1).

We also followed the fate of MEE cells by forming chimeric palates between a wild-type shelf and a shelf from a mouse embryo that express constitutively the GFP protein (WT \leftrightarrow EGFP). In this situation, the cells that suffer EMT would only be detected if they cross the MES. Of course, in principle, mesenchymal cells present previous to shelf contact could also migrate between shelves during or after fusion. No cells were detected to cross the MES (Fig. 1A, WT \leftrightarrow EGFP), supporting the low frequency of EMT occurrence and also the limited migratory ability of mesenchymal cells from one shelf to another. Nonetheless, the behavior of MEE and mesenchymal cells, we observed that nasal and oral epithelial cells could migrate between shelves (Fig. 1B). From these experiments, it was also interesting to observe that as the double adhered epithelial layer turned into a single epithelial layer, intercalation of epithelial cells from both shelves (i.e., EGFP-positive and EGFP-negative cells) became obvious (Fig. 1A, 6-12 hours/WT \leftrightarrow EGFP).

Fate of MEE cells in a palate slice culture system

In order to follow continuously the fate of MEE cells during MES degeneration, we established a slice culture system in which cell migration can be studied in more detail. MEE cells were labeled with a CCFSE dye and shelves put in contact as described above. Three hours later, 150 μ m slices were produced; at this time, MES appeared intact without signs of degeneration (Fig. 2, 3 hours). Next, slices were cultured as described in

Material and Methods. Six hours after contact (i.e., three hours in culture), MES thinned and 6 hours later MES looked fragmented (Fig. 2, 6 hours and 12 hours, respectively). At this latter time, no labeled cells were found outside the MES. Twenty-four hours after contact, the MES could not be seen by phase-contrast microscopy, but fluorescent cells were still detected within the fusion region (Fig. 2, 24 hours). The great majority of remaining cells at this time was dying cells (Fig. 2, TUNEL). Therefore, in this culture system, two MEE tissues can fuse without EMT contribution.

Relationship between cell death and basal lamina degradation

We considered possible that MES degeneration involves both cell death and EMT. Under normal conditions, cell death could dominate on EMT to cause MES degeneration.

However, we might not be detecting the actual number of MEE transformed cells because they could not survive after differentiation. Hence, we blocked cell death with an inhibitor of caspases and searched for labeled cells in the mesenchyme compartment. No labeled cells in the mesenchyme compartment were found in treated palates (Fig. 1C; Table 1). These data, firstly, indicate that we were not missing MEE transformed cells because they died soon after differentiation and, secondly, they suggest that EMT can not compensate for MES degeneration in the absence of cell death.

In the previous experiments we also followed, in addition to the labeled cells, the integrity of basal lamina. To allow EMT, basal lamina needs to degrade by a mechanism

involving metalloproteinases (MMPs). Actually it has been proposed that basal lamina degradation is an early EMT event (Lochter et al., 1997; Song et al., 2000). In agreement with the low occurrence of EMT, we did not detect basal lamina degradation when cell death was blocked (Fig. 3, z-VAD). Interestingly, MMP inhibition prevented basal lamina degradation and blocked fusion without affecting the occurrence of cell death (Fig. 3, MMI). Therefore, it appears that cell death is not induced by basal lamina degradation that should accompany EMT, but rather basal lamina degradation appears to be a secondary event activated by the dying cells ("cataptosis"; see Discussion).

In order to confirm the previous conclusion, we treated untouched palate shelves with RA, a very strong MEE cell death inducer. Under these conditions, RA-induced cell death was also accompanied by basal lamina degradation (Fig. 4, mee/RA). Basal lamina degradation was not an independent event regulated by RA, since cell death inhibition in this condition also inhibited basal lamina degradation (Fig. 4, mee/z-VAD/RA). Interestingly, cataptosis was restricted to the MEE area, since cell death in rugae epithelium (natural or RA-induced) had no effect in the integrity of basal lamina (Fig. 4, control and rugae/RA). Finally, a general activation of cell death by staurosporin also induced basal lamina degradation specifically in the MEE area and preferentially under apoptotic cells, whereas basal lamina remained intact in the surrounding tissue (Fig. 4/staurosporine). Therefore, these data suggest that, as a consequence of cell death activation in the MES, the MMPs responsible for basal lamina degradation activate.

Migration of the periderm cells associated to the MEE

As previously shown, most MEE cells die during fusion. However, another component associated to the MEE is the periderm that covers most of the shelf surface that first get in contact. In order to label preferentially periderm cells, we stained palate shelves for a very short period of time (i.e., 30 seconds). The selectivity of this staining procedure can be clearly seen in slices of these preparations (see for instance Fig. 5, CCFSE/2 hr). To determine the fate of periderm cells, they were followed during the fusion process. In contrast with MEE cells that appeared to die *in situ*, periderm cells migrated to the oral and nasal ends of the MES, contributing to the formation of the epithelial triangles, where most of them died (Fig. 5, 2-8 hr).

To get insights on the role of periderm cells in fusion, we inhibited cell migration with cytochalasin B, which blocks actin polymerization. As expected, periderm cells did not migrate, epithelial triangles did not form, and incomplete adhesion occurred (Fig. 6A). Interestingly, cell death in both basal MEE and the overlying periderm was not triggered in the presence of cytochalasin B (Fig. 6B). Actin polymerization-depolymerization dynamics does not appear to interfere generally with the cell death execution process, since the drug used did not modify cell death in rugae (Fig. 6C). Cyclohexamide also inhibited migration and the epithelial triangles did not form however, in this case, cell death in rugae was affected too (data not shown). These data

together suggest that migration of periderm cells out of the MEE area is essential to initiate the fusion process.

In the previous experiments, cell death might not be activated in the MEE because periderm cells represented a barrier for intimate contact between shelves, a possible requirement for cell death activation and fusion (Cuervo et al., 2002). To test that possibility, we removed this cell layer by controlled trypsin treatment (see Material and Methods). Palate shelves lacking periderm cells adhered, activated cell death and fused. However, epithelial triangles did not form, resulting in a thinner secondary palate (Fig. 7A). Interestingly, viability of MEE cells in isolated shelves markedly decreased when periderm cells were removed (Fig. 7B). In conclusion, periderm cells do not appear to be necessary for the fusion process itself, but they need to migrate out of the MES to allow contact and cell death activation.

