



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DEL PAPEL FUNCIONAL DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA 4 Y
DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS EN EL DESARROLLO
EMBRIONARIO TEMPRANO DEL PEZ CEBRA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Mario Adán Mendieta Serrano

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Salas Vidal

Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Mario Zurita Ortega

Instituto de Biotecnología UNAM

Dra. Diana Escalante Alcalde

Instituto de Fisiología UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2017



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.

Agradecimientos.

Se agradece el apoyo de las siguientes instituciones, unidades, laboratorios, colaboradores y técnicos:

Universidad Nacional Autónoma de México.

Instituto de Biotecnología UNAM.

CONACyT, Número de beca 323762.

Laboratorio 15, Instituto de Biotecnología UNAM.

Dra. Hilda Lomelí Buyoli, Dra. Denhi Schnabel Peraza, L. en C. Javier Méndez Cruz, M en C. Dulce I. Benitez Pacheco y a la M. en C. Laura S. Ramirez Ángeles.

Laboratorio 19, Instituto de Biotecnología UNAM.

Dr. Luis Cárdenas Torres.

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada UNAM.

Dr. Arturo Pimentel, M. en C. Andrés Saralegui, Q. F. B. Xochilt Alvarado y al Dr. Christopher D. Wood.

Centro de Investigaciones Químicas-IICBA UAEM.

Dra. Laura Alvarez Beber y a la M. en C. Mayra Yaneth Antuez Mojica.

Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (CONACyT 251613).

Unidad de Docencia y Formación de Recurso Humanos, Instituto de Biotecnología UNAM.

Gloria Villa Herrera, Lic. J. Antonio Bolaños Guillen, Ing. Jalil Saab.

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Este trabajo de investigación fue financiado por PAPIIT-UNAM IX201110, IN205612 y CONACyT 89825

Dedicado:

A mi hija, con todo mi amor.

A Tania, por su amor incondicional.

A mis padres, Mario y María del Carmen, por su ejemplo, amor y apoyo.

A mi hermano, Oscar, mi compañero de toda la vida.

A mis amigos.

Agradecimientos:

A mi tutor, Enrique, por todo su tiempo, apoyo, confianza, comprensión y sobretodo su amistad a lo largo de estos años. Gracias por compartir tu entusiasmo y por la libertad para desarrollar mis ideas.

A Denhi, por su amistad y su apoyo.

A Hilda, por sus comentarios a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio, los actuales y los pasados, me llevo algo de cada uno de ellos.

A los Dres. Diana Escalante y Mario Zurita por sus comentarios e ideas durante las evaluaciones.

A los revisores de esta tesis, los Dres. Viviana Valadez, Julio Morán, Enrique Rudiño, Alberto Darszon y Joseph Dubrovsky, por su tiempo y sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

Índice general.

Abreviaturas.....	7
Resumen.	9
Abstract.	10
1. Introducción.	11
1.1. El desarrollo embrionario de pez cebra como modelo.....	12
1.2. Las especies de oxígeno reactivas.....	13
1.2.1. Fuentes de formación de especies de oxígeno reactivas.....	14
1.2.2. Formación de EOR en la mitocondria.	14
1.2.3. Formación de EOR por las NADPH oxidasas.	15
1.3. Los sistemas antioxidantes.....	15
1.3.1. Antioxidantes enzimáticos, las glutatión peroxidadas.	16
1.3.2. Importancia de la GPx4 durante el desarrollo embrionario.	16
1.4. Las especies de oxígeno reactivas participan en el control de procesos biológicos del desarrollo.....	17
1.5. Antecedentes.	19
2. Hipótesis general del proyecto	21
3. Objetivos.....	21
3.1.1. Objetivo general.....	21
3.1.2. Objetivos particulares.	21
4. Materiales y métodos.....	22
4.1. Mantenimiento de cepas de peces cebra.....	22
4.2. Obtención y cultivo <i>in vitro</i> de embriones de pez cebra.....	22
4.3. Clonación e hibridación <i>in situ</i>	22
4.4. Inmunofluorescencia.	23
4.5. Visualización de la inmunotinción en embriones completos por microscopía confocal.	24
4.6. Análisis de las imágenes.	24
4.7. Purificación de proteínas y análisis por westernblot.	25
4.8. Inyección de los morfolidos diseñados contra <i>gpx4a</i> y <i>gpx4b</i>	26
4.9. Tratamiento farmacológico de los embriones.....	26
4.10. Tinciones de embriones completos para el marcaje de especies de oxígeno reactivas, mitocondrias, células del blastodermo, núcleos y filamentos de actina.....	26

4.11.	Tinción con nitroazul de tetrazolio para la detección de superóxido.....	27
4.12.	Visualización de la dinámica de especies de oxígeno reactivas, mitocondrias y células del blastodermo.....	28
4.13.	Visualización de núcleos y filamentos de actina.....	28
4.14.	Microscopía de epifluorescencia y cuantificación de la señal de CM-H ₂ DCFDA. ...	29
5.	Resultados.....	30
5.1.	Patrón de expresión temporal y espacial de GPx4 en el desarrollo embrionario.....	30
5.1.1.	Análisis de la expresión de los transcritos <i>gpx4a</i> y <i>gpx4b</i> durante el desarrollo embrionario. .	30
5.1.2.	Validación del anticuerpo anti GPx4 y análisis de la secuencias de GPx4 de humano y pez cebra. 33	
5.1.3.	Localización de GPx4 en las primeras divisiones celulares del embrión.....	40
5.1.4.	Localización de GPx4 durante el período de gástrula.....	45
5.1.5.	Localización de GPx4a y GPx4b durante la somitogénesis y a las 24 horas de desarrollo embrionario.....	47
5.2.	Patrón de localización de EOR durante el desarrollo embrionario.....	51
5.2.1.	Identificación de especies de oxígeno reactivas durante el desarrollo embrionario.....	51
5.2.2.	Localización de la señal de DCF durante las primeras divisiones celulares.....	52
5.2.3.	Patrón de localización de la tinción de DCF durante la gastrulación.....	55
5.2.4.	Los patrones de tinción de DCF son dinámicos en el espacio intersticial y en el frente de migración durante la epibolia.....	56
5.2.5.	La señal fluorescente de DCF se localiza en el espacio intersticial durante la epibolia.....	62
5.2.6.	Caracterización espacio temporal de la formación del anillo de DCF.....	63
5.2.7.	La tinción de DCF fluorescente en los embriones completos indica regiones de EOR endógenas.....	66
5.2.8.	La inhibición de la actividad de NADPH disminuye los niveles de especies de oxígeno reactivas y afecta el proceso de epibolia.....	70
5.2.9.	El tratamiento con peróxido de hidrógeno rescata los efectos causados por la inhibición de la actividad de NADPH oxidasa.....	74
6.	Discusión.....	78
6.1.	Los patrones de tinción del DCF fluorescente indican la presencia de especies de oxígeno reactivas en el desarrollo embrionario del pez cebra.....	78
6.2.	Las EOR participan durante las primeras divisiones celulares del embrión.....	81
6.3.	Localización y dinámica de las EOR en el espacio intersticial durante el desarrollo embrionario.....	84
6.4.	Las especies de oxígeno reactivas participan en el control de la progresión de la epibolia.....	86

6.5. Los patrones de localización de EOR y de la GPx4 son complementarios durante el desarrollo.....	89
7. Conclusiones.....	91
8. Perspectivas.....	92
9. Bibliografía.....	93
Apéndice A. Inmunolocalización en embriones completos.....	105
Apéndice B. Publicaciones generadas.....	106

Abreviaturas.

ADN, ácido desoxirribonucleico

ARN, ácido ribonucleico

ATP, adenosin trifosfato

BSA, albúmina de suero bovino

CM-H2DCFDA, clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato

DCF, diclorofluoresceína

DMSO, dimetilsulfóxido

DPI, difenil yodonio

EOR, especies de oxígeno reactivas

FADH₂, flavin adenin dinucleótido

GPx, glutatión peroxidasa

hpf, horas post fertilización

kDa, kilodaltones

mM, milimolar

MO, Morfolino

MTT, 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro

NADH, nicotidamida adenina dinucleótido

NADPH, nicotidamida adenina dinucleótido fosfato

NBT, nitroazul de tetrazolio

PBS, tampón fosfato de sodio

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PIV, velocimetría de imagen de partícula

PVDF, polifluoruro de vinilidelo

RMN, resonancia magnética nuclear

RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

stdctrlMO, morfolino estándar control

TBM, transición de la blástula media

TNF- α , factor de necrosis tumoral α

μm , micrómetro.

μM , micromolar

Resumen.

Las especies de oxígeno reactivas son moléculas derivadas del oxígeno molecular y se generan durante el metabolismo aeróbico y por la actividad de enzimas específicas. Las especies de oxígeno reactivas participan en la regulación de comportamientos celulares fundamentales como la proliferación, diferenciación, muerte, migración. Sin embargo, a pesar de que en los últimos años el conocimiento de cómo participan las especies de oxígeno reactivas en la fisiología celular ha aumentado, aún se desconoce cuales son las funciones de las EOR durante el desarrollo embrionario en contexto de un organismo completo. Por esta razón, en el presente trabajo se analizaron los patrones de formación de especies de oxígeno reactivas y de la localización de una de las enzimas encargadas de su eliminación, la glutatión peroxidasa 4 durante las primeras 24 horas del desarrollo embrionario del pez cebra. Encontramos que los patrones de especies de oxígeno reactivas y de la glutatión peroxidasa 4 son dinámicos y coinciden con eventos importantes durante el desarrollo embrionario. A partir del análisis descriptivo de estos patrones encontramos que las especies de oxígeno reactivas derivadas de la actividad enzimática de las NADPH oxidasas se requieren para la motilidad celular que ocurre durante la epibolia, que es el primer movimiento morfogénico de la gastrulación

En conjunto las observaciones descritas en la presente tesis muestran que los mecanismos de formación y metabolismo de las EOR son importantes para procesos fundamentales de la vida de los animales como la migración celular que ocurre durante el desarrollo embrionario.

Abstract.