DISCUSSION

We determined that the primary and major fate of MEE cells of secondary palate shelves is death, a requirement for MES degeneration and fusion. We could not find evidences of EMT, and migration could only be detected for the periderm cells that overly the MEE. Furthermore, we found, for the first time, that basal lamina degrades as a consequence of cell death, emphasizing the relevance of this latter process in shelf fusion.

Several years ago, Fitchett and Hay (1989) presented the first evidences suggesting that EMT causes MES degradation. Subsequently, other reports presented additional evidences supporting EMT (Kaartinen et al., 1997; Martinez-Alvarez et al., 2000; Shuler et al., 1991; Shuler et al., 1992). Currently, this idea prevails, in some cases neglecting the participation of cell death (Young et al., 2000). In some of our experiments we used a similar experimental strategy as in those previous reports but using an improved palate culture system in which fusion occurs within a similar time window as in vivo. Under these conditions, we were unable to detect any obvious participation of EMT. The few-labeled cells found around the MES at the end of culture were undergoing cell death (Table 1). Furthermore, when cell death was prevented, EMT was still not detected indicating that EMT is not able to compensate for the inability to eliminate MEE by cell death. Since it is possible that individual transformed cells escaped to our observations, we followed each MEE cell within a 150 μm MES region using a novel slice culture system, finding no cells suffering EMT and many MEE cells dying (Fig. 2).

Why the discrepancy of our data with those previous reports? It is important to mention that with some exceptions (Sun et al., 1998), very few MEE cells have been reported to undergo EMT and, generally, a quantitative analysis is lacking. Moreover, in no case reported it has been determined whether the assumed transdifferentiated cells are instead dying cells or phagocytes containing dying cells. These drawbacks make difficult to estimate the contribution of EMT to MES degeneration from those reports. It is

possible that palate shelf fusion does not occur equally along the rostro-caudal axes; therefore, the region studied might produce different results. We considered this possibility and, thus, studied MES degeneration along its complete length. Another explanation for the different outcome is the culture system. Usually dissected shelves are put together and then cultured in the presence of serum to allow fusion. We have found that our culture system allows a more precise touch between shelves and an efficient fusion in the absence of serum. Shuler et al. (1992) also labeled MEE in vivo with Dil and show that clumps of labeled cells remain around the fusion line. It is possible that artifactual staining occurred in those experiments (Dil can easily precipitate), since individual cells can not be visualized and Dil membrane incorporation would not assure the transfer of the dye to other more internal cells. Despite these apparently conflictive results, we propose that cell death is the major contributor to MES degeneration, even considering a low occurrence of EMT.

MEE cell migration has also been proposed as a mechanism for MES degeneration (Carette and Ferguson, 1992). However, in those studies was not considered the differential migration between MEE and the periderm cells that overly them. In our study, we stained preferentially periderm cells and demonstrated that soon after contact they migrate toward the oral and nasal cavities and form the epithelial triangles (Fig. 5). In support to this observation, when migration is inhibited or in the absence of periderm cells, the epithelial triangles do not form (Fig. 6). Shelf fusion could occur in the absence

of periderm cells, but the outcome is a thinner palate (Fig. 7). It is considered that periderm cells shed before contact (Fitchett and Hay, 1989); however, as our data show, epithelial triangles result from periderm cell migration, a process that appears to be relevant for proper fusion. Furthermore, a relevant finding of the present work was to observe a survival activity by periderm cells on basal MEE cells (Fig. 7), such that periderm cell migration appears to be required for cell death activation of both periderm and basal MEE cells. Periderm cells are very likely the cells that make filopodia and produce the proteoglycans required for shelf adhesion (Gato et al., 2002; Taya et al., 1999). We propose that periderm cell migration is relevant for the efficient shelf fusion regulating adhesion and cell death activation.

Anoikis is a term given to the cell death process induced by the lack of contact with the extracellular matrix. Basal lamina has been considered to be an essential survival factor for epithelial cells *in vitro* and *in vivo* (Coucovanis and Martin, 1995; Ruoslahti and Reed, 1994). For instance, it has been shown that during mammary gland involution or Müller duct regression, breaking the underlying extracellular matrix induces epithelial cell death (Pullan and et.al., 1996; Roberts et al., 2002). Therefore, we considered possible that the trigger for MEE cell death activation was basal lamina degradation. As shown here, blocking basal lamina degradation by inhibiting MMP activity (see below) had no effect on cell death (Fig. 3). These data contrast with two recent reports (Blavier et al., 2001; Brown et al., 2002) showing partial or no MEE degeneration in the presence

of the same MMP inhibitor used here. However, we have had very high reproducibility showing in all experiments, including those at the low inhibitor dose (10 μ M), intact basal lamina. Authors of both reports do not show the integrity of basal lamina in their experiments, therefore, their results can be interpreted as incomplete MEE degeneration. Our observations in the presence of the MMP inhibitor do not imply that basal lamina has no survival activity on MEE cells, but it does establish that MEE cell death is not triggered by basal lamina degradation. On the contrary, we found that cell death activates basal lamina degradation (see Fig. 4). To our knowledge this is an unprecedented conclusion which gives a new function to the cell death process. We propose the term "cataptosis" (greek word meaning downfall) to describe this phenomenon. The activation of basal lamina degradation is restricted to the dying MEE cells suggesting that specific factors give them this property (see below). This conclusion is also contrary to the participation of EMT, since inhibition of basal lamina degradation can block EMT (Song et al., 2000), and MMPs can directly induce EMT (Lochter et al., 1997).

Collagen IV and laminin, the most abundant components of basal lamina, must be the major MMPs substrates during basal lamina degradation. MMPs are found extracellularly and also bound to the plasma membrane (MT-MMPs) (Birkedal-Hansen, 1995). The MMP activity could be regulated at different levels. MMP gene expression is a characteristic during tissue remodeling but posttranslational regulation is critical for enzymatic activity. With the exception of MT-MMPs, MMPs are synthesized as inactive

proenzymes that need to be processed by other enzymes, such as plasmin or other MMPs, to become active (Nagase, 1997). Furthermore, MMP activity can be negatively regulated by direct binding of proteins such as members of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) family (Gomez et al., 1997). Among the several MMPs and their inhibitors described up to date, *MT1-Mmp*, *Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Timp1* and *Timp2* are expressed in the developing palate (Blavier et al., 2001; Morris-Wiman et al., 2000). *MT1-Mmp*, *Mmp13*, and *Timp2* are specifically expressed in the MEE at the time of fusion (Blavier et al., 2001). These genes could be the ones giving to the MEE the distinct ability to activate cataptosis. MMP2 and MMP13 can cut collagen IV (Knäuper et al., 1997), suggesting a role of these enzymes in basal lamina degradation, though their role in vivo has not been demonstrated. TIMP2 could prevent extracellular matrix degradation, however it has been shown it is also relevant for the efficient MMP2 activation in vivo (Wang et al., 2000).

MT1-MMP could be the initiator of a MMP cascade involved in cataptosis. Recently, it was reported that MT1-MMP and MMP2 translocate from the cytoplasm to the plasma membrane in endothelial cells upon an apoptotic stimulus (Levkau et al., 2002); MMP2 plasma membrane anchorage appears to be via integrin interaction. It has also been shown that MT1-MMP can interact with TIMP2 and together activate MMP2 (Strongin et al., 1995). Therefore, basal lamina degradation could initiate by translocation of MT1-MMP to the basal surface of MEE cells, and MT1-MMP alone or in combination

with TIMP2 activate another MMP. Up to now, MMP13 is the best MT1-MMP candidate substrate synthesized by the MEE that could initiate basal lamina degradation (Knäuper et al., 2002). Alternatively, MMP13 secretion, as shown for MMP2 (Levkau et al., 2002), or TIMP2 degradation could be activated by the apoptotic cell. According to our data, MMPs synthesized by the mesenchyme, such MMP2, may contribute to basal lamina degradation directly or by enhancing the activation of MMP13 (Knäuper et al., 1996), but as a secondary event after the initial MMP activation by the apoptotic cell. Since null mutants for *Mt1-Mmp* do not have an obvious palate phenotype (Holmbeck et al., 1999), it is likely that redundant mechanisms are activated during MES catapoptosis.

In summary, we can describe the secondary palate shelf fusion process as follows (Fig. 8). Initially shelves approach each other until the first contact is reached probably between filopodia from periderm cells and with the help of proteoglycans. More intimate MEE contact progresses through a process that is accompanied by periderm cell migration to oral and nasal ends. Progressive adhesion controlled by periderm cell migration appears to be necessary, on the contrary, a thinner palate would form. Periderm cells in the epithelial triangles could also be important for sealing the ends of the MES. Chimeric palates CD1 \leftrightarrow EGFP clearly reveals the intercalation between MEE cells from each shelf (Fig. 1) as recently reported (Tudela et al., 2002). This process, which results in a single epithelial sheath, must represent a classical convergent extension phenomenon (Wallingford et al., 2002), and cause MES growth in both anteroposterior and oronasal

axes. Strong adhesion between shelves probably originates from this MEE cell intercalation, and we propose that it is up to this moment that cell death is activated. Finally, dying cells actively promote the activation of MMPs such MT1-MMP and MMP13 that cause basal lamina degradation. Basal lamina initially breaks down in fragments generating the epithelial pearls that later degenerate to produce the fused palate.

Two key molecules have been identified relevant in the fusion process. Retinoic acid appears to be essential in the control of cell death (Cuervo et al., 2002), and consequently also in basal lamina degradation. TGF β 3, on the other hand, has been proposed to be a relevant growth factor controlling EMT (Kaartinen et al., 1997; Sun et al., 1998). In the heart, very good evidences exist supporting a role of TGF β 3 in EMT (Ramsdell and Markwald, 1997). *Tg β 3* knock-out mice display cleft palate, however the specific TGF β 3 functions that cause this phenotype are still to be defined. *Tg β 3*^{-/-} shelves show the absence of the characteristic MEE associated filopodia observed previous to shelf contact, and also a significant decrease in proteoglycans on the MEE surface (Gato et al., 2002; Taya et al., 1999). These data suggest that TGF β 3 is critical at the initial contact and adhesion between shelves. TGF β 3 could also play a role in the control of periderm cell migration. It is interesting to note that palates treated with cytochalasin B are a phenocopy of those from *Tg β 3*^{-/-} embryos (Fig. 6). Palates in both conditions show poor shelf adhesion, reduced cell death and lack of epithelial triangles (Martinez-Alvarez

et al., 2000; Taya et al., 1999). Inhibition of actin polymerization would impede cell motility resulting in no filopodia and migration. In our experiments, it is unlikely that defective contact and adhesion, due to lack of filopodia, is causing the unfused palate phenotype, since shelves were forced to contact. Therefore, TGF β 3 might have a migration-promoting activity on periderm cells, as it appears to occur on endocardial cells transformed to mesenchyme (Ramsdell and Markwald, 1997). Despite a proapoptotic activity has been determined for TGF β 3 (Nguyen and Pollard, 2000; Opperman et al., 2000; Dunker et al., 2002), reduced MEE cell death in palates from *Tgfb3*^{-/-} mice (Martinez-Alvarez et al., 2000) could result from altered adhesion and/or periderm cell migration. In addition to the previous possible TGF β 3 roles, this factor could influence the MMP activity initiated by cell death, since it is known that TGF β 3 regulates *Mmp13* expression in the palate (Blavier et al., 2001). However, the reverse regulation could also occur. MMP13 could process the TGF β 3 precursor and in this way regulate its activity (Sternlicht and Werb, 2001; Yu and Stamenkovic, 2000). Further experiments are needed to determine the significance of this positive regulatory loop in basal lamina degradation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Elizabeth Mata, Sergio González and Barbara Mondragón for assistance in mice care and reproduction; Dr. L. McCrae (British Biotech, Oxford, UK)

and Andras Nagy (Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canada) for the gift of BB-3103 inhibitor and the EGFP mouse strain, respectively; and Dr. Horacio Merchant and Rosana Sánchez for continuous valuable support. This work was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grants 31730-N and 30717-M, and doctoral fellowships to R.C.) and the Dirección General de Apoyo al Personal Académico (IN210600).