Reactive oxygen species are molecules derived from molecular oxygen and they are generated during aerobic metabolism and by the activity of specific enzymes. Reactive oxygen species participates in the regulation of major cell behaviors like proliferation, differentiation, death and migration. However, despite the current knowledge about reactive oxygen species contribution to cellular physiology, reactive oxygen species participation during embryo development in context of whole organism still lacking.

For this reason, in the present work we analyzed the patterns of reactive oxygen species localization and the localization of an enzyme in charge of reactive oxygen species metabolism, the glutathione peroxidase 4 during the first 24 hours of zebrafish embryo development.

We found that reactive oxygen species and glutathione peroxidase 4 localization patterns are highly dynamic and occurs during key embryonic stages. We perform a descriptive analysis of these patterns, we found that reactive oxygen species derived from the enzymatic activity of NADPH oxidases participates in cell motility that occurs during epiboly, a major morphogenetic movement of gastrulation.

Altogether, the observations described in the present work it shows that the mechanisms of reactive oxygen species formation and metabolism are important during animal development.

1. Introducción.

Los animales multicelulares inician su desarrollo a partir de la formación del cigoto. Durante el desarrollo embrionario, el cigoto pasa de ser una sola célula, a un organismo multicelular con todas las funciones necesarias para vivir y reproducirse.

Durante el desarrollo ocurre la interacción coordinada y dinámica de múltiples procesos a diferentes niveles de complejidad. A nivel celular, diferentes comportamientos como la proliferación, la migración, la diferenciación e incluso la muerte, son fundamentales para que ocurra de manera normal el desarrollo de los animales.

Por ejemplo, la migración celular participa durante el proceso de gastrulación. En este proceso las células migran masivamente y se relocalizan para formar los tres linajes germinales: el mesodermo, el endodermo y el ectodermo. Estos tres linajes germinales posteriormente se diferencian a los diferentes tejidos que formarán al organismo (Solnica-Krezel y Sepich 2012).

La importancia de la migración en el desarrollo embrionario ha sido evaluada experimentalmente en diferentes animales. En el pez cebra se ha observado que la afectación de los movimientos migratorios de las células durante la gastrulación, causa defectos graves en el desarrollo como la alteración de la formación de los ejes embrionarios, cambios en la talla, la morfología y la sobrevivencia de los embriones (Solnica-krezel et al. 1996). Sin embargo, a pesar de que se ha caracterizado la participación de diferentes vías de señalización durante la gastrulación (Solnica-Krezel y Sepich 2012), hasta el momento se desconoce la contribución de las especies de oxígeno reactivas en procesos del desarrollo fundamentales como la gastrulación.

En los últimos años se ha encontrado evidencia de que las especies de oxígeno reactivas participan en el control de procesos celulares fundamentales, que al mismo tiempo son importantes en el desarrollo embrionario (Covarrubias et al. 2008). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios que muestren la localización y la participación de las EOR durante el desarrollo embrionario en contexto de un organismo completo.

Por lo anterior, consideramos que el pez cebra es un modelo ideóneo para analizar el desarrollo embrionario, debido a dos de sus características; su desarrollo embrionario es externo y la transparencia de los embriones. Estas características permiten el monitoreo de su desarrollo por diferentes técnicas de microscopía con las que se puede tener una resolución a nivel celular e incluso molecular de los procesos biológicos que ocurren en el desarrollo. Tomando en cuenta lo anterior en el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio a los embriones de pez cebra para analizar la participación de las EOR en el desarrollo embrionario en vertebrados en el contexto de un organismo completo .

A continuación se presentará una breve introducción del desarrollo embrionario del pez cebra que resume los principales eventos de su desarrollo. Posteriormente, se presentarán generalidades de las especies de oxígenos así como de los sistemas antioxidantes, en particular de la enzima glutatión peroxidasa 4. Finalmente, en las dos últimas secciones se presentará evidencia experimental que muestra la importancia de las EOR en procesos biológicos.

1.1. El desarrollo embrionario de pez cebra como modelo.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleósteo tropical de agua dulce muy utilizado para estudios del desarrollo embrionario en vertebrados. El desarrollo embrionario de este organismo comienza con el huevo recién fertilizado, el cual presenta un patrón de división meroblástico, por lo que la división del huevo es incompleta ya que la mayor parte del cigoto es vitelo. A la zona donde ocurren las divisiones celulares se le denomina polo animal y a la zona donde se encuentra el vitelo se le denomina polo vegetal (Kimmel et al. 1995).

Una vez que el huevo es fertilizado (momento que se considera como las cero horas post-fertilización o hpf), se inicia la formación de la primera célula (polo animal) por corrientes citoplasmáticas que ocurren dentro del vitelo (polo vegetal) (Fuentes y Fernández 2010). Las primeras divisiones de los blastómeros ocurren de manera rápida y sincrónica, durante estas divisiones el desarrollo embrionario está regulado por componentes moleculares depositados por la madre en el vitelo que se denominan como la herencia materna (Kane y Kimmel 1993). La sincronía en las primeras divisiones va disminuyendo de manera gradual hasta que se pierde durante el proceso que se conoce