REFERENCES

- Birkedal-Hansen, H.** (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Op. Cell. Biol* **7**, 728-735.
- Blavier, L., Lazaryev, A., Groffen, J., Heisterkamp, N., DeClerck, Y. A. and Kaartinen, V.** (2001). TGF-beta 3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 1457-1466.
- Boyer, B., Valles, A. M. and Thiery, J. P.** (1996). Model systems of epithelium-mesenchyme transitions. *Acta Anatomica* **156**, 227-239.
- Brown, N. L., Yarram, S. J., Mansell, J. P. and Sandy, J. R.** (2002). Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J. Dent. Res* **81**, 826-830.
- Brunet, C. L., Sharpe, P. M. and Ferguson, M. W.** (1993). The distribution of epidermal growth factor binding sites in the developing mouse palate. *International Journal of Developmental Biology* **37**, 451-8.

Carette, M. J. and Ferguson, M. W. (1992). The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis by Dil labelling and confocal microscopy.

Development **114**, 379-88.

Citterio, H. L. and Gaillard, D. A. (1994). Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha), epidermal growth factor receptor (EGF-R) and cell proliferation during human palatogenesis: an immunohistochemical study. *International Journal of*

Developmental Biology **38**, 499-505.

Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J. (1995). Notch 1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545.

Coucouvanis, E. and Martin, G. R. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* **83**, 279-87.

Cuervo, R., Valencia, C., Chandraratna, R. A. and Covarrubias, L. (2002).

Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Developmental Biology* **245**, 145-56.

DeAngelis, V. and Nalbandian, J. (1968). Ultrastructure of mouse and rat palatal processes prior to and during secondary palate formation. *Archives of Oral Biology* **13**,

601-8.

Duband, J. L., Monier, F., Delannet, M. and Newgreen, D. (1995). Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat (Basel)* **154**, 63-78.

- Dunker, N., Schmitt, K. and Kriegstein, K. (2002).** TGF-beta is required for programmed cell death in interdigital webs of the developing mouse limb. *Mechanisms of Development* **113**, 111-120.
- Farbman, A. I. (1968).** Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Developmental Biology* **18**, 93-116.
- Ferguson, M. W. (1988).** Palate development. *Development* **103 Suppl**, 41-60.
- Fitchett, J. E. and Hay, E. D. (1989).** Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Developmental Biology* **131**, 455-74.
- Fitzpatrick, D. R., Denhez, F., Kondaiah, P. and Akhurst, R. J. (1990).** Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* **109**, 585-95.
- Gato, A., Martinez, M. L., Tudela, C., Alonso, I., Moro, J. A., Formoso, M. A., Ferguson, M. W. and Martinez-Alvarez, C. (2002).** TGF-beta(3)-induced chondroitin sulphate proteoglycan mediates palatal shelf adhesion. *Developmental Biology* **250**, 393-405.
- Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U. P. (1997).** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol* **74**, 111-122.
- Griffith, C. M. and Hay, E. D. (1992).** Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* **116**, 1087-99.

Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Nagy, A. (1998).

Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mechanisms of Development* **76**, 79-90.

Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A.,

Mankani, M., Robey, P. G., Poole, A. R., Pidoux, I. et al. (1999). MT1-MMP-deficient

mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**.

Kaartinen, V., Cui, X. M., Heisterkamp, N., Groffen, J. and Shuler, C. F. (1997).

Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Developmental Dynamics* **209**, 255-60.

Knäuper, V., Bailey, L., Worley, J. R., Soloway, P., Patterson, M. L. and Murphy,

G. (2002). Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Letters* **532**, 127-130.

Knäuper, V., Cowell, S., Smith, B., Lopez-Otin, C., O'Shea, M., Morris, H., Zardy,

L. and Murphy, G. (1997). The role of C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J. Biol. Chem* **272**, 7608-7616.

Knäuper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S. J., Stanton, H.,

Hembry, R. M. and Murphy, G. (1996). Cellular mechanisms for human

procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J. Biol. Chem* **271**, 17124-17131.

Knight, B., Laukaitis, C., Akhtar, N., Hotchin, N. A., Edlund, M. and Horwitz, A. R. (1999). Visualizing muscle cell migration in situ. *Current Biology* **10**, 576-585.

Levkau, B., Kenagy, R. D., Karsan, A., Weitkamp, B., Clowes, A. W., Ross, R. and Raines, E. W. (2002). Activation of metalloproteinases and their association with integrins: an auxiliary apoptotic pathway in human endothelial cells. *Cell Death and Differentiation* **9**, 1360-1367.

Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z. and Bissell, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J.Cell.Biol* **139**, 1861-1872.

Markwald, R. R., Fitzharris, T. P. and Smith, W. N. (1975). Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Developmental Biology* **42**, 160-80.

Martinez-Alvarez, C., Tudela, C., Perez-Miguelsanz, J., O'Kane, S., Puerta, J. and Ferguson, M. W. (2000). Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Developmental Biology* **220**, 343-57.

- Mori, C., Nakamura, N., Okamoto, Y., Osawa, M. and Shiota, K. (1994).** Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. *Anatomy and Embryology* **190**, 21-8.
- Morris-Wiman, J., Burch, H. and Basco, E. (2000).** Temporospacial distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anatomy and Embryology* **202**, 129-141.
- Nagase, H. (1997).** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem* **378**, 151-160.
- Nguyen, A. V. and Pollard, J. W. (2000).** Transforming growth factor β 3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development* **127**, 3107-3118.
- Opperman, L. A., Adab, K. and Gakunga, P. T. (2000).** Transforming factor-beta 2 and beta 3 regulate fetal rat cranial suture morphogenesis by regulating rates of cell proliferation and apoptosis. *Developmental Dynamics* **219**, 237-247.
- Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J.A., Dive, C., Streuli, C.H. (1996).** Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J. Cell. Sci* **109**, 631-642.
- Ramsdell, A. F. and Markwald, R. R. (1997).** Induction of endocardial cushion tissue in the avian heart is regulated, in part, by TGF-beta 3 mediated autocrine signaling. *Developmental Biology* **188**, 64-74.