como la transición de la blástula media (TBM) (Kane y Kimmel 1993; Olivier et al. 2010; Mendieta-Serrano et al. 2013). Además, durante la TBM inician otros procesos importantes, como la motilidad celular y la activación de la expresión del genoma del embrión (Kane y Kimmel 1993). Una vez que las células del embrión son móviles, se inicia la epibolia que es el primer movimiento morfogénico de la gastrulación. La gastrulación se caracteriza por la ocurrencia de una serie de movimientos celulares que incluyen a la epibolia. Estos movimientos celulares ocurren de manera coordinada para generar a las tres capas germinales (el mesodermo, el endodermo y el ectodermo) que posteriormente se diferenciarán a cada uno de los tejidos que componen al organismo (Kimmel et al., 1995). Después de la gastrulación ocurre la segmentación, proceso mediante el cual el mesodermo paraxial se divide en “paquetes” o somitas, a lo largo del tronco y la cola del embrión (Stickney, Barresi, y Devoto 2000). A su vez los somitas se regionalizan y se diferencian en dermatomo, miotomo y esclerotomo, que son los precursores de la dermis, músculo, cartílago y hueso (Gilbert, 2006). Además, durante la segmentación se extiende la talla el embrión, principalmente en la región posterior del embrión (cola), se forman los primordios de los órganos como el ojo, la vesícula ótica y el corazón. A partir de las 24 hpf, la morfología del embrión permite reconocer claramente la parte más anterior (cabeza) y la más posterior (cola), además se pueden observar los ojos, la circulación sanguínea, la pigmentación, la regionalización del cerebro en formación y los primeras contracciones musculares (Kimmel et al., 1995).

1.2. Las especies de oxígeno reactivas.

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) son un conjunto de moléculas y radicales libres derivados del oxígeno molecular. Algunos ejemplos de EOR son el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Por su naturaleza oxidativa, las EOR en altas concentraciones son capaces de generar daño a diferentes macromoléculas incluyendo el ADN, las proteínas y los lípidos (Halliwell y Cross 1994).

Sin embargo, a lo largo de los años se ha acumulado evidencia experimental que muestra que las EOR participan en el control de diversos procesos celulares como la muerte, la proliferación, la diferenciación y la migración celular. Además se ha identificado que las EOR participan en el control de diferentes procesos del desarrollo embrionario como la morfogénesis de las extremidades de mamíferos y durante la angiogénesis

(Covarrubias et al. 2008). A continuación se discuten algunos de mecanismos involucrados en la formación y metabolismo de EOR, y posteriormente se señala evidencia a favor de como estos mecanismos participan en la regulación de procesos durante el desarrollo.

1.2.1. Fuentes de formación de especies de oxígeno reactivas.

Dentro de las células existen diferentes fuentes de producción de EOR, por ejemplo, la respiración aerobia que ocurre en las mitocondrias o por la actividad de enzimas especializadas en la formación de EOR como las NADPH oxidasas. En particular, las EOR derivadas de la actividad enzimática de las NADPH son relevantes para el presente trabajo porque se ha observado que participan en el control de la migración celular en diferentes procesos biológicos como la angiogénesis, la quimiotaxis, la cicatrización y la regeneración (Panieri y Santoro 2015; Hattori et al. 2010; Niethammer et al. 2009; Love et al. 2013).

A continuación se describe de manera general como contribuyen las mitocondrias y las NADPH oxidasas a la formación de EOR en las células.

1.2.2. Formación de EOR en la mitocondria.

La respiración mitocondrial es una de las fuentes mayores de EOR intracelular (Finkel 2011; Winterbourn 2008). En particular, se considera que en los complejos II y III de la cadena transportadora de electrones es donde se produce la mayor cantidad de EOR. En ambos complejos, los electrones derivados del NADH y el FADH₂ pueden reaccionar con el oxígeno molecular para formar aniones superóxido en la matriz mitocondrial (Holmström y Finkel 2014). Se estima que entre el 2 al 4 % del oxígeno total que se consume en la cadena transportadora de electrones para generar ATP no se reduce a agua sino a aniones superóxido (Dalton, Shertzer, y Puga 1999). Además de los complejos II y III, otras enzimas contribuyen a la formación de superóxido dentro de la mitocondria. En la membrana mitocondrial interna, otras fuentes enzimáticas que producen superóxido son la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y la flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa transferasa de electrones; mientras que en la matriz mitocondrial la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa también contribuyen a la formación de superóxido (Holmström y Finkel 2014).

1.2.3. Formación de EOR por las NADPH oxidasas.

Las NADPH oxidasas (Nox) son complejos proteicos membranales especializados en la generación de EOR (superóxido y peróxido de hidrógeno) de manera regulada, a partir de la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno (Bedard y Krause 2007). En los complejos NADPH oxidasa, las subunidades que tienen la actividad catalítica son proteínas transmembranales con actividad de oxidoreductasa que pertenecen a la familia conocida como enzimas Nox. Las proteínas Nox fueron descritas por primera vez en neutrófilos y algunas requieren de subunidades reguladoras para su activación y generación de EOR. En mamíferos se han descrito siete genes Nox; Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5 y las oxidasas duales duox1 y duox2 (Bedard y Krause 2007). Las Nox1 a la 5 generan superóxido, el cual puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno de forma espontánea o por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, mientras que las oxidasas duales pueden generar superóxido, pero también pueden generar directamente peróxido de hidrógeno. En cultivos celulares, la unión de factores de crecimiento como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) a sus receptores de superficie correspondientes, estimulan la activación de las NADPH oxidasas para la producción de superóxido o peróxido de hidrógeno hacia el espacio extracelular. Posteriormente, el peróxido de hidrógeno puede permear al citoplasma a través de acuaporinas y una vez dentro de la célula, el peróxido de hidrógeno derivado de la actividad de las NADPH oxidasas puede actuar como segundo mensajero modificando de manera reversible la actividad de una gran variedad de proteínas, como por ejemplo en las proteínas tirosina fosfatasas, principalmente oxidando los grupos tiol de los residuos de cisteína (Holmström y Finkel 2014)

1.3. Los sistemas antioxidantes.

De manera general los antioxidantes son compuestos o enzimas que inactivan o metabolizan EOR y contribuyen a mantener la homeóstasis redox intracelular. De acuerdo a la clasificación de Davies (Davies 1988) y revisado por Yu (Yu 1994), las actividades antioxidantes se pueden clasificar como defensas primarias o secundarias.

Las defensas primarias agrupan a: 1) los compuestos antioxidantes como las vitaminas A, C, E, el glutatión, y el ácido úrico. 2) las enzimas antioxidantes como la superóxido

dismutasa, que convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno, la catalasa y las peroxidasa que convierten el peróxido de hidrógeno en agua.

En el grupo de las defensas secundarias se clasifican a la mayoría de las enzimas involucradas en la reparación o eliminación de los componentes celulares dañados por las EOR, como las enzimas lipolíticas, las fosfolipasas, las enzimas proteolíticas, las proteasas, las peptidasas, y las enzimas que reparan el ADN como las endonucleasas, las exonucleasas, y las ligasas.

Dada la relevancia de los antioxidantes enzimáticos y en particular de las peroxidasa como la glutatión peroxidasa 4 para este trabajo, a continuación se describe algunas de las generalidades de estas enzimas antioxidantes.

1.3.1. Antioxidantes enzimáticos, las glutatión peroxidasa.

Dentro del grupo de las enzimas antioxidantes se encuentra una familia de proteínas denominadas glutatión peroxidasa (GPx). La primera GPx de mamífero se descubrió en 1957 (Mills 1957) y a partir de entonces se han identificado ocho glutatión peroxidasa en humanos (Brigelius-Flohé y Maiorino 2013). A excepción de la GPx5 y la GPx6, las proteínas GPx identificadas son selenoproteínas y tienen la particularidad de tener en su sitio catalítico un residuo de selenocisteína en lugar del residuo de cisteína (Herbette, Roeckel-Drevet, y Drevet 2007). Las GPxs han sido caracterizadas como enzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos a agua o a los alcoholes correspondientes (Maiorino et al. 1995). De las GPx identificadas en mamíferos, la GPx4 es la única GPx que cuando se provoca su delección genética se afecta el desarrollo embrionario (Yant et al. 2003).

1.3.2. Importancia de la GPx4 durante el desarrollo embrionario.

La GPx4 es una proteína monomérica con actividad antioxidante que tiene la particularidad de metabolizar peróxido de hidrógeno y lípidos peroxidados. Los embriones de ratón nulos para GPx4 mueren a los 7.5 días del desarrollo (Yant et al. 2003). Este hecho es relevante ya que los embriones de ratón con pérdida de función de otras glutatión peroxidasa (como la Gpx1, Gpx2 o Gpx3) son viables y aparentemente no tienen ningún defecto embrionario (Gromer et al. 2005). Esto resalta la importancia de la GPx4 durante

el desarrollo embrionario y a diferencia de las otras GPxs, indica que su función no puede ser suplida por otra proteína o compuesto antioxidante.

De manera adicional, está reportado que la GPx4 es importante en la regulación del estado redox celular durante el desarrollo embrionario, porque cuando se bloquea la actividad de GPx en extremidades de embriones de ratón se provoca un aumento en la concentración de EOR y se incrementa la muerte celular (Schnabel et al. 2006).

1.4. Las especies de oxígeno reactivas participan en el control de procesos biológicos del desarrollo.

En las últimas dos décadas se ha acumulado evidencia experimental que indica que las EOR y en particular el peróxido de hidrógeno funcionan como moléculas señalizadoras que participan en la regulación de procesos biológicos fundamentales del desarrollo en diferentes especies de eucariontes, como plantas, hongos y animales (Aguirre y Lambeth 2010).

Por ejemplo, en *Aspergillus nidulans* las EOR derivadas de la actividad de la NADPH oxidasa A regulan el desarrollo sexual (Lara-Ortíz, Riveros-Rosas, y Aguirre 2003). En el caso de las plantas, las EOR participan en la elongación de las raíces, la expansión de las hojas y en general durante el crecimiento celular (Gapper 2006). En el caso de los animales, los ejemplos reportados donde las EOR participan es durante la fertilización, el desarrollo temprano (Hernández-García et al. 2010) y en la morfogénesis de los dígitos (Salas-Vidal et al. 1998).

Sin embargo, una de las diferencias más notables en el desarrollo entre plantas y animales, es la migración celular que ocurre en el desarrollo de animales metazoarios (Gapper 2006).