Roberts, L. M., Visser, J. A. and Ingraham, H. A. (2002). Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development.

Development **126**, 1487-1496.

Ruoslahti, E. and Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis.

Cell **77**, 477-8.

Shuler, C. F., Guo, Y., Majumder, A. and Luo, R. Y. (1991). Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium in vitro. *International Journal of Developmental Biology* **35**, 463-72.

Shuler, C. F., Halpern, D. E., Guo, Y. and Sank, A. C. (1992). Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo.

Developmental Biology **154**, 318-30.

Smiley, G. R. and Dixon, A. D. (1968). Fine structure of midline epithelium in the developing palate of the mouse. *Anatomical Record* **161**, 293-310.

Song, W., Jackson, K. and McGuire, P. G. (2000). Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelia-mesenchyme

transformation of the endocardial cushions. *Developmental Biology* **227**, 606-617.

Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**, 463-516.

- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. and Goldberg, G. I.** (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem* **270**, 5331-5338.
- Sun, D., Vanderburg, C. R., Odierna, G. S. and Hay, E. D.** (1998). TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development* **125**, 95-105.
- Taniguchi, K., Sato, N. and Uchiyama, Y.** (1995). Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion. *Archives of Histology and Cytology* **58**, 191-203.
- Taya, Y., O'Kane, S. and Ferguson, M. W.** (1999). Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* **126**, 3869-79.
- Tudela, C., Formoso, M. A., Martinez, T., Perez, R., Aparicio, M., Maestro, C., Del-Rio, A., Martinez, E., Ferguson, M. and Martinez-Alvarez, C.** (2002). TGF-beta3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *The International Journal of Developmental Biology* **46**, 333-6.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. **2**, 695-706.

Wang, Z., Juttermann, R. and Soloway, P. D. (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J. Biol. Chem* **275**, 26411-26415.

Yano, H., Ohtsuru, A., Ito, M., Fuji, T. and Yamashita, S. (1996). Involvement of c-Fos proto-oncogene during palatal fusion and interdigital space formation in the rat. *Develop. Growth. Differ* **38**, 351-357.

Young, D. L., Schneider, R. A., Hu, D. and Helms, J. A. (2000). Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med* **11**, 304-317.

Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* **14**, 163-76.

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Analysis of MEE cell fate using different approaches. (A) Left lane (T/L) shows the cell death and basal lamina degradation patterns during palate shelf fusion in vitro (0-24 hr). Cell death detection by TUNEL (green) and laminin immunohistochemistry (red) were performed on the same slice. Laminin specific immunohistochemistry detected, in addition to basal lamina, blood vessels (V). Three hours after shelf contact, MES and basal lamina were unaltered. By 6 hr, concomitant cell death and basal lamina fragmentation were evident signs that MES degradation has begun. By 12 hr, MES degradation was very advanced showing many dying cells within the epithelial triangles (et) and few dying in the MES within the epithelial pearls (ep, arrowhead) as indicated by the surrounding basal lamina. No MEE cells (live or death) and laminin in the MES area were detected at the end of culture (24 hr). MEE cells of equivalent staged palates were labeled with CCFSE or Ad-*LacZ* (*LacZ*) before contact and their fate analyzed after 3, 6, 12 and 24 hr in anterior and posterior palatal regions. Epithelial pearls were evident at 6 and 12 hr after contact (arrowheads) using both labeling protocols. At the end of culture (24 hr) no labeled cells were detected in the MES. At no time was evident the presence of labeled cells in the mesenchyme compartment. Putting in contact one wild-type shelf with one from the EGFP mouse strain we produced chimeric palates (WT \leftrightarrow EGFP). At no time EGFP-positive cells were detected in the wild-type mesenchyme compartment of these chimeric palates. Interestingly, chimeric palates showed intercalation of MEE cells

(asterisks), at the time abundant apoptotic bodies were detected (arrows). After 24 hr of culture, fusion was complete and no mesenchymal cell migrated between halves. (B) Although no EGFP-positive cell was detected in the wild-type mesenchyme compartment of chimeric palates, EGFP positive cells were detected in the wild-type oral and nasal epithelia. (C) CCFSE-labeled cells are not detected in the mesenchyme compartment when cell death is inhibited by z-VAD. Scale bar 100 μ m.

Fig. 2. Time-course analysis of MES degeneration in an alive palate slice. MEE cells of 14.5 d.p.c. palate shelves were labeled with CCFSE (bright signal) before contact. Three hours after contact, 200 μ m slices were produced. Selected individual slices were cultured, and photographs of same slice taken at 3, 6, 12, and 24 hours. At the end of culture slices were processed for cell death detection (TUNEL positive, red). Note the accumulation of labeled cells in epithelial triangles at 3 and 6 hours of culture (blue arrows). At 6 and 12 hours of culture, the fragmented MES was obvious. At the end of culture (24 hours), the remaining labeled cells were detected as dying cells and none was clearly detected in the mesenchyme. These experiments were repeated more than three times with at least a triplicate for each condition. Scale bar, 100 μ m.

Fig. 3. Relationship between cell death and basal lamina degradation. Shelves of developing palates were put in contact and cultured in the presence of either a caspase inhibitor (z-VAD) or a metalloproteinase inhibitor (MMI). At the end of culture (24 hours), cell death (green) and laminin (red) were detected in the same palate slice by TUNEL and specific immunohistochemistry, respectively. After 12 hours in culture control palates show an advanced MEE cell death and basal lamina degradation. At the end of culture MEE and basal lamina completely disappeared. However, z-VAD treatment inhibited cell death and basal lamina remained intact. Application of 10 μ M BB-3103 (MMI) did not alter the apoptotic fate of MEE cells but, as expected, inhibited basal lamina degradation (arrowhead). These experiments were repeated more than three times with at least a triplicate for each condition. V, blood vessel. Scale bar, 50 μ m.

Fig. 4. Activation of basal lamina degradation by MEE cell death stimuli. Individual palate shelves were cultured without contact in the presence of retinoic acid (RA), a MEE cell death activator, or staurosporine, a broad-spectrum cell death activator. At the end of culture (24 hours), cell death (green) and laminin (red) were detected in the same palate slice by TUNEL and specific immunohistochemistry, respectively. Retinoic acid (RA) induced extensive cell death in the MEE and rugae of isolated shelves, but basal lamina degraded only in the MEE apoptotic region (arrows). Treatment with z-VAD blocked RA-induced cell death and basal lamina remained intact. Generalized induction of

epithelial cell death with staurosporine activated the degradation of the basal lamina underlying the dying MEE cells (arrowheads), whereas basal lamina underlying the MEE adjacent epithelium (left to arrow) was unaffected. These experiments were repeated more than three times with at least a triplicate for each condition. Scale bar, 100 μm .

Fig. 5. Analysis of periderm cell fate. Periderm cells were labeled as described in Materials and Methods and palates cultured for 8 hours. Samples were analyzed every 2 hours. At the onset of culture (2 hours), periderm cells were confined to the MES middle line between the two basal MEE; cell death was not detected at this time. As fusion proceeded (4, 6 and 8 hours), accumulation of labeled cells occurred at the apex of MES constituting a large proportion of epithelial triangle cells. Most labeled cells died within the epithelial triangles (yellow cells; see also Fig. 5). As noted here, basal MEE cells appeared to die in situ within the epithelial pearls (arrows; compare with Fig. 1). Arrowheads point autofluorescent erythrocytes. These experiments were repeated more than three times with at least a triplicate for each condition. Scale bar, 100 μm .

Fig. 6. Effect of inhibition of periderm cell migration on cell death and fusion. After periderm cell labeling (green), palate shelves were put in contact and cultured in the presence or absence of 6 μM cytochalasin B for 10 hours. To detect cell death, palates

were either stained in whole-mount with acridine orange (C; bright spots), or slices processed for the TUNEL technique (B; red). (A) When cytochalasin B was included in the medium, palate morphology showed the lack of epithelial triangles (et) and weak shelf adhesion. (B) Periderm cells of control palates died within epithelial triangles (yellow; see also Fig. 3), whereas those from cytochalasin B treated palates did not reach the oral and nasal closures and did not die (green cells; arrowheads). (C) Specific reduction in cell death was observed in the MES of cytochalasin B treated palates with a minimum effect in rugae (r). These experiments were repeated more than three times with at least a triplicate for each condition. Scale bars: white 500 μm , black 100 μm .

Fig. 7. Effect of periderm cell removal on basal MEE cell viability and shelf fusion.

Periderm cells were removed by washing the MEE region after controlled trypsin digestion performed on 14.5 d.p.c. palate shelves before contact. Control palates were also treated with trypsin but washing was not performed. (A) Isolated halves were cultured for 10 hours and cell death analyzed with the TUNEL technique. Observe that more dying MEE cells were detected in 'denuded' palates (i.e., without periderm cells). (B) Treated shelves were put in contact and fusion analyzed 24 hours later by standard hematoxylin-eosin staining (HE). Though MES degenerated, proper fusion between 'denuded' palate shelves did not occur. Observe the absence of epithelial triangles and marked reduction in MES thickness when compared with a control sample (see brackets).

These experiments were repeated more than three times with at least a triplicate for each condition. Scale bar 100 μm .