En el caso de los animales, existen reportes que muestran que en cultivos de células *in vitro* las EOR participan en el control de la migración celular. Por ejemplo, las células derivadas de diferentes tipos celulares como endotelios, neutrofilos, fibroblastos o células vasculares de músculo liso cuando se tratan con enzimas que degradan EOR, se suprime la migración de estos tipos celulares que normalmente se induce cuando son estimuladas con factores de crecimiento o quimiotrayentes (Hurd, DeGennaro, y Lehmann 2012).

En esta misma línea, un modelo que ha sido muy utilizado para analizar la migración celular son los ensayos de herida-cicatrización tanto *in vitro* como *in vivo*.

En el caso de los ensayos *in vitro*, se realiza un raspado en una monocapa de células, lo que causa una brecha o “herida” en la monocapa. Las células ubicadas en los límites de la herida migran hacia el espacio raspado hasta que se cierra la herida y se restablecen los contactos célula-célula entre ambos límites de la herida (Liang, Park, y Guan 2007). En este sistema con células endoteliales, se ha observado que una vez que se realiza el raspado, las células más cercanas al borde de la herida producen EOR y además coincide que estas mismas células son las más móviles. Por otro lado la inhibición farmacológica de la actividad de NADPH oxidasas, con difenil yodonio (DPI) o con un análogo de superóxido dismutasa que posee actividad antioxidante, inhibe el cerrado de la herida (Moldovan et al. 2006). En conjunto estas observaciones *in vitro* indican que la formación de EOR es importante para la inducción de la migración celular.

En el caso de los ensayos *in vivo*, uno de los sistemas más estudiados ha sido el modelo de herida-cicatrización en pez cebra. En respuesta al corte de la región más posterior de la aleta caudal, se produce un gradiente de peróxido de hidrógeno en dirección posterior-anterior a partir del sitio de la herida (Niethammer et al. 2009). El gradiente de peróxido de hidrógeno, estimula la migración de macrófagos y neutrófilos al sitio de la herida (Niethammer et al. 2009; Yoo et al. 2011). Otros ejemplos de la formación de gradientes de peróxido de hidrógeno en respuesta a la amputación de la cola, se ha observado en otros organismos, como *Xenopus* o en el *gecko* (Love et al. 2013b). Sin embargo, en los ejemplos anteriores las EOR se producen en respuesta al daño mecánico, por lo que aún se desconoce si hay EOR que se generen de manera normal y a su vez que estas EOR sean requeridas para que ocurra el desarrollo embrionario.

1.5. Antecedentes.

En un trabajo previo realizado en el grupo (Salas-Vidal, datos sin publicar) se observó que la pérdida de función de la Rho GTPasa Rac1 en embriones de pez cebra afecta los movimientos de migración celular de convergencia y extensión. Además los embriones a las 24 horas desarrollo presentan un talla menor en comparación con los embriones controles. Las Rho GTPasas como Rac1 están involucradas en el control de diferentes procesos celulares como la dinámica del citoesqueleto y la migración celular (Etienne-Manneville y Hall 2002). En los embriones con pérdida de función de Rac1 también se observó que se afecta la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad antioxidante. Como seguimiento de esta línea de investigación, en el trabajo de maestría (Mendieta-Serrano 2011) se verificó que la pérdida de función Rac1 disminuye los niveles de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa 4 (GPx4) y de manera paralela se observó que la disminución de los niveles de Rac1 causa un aumento en las EOR. Estos datos indicaron que Rac1 podría participar en la regulación del estado redox durante el desarrollo.

Sin embargo, hasta ese momento se desconocía la localización de los patrones de formación EOR así como de las enzimas encargadas de su metabolismo durante el desarrollo temprano de pez cebra. Por esta razón, en el trabajo de maestría se inició el análisis de los patrones de formación de EOR durante el desarrollo embrionario usando una sonda fluorescente para la detección de EOR y microscopía de epifluorescencia. En este trabajo se observaron los patrones de tinción con la sonda fluorescente durante el desarrollo embrionario, lo cual indicaba la presencia de EOR en los embriones. Además, al realizar series de tiempo de los embriones teñidos con la sonda fluorescente se observó que los patrones de tinción eran dinámicos.

En resumen, los datos preliminares obtenidos durante el proyecto de investigación de maestría indicaban que las EOR presentan patrones dinámicos muy interesantes durante el desarrollo embrionario en pez cebra. A partir de estos datos se generó la hipótesis de que las EOR podrían estar participando en procesos biológicos importantes para el desarrollo embrionario.

Por lo anterior, el presente trabajo se enfocó en caracterizar a detalle los patrones de localización de EOR así como de la enzima antioxidante GPx4 durante el desarrollo embrionario. Además se evaluó si los mecanismos encargados de la generación y metabolismo de EOR tienen un papel biológico en procesos del desarrollo embrionario.

2. Hipótesis general del proyecto

Las especies de oxígeno reactivas participan en el control de procesos fundamentales del desarrollo embrionario.

3. Objetivos.

3.1.1. Objetivo general.

Determinar el papel de los mecanismos de producción y metabolismo de EOR en el control de procesos del desarrollo embrionario.