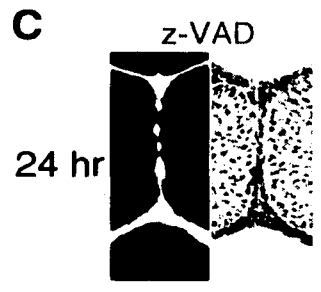
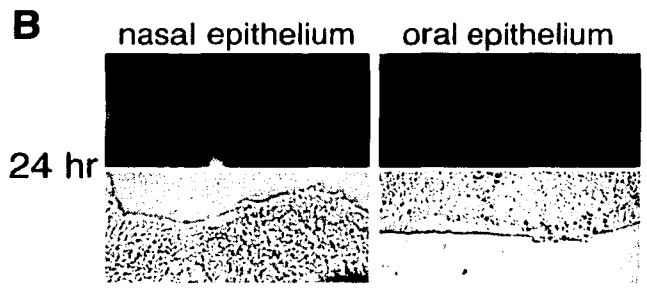
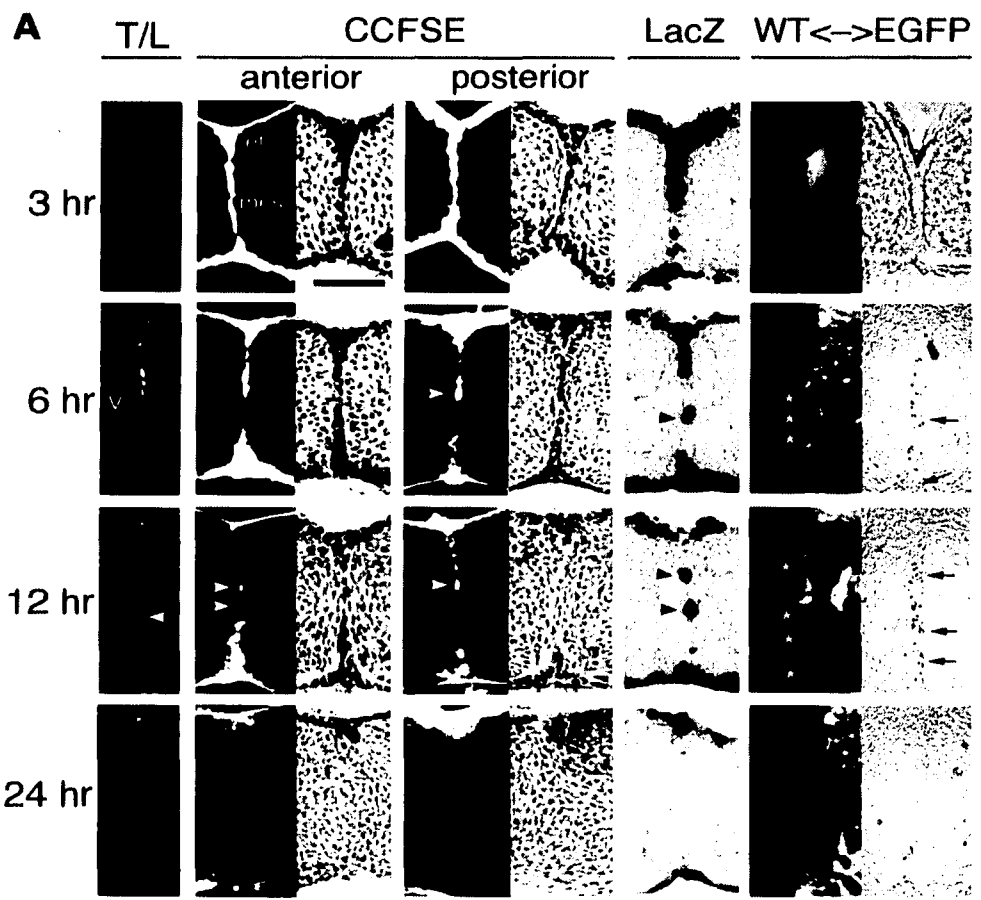
Fig. 8. Schematic representation of palate shelf fusion. (A) Initially, shelves approach each other at the time the periderm cells (yellow cells) overlying the basal MEE cells (white cells) emit filopodia. (B) First contact and adhesion occurs between periderm cells; proteoglycans appear to be important at this stage. (C) Adhesion becomes stronger as periderm cells move up and down the MES (blue bracket) forming the epithelial triangles (et), and basal MEE cells of each shelf intercalate (convergent extension) resulting in a single epithelial layer. (D) MES breaks and epithelial pearls (ep) form; periderm and MEE cells start to die within epithelial triangles and epithelial pearls, respectively (red cells). (E) MES, composed of periderm and basal MEE cells, essentially degenerates by cell death; dying cells activate basal lamina degradation (cataptosis; broken orange line). (F) Fusion is complete without a major mesenchymal cell movement across the middle line; some oral and nasal epithelial cells do move across the middle line.

TABLE 1. Quantification of MEE labeled cells in the mesenchyme compartment after fusion.

<i>Labeling method (culture condition)</i>	<i># slices (width) analyzed</i>	<i># labeled cells in mesenchyme</i>	<i># cells TUNEL positive</i>
CCFSE	94 (12 μm)	12	12
CCFSE (z-VAD)	100 (12 μm)	0	0
Ad-LacZ	60 (50 μm)	3	N.d.

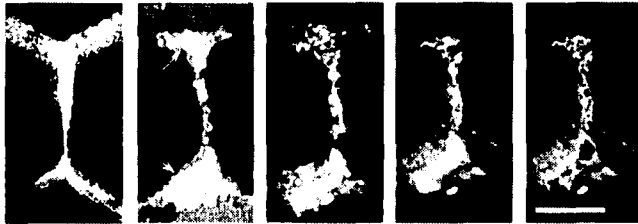
MEE cells of palates were labeled with CCFSE or Ad-LacZ (LacZ) before contact and cultured for 24 hours, CCFSE labeled palates were also cultured in the presence of z-VAD. Slices from those palates (3 for each condition) were produced and labeled cells in the mesenchyme compartment were searched along anterior and posterior palatal regions. Cell death was also determined in the same samples by the TUNEL technique. N.d., not determined.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

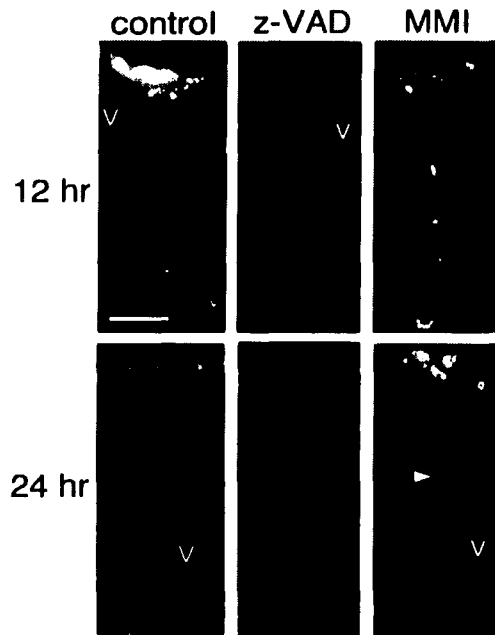


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

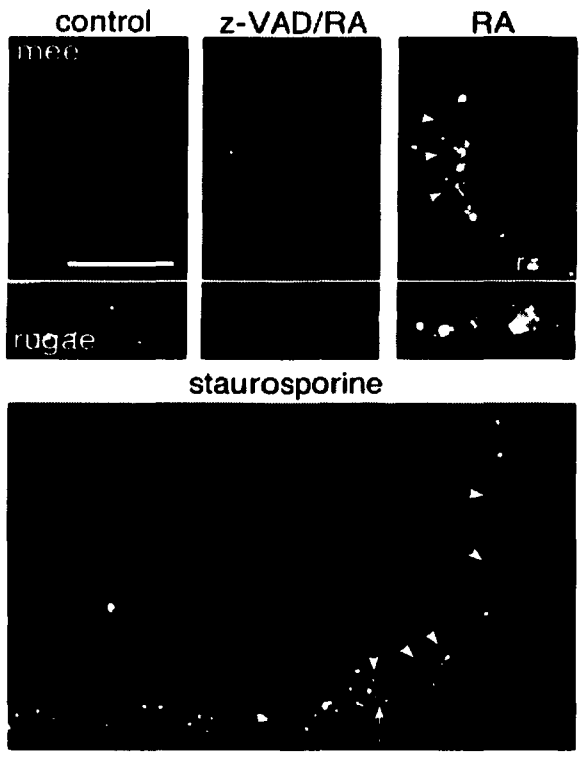
3 hr 6 hr 12 hr 24 hr TUNEL



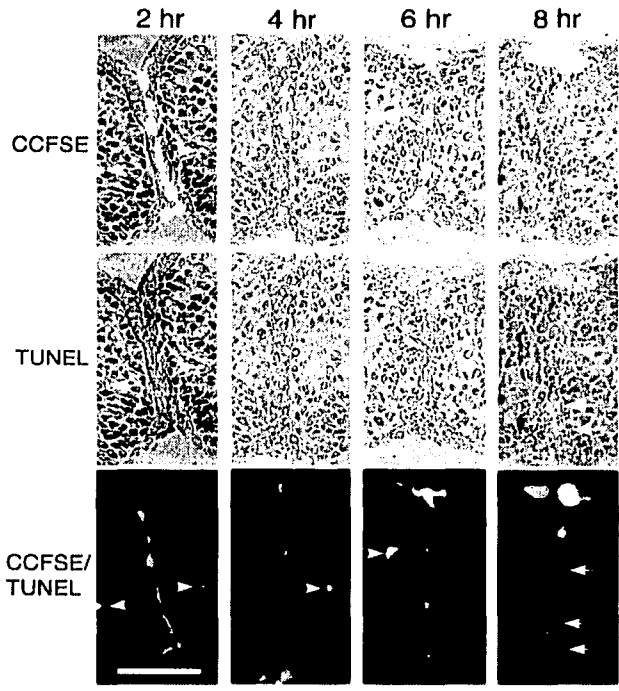
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



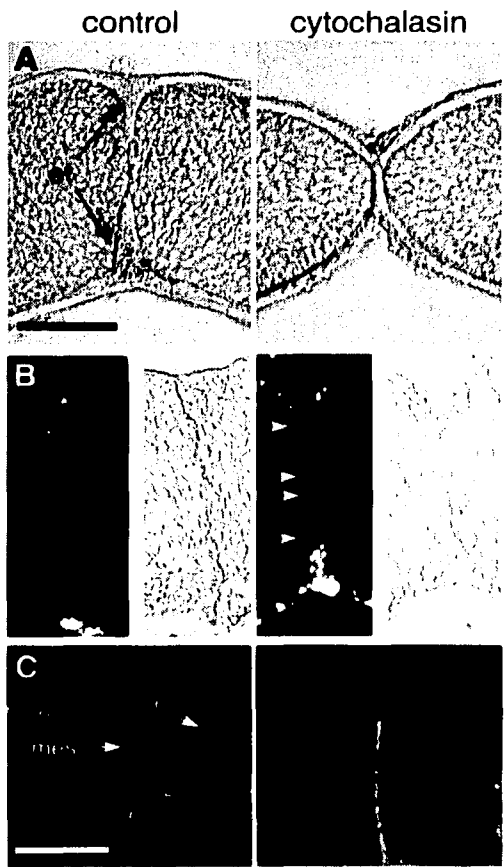
TESIS CON
FECHA DE ORIGEN



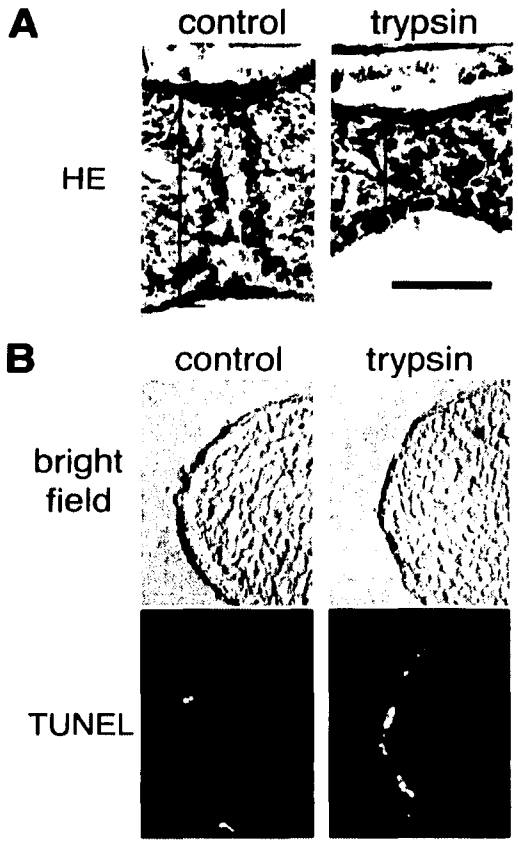
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



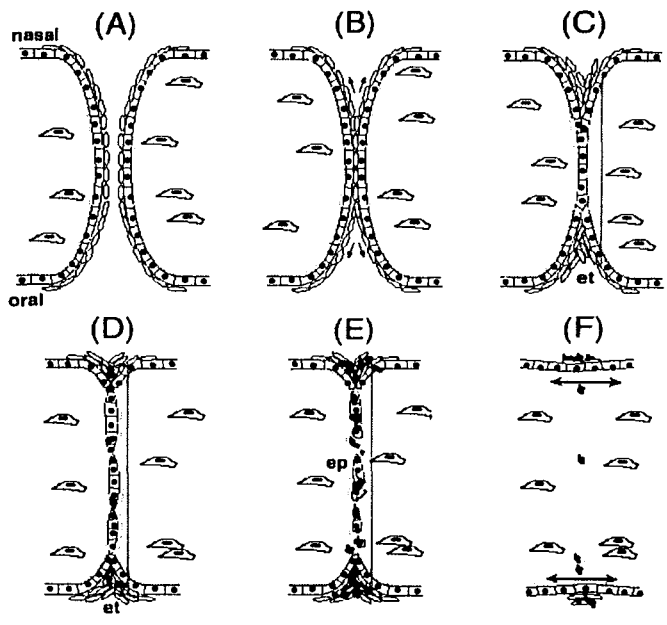
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
LÍNEA DE ORIGEN