3.1.2. Objetivos particulares.

1. Determinar la expresión espacial y temporal de la enzima antioxidante GPx4 a nivel del ARN y de la proteína, durante el desarrollo del pez cebra.
2. Determinar la localización de la formación y/o acumulación de EOR endógenas durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
3. Analizar el efecto de la inhibición de la formación de las EOR en la progresión de la epibolia.

4. Materiales y métodos.

4.1. Mantenimiento de cepas de peces cebra.

Los peces cebra silvestres se mantuvieron con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y se alimentaron tres veces al día. Las condiciones del agua (amonio, cobre, conductividad y pH) se monitorearon cada semana y se realizaron recambios de agua de sistema (agua desionizada por osmosis inversa mezclada con sales: NaHCO₃ 0.1 g/l, instant ocean 0.1 g/l) de 10 litros diarios (Westerfield 2007).

4.2. Obtención y cultivo *in vitro* de embriones de pez cebra.

Los embriones se obtuvieron por cruza naturales de peces cebra silvestres adquiridos de un acuario local y de la cepa híbrida TU-AB-WIK. De manera breve, los peces machos y hembras en una relación 1:2 se colocaron en una red la noche anterior a la mañana de la crua para permitir que los huevos recién fecundados fueran depositados en el fondo del acuario y de esta manera evitar que los peces adultos se los comieran. Los embriones se colectaron al inicio del fotoperíodo de luz que es cuando las hembras y machos se estimulan para la ovoposición y la eyaculación, respectivamente, y ocurra la fertilización. Los embriones se succionaron con una pipeta del fondo de la pecera y se limpiaron de detritos. Los embriones de pez cebra se cultivaron *in vitro* en cajas petri de 100 mm con agua de sistema o medio de embrión a una temperatura de 28°C (Westerfield 2007) permitiendo el desarrollo embrionario hasta cada una de las etapas de interés según la clasificación hecha por Kimmel y col, (Kimmel et al. 1995).

4.3. Clonación e hibridación *in situ*.

Grupos de 40 a 60 embriones en las etapas embrionarias de 16- a 32-células, esferadomo, escudo, 70%-epibolia, primordio y 24 horas post fertilización (hpf) se trataron con 1 ml de RNAlater (Ambion) a 4°C por la noche. El ARN total se aisló con el reactivo Trizol (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante. Para evitar la contaminación con ADN genómico, las muestras de ARN se trataron con DNAsa TURBO DNA-free kit (Invitrogen). El cDNA se sintetizó con la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y en la reacción de síntesis del cDNA se usó una combinación de Oligo dT (Invitrogen) y random

primers (Invitrogen). Para amplificar por PCR las secuencias de los genes de pez cebra *gpx4a* y *gpx4b*, los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las secuencias de referencia (NM_001007282.1 y NM_001030070.2 respectivamente). Las secuencias de los oligonucleótidos usados fueron las siguientes: *gpx4a*, 5' AATTCGCTGTCTGCTGTTTCAG 3' y 5' TCCTCAACAAGGGGTTTCCA 3'; *gpx4b*, 5' TAGTATGTGGTTGTTTCAGAGAGC 3' y 5' GCCCAAACACAGGACGGAG 3' (Mendieta-Serrano et al. 2015); ARN ribosomal *18s*, 5' TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG 3' y 5' CGGAGGTTCGAAGACGATCA 3' (McCurley y Callard 2008). Los productos de PCR se clonaron en el vector TOPO pCRII (Invitrogen), se secuenciaron y se usaron para la síntesis de las sondas para la hibridación *in situ*. La detección de los ARNs por hibridación *in situ* se realizó siguiendo un protocolo estándar (Thisse et al. 2003).

4.4. Inmunofluorescencia.

Para determinar los patrones de localización de la glutatión peroxidasa 4 en los embriones completos, se realizaron inmunotinciones como lo describió Mendieta y col. (Mendieta-Serrano et al. 2015) con ligeras modificaciones.

Los embriones de pez cebra en diferentes etapas de desarrollo se fijaron en grupos de 10 a 15 embriones en paraformaldeído al 4% en PBS a 4°C por toda la noche a excepción de los embriones en las etapas de somitogénesis y de 24 horas de desarrollo. En el caso de estas etapas, los embriones se fijaron por 2 horas a temperatura ambiente. Los embriones de 24 horas de desarrollo y de etapas posteriores donde los embriones ya extendieron la cola, el corión se removió manualmente con pinzas antes de la fijación con paraformaldeído. Los embriones se lavaron tres veces con buffer de bloqueo (PBS, BSA 0.1%, triton X100 1%), se removió el corión manualmente con pinzas y se incubaron en buffer de bloqueo por al menos 5 horas a temperatura ambiente. En los pasos de bloqueo y los pasos posteriores de incubación, los embriones se mantuvieron con agitación moderada y constante. Los embriones se incubaron a 4°C durante la noche en presencia del anticuerpo primario de conejo IgG anti-GPx4 (H-90, sc-50497, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100 en buffer de bloqueo (concentración final de 2 µg/ml). Después, los embriones se lavaron tres veces con buffer de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Alexa Fluor 647 (A-21244, Molecular Probes) diluido 1:100 en buffer de bloqueo

(concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$) a 4°C durante 8 horas. Nuevamente los embriones se lavaron tres veces con buffer de bloqueo y se incubaron con faloidina Alexa fluor 488 (A12379, Molecular Probes) diluida 1:100 en buffer de bloqueo a 4°C durante la noche para visualizar los filamentos de actina polimerizada. Los embriones se lavaron tres veces en buffer de bloqueo y se trataron con 0.4 mg/ml de RNAsa (Roche) en buffer de bloqueo por una hora a 37°C. Los embriones se lavaron tres veces con buffer de bloqueo y posteriormente se tiñieron con una dilución 1:4000 de Hoechst 33258 (H1398, Molecular Probes) en buffer de bloqueo (concentración final, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) para visualizar el ADN y los núcleos. Finalmente los embriones se lavaron tres veces y se transfirieron a un volumen de 10 μl de agarosa de bajo punto de fusión diluida al 1% en PBS para su visualización por microscopía confocal.

4.5. Visualización de la inmunotinción en embriones completos por microscopía confocal.

Los embriones teñidos con reactivos fluorescentes se visualizaron con un sistema de microscopía confocal FluoView FV100 acoplado a un microscopio recto BX61W1 o a un microscopio invertido IX81, ambos de la marca Olympus. Los objetivos utilizados fueron: un objetivo 10x UPlanSApo (apertura numérica 0.4) y un objetivo 20x (apertura numérica 0.75). Para visualizar los diferentes reactivos fluorescentes, primero se realizó una excitación simultánea con dos láseres con una longitud de onda de 405 nm y 633 nm respectivamente, después se excitó con un láser de 488 nm esto fue con la finalidad de evitar el sangrado entre canales. La apertura del iris (pinhole) se mantuvo en 200 μm . Los cortes ópticos se adquirieron con un paso en Z de 8 μm con el objetivo 10x y de 1 μm con el objetivo 20x.

4.6. Análisis de las imágenes.

Las series de cortes ópticos obtenidas por microscopía confocal se procesaron con ImageJ 1.46a (Abràmoff, Magalhães, y Ram 2004) y/o Fiji (Schindelin et al. 2012). A partir de las series de cortes ópticos se realizaron proyecciones de intensidad máxima completas o parciales para visualizar estructuras internas; en algunos casos se eligieron cortes ópticos individuales para resaltar algunas observaciones. Los núcleos se contaron

con el plugin 3D Object Counter desde la etapa de 1-célula hasta la etapa de 512-células. Los modelos tridimensionales se generaron con el programa Fluorender (Wan et al. 2012).

4.7. Purificación de proteínas y análisis por westernblot.

Los extractos proteicos totales se prepararon siguiendo el protocolo de Link y colaboradores (Link et al. 2006) con ligeras modificaciones (Mendieta-Serrano et al. 2015). Los embriones se clasificaron de acuerdo a la etapa de desarrollo de interés y se removió el corion manualmente. A los embriones se les removió el vitelo en buffer desvitelizante (55 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.25 mM NaHCO₃), se lavaron dos veces en buffer de lavado (110 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2.7 mM CaCl₂, 10 mM Tris/Cl pH 8.5), se resuspendieron con 1 µl de buffer de lisis por embrión (Tris 1 mM pH 7.4, 1 tableta de inhibidor Mix (Complete, Mini, EDTA-free. Roche), 0.125% NP40, agua MilliQ a 10 ml) y se incubaron por 1 hora a 4°C con agitación moderada. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 rpm y las proteínas solubles se recuperaron en el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford y los sobrenadantes con las proteínas solubles se mezclaron en una relación 1:1 con buffer de carga, las muestras se hirvieron por cinco minutos y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

El western blot se realizó como lo describió previamente (Schnabel *et al.*, 2005). Los extractos proteicos totales se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato dodecil de sodio al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF, ambas de 0.45 µm; se bloquearon con 5% de leche sin grasa disuelta en TBS-T (50 mM Tris pH 7.5, 0.05% Tween 20) y se incubaron con el anticuerpo primario indicado diluído 1:1000 en solución de bloqueo (5% de leche sin grasa disuelta en TBS-T). Después de tres lavados de 10 minutos con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (diluído 1:10,000 en solución de bloqueo) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Las proteínas se visualizaron con LumiGLO (Cell Signalling Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. A las mismas membranas se les removieron los anticuerpos y el bloqueo (“stripping”) con 62 mM Tris, SDS 2% y 100 mM β-mercaptoetanol por 40 minutos a 70°C y después se realizó una inmunodetección contra Erk-1/2 total. Los anticuerpos usados fueron: anti-GPx-4 (H-90, sc50497), anti Erk-1/2 (sc153) y el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP (sc2004), todos de Santa Cruz Biotechnology.

4.8. Inyección de los morfolinios diseñados contra *gpx4a* y *gpx4b*.

Para verificar la especificidad del anticuerpo anti-GPx4 usado en los experimentos de inmunofluorescencia y westernblot, se generaron embriones con pérdida de función parcial de GPx4 inyectando morfolinios antisentido (Mendieta-Serrano et al. 2015). Las secuencias de los genes de pez cebra de *gpx4a* y de *gpx4b* (NM_001007282.1 y NM_001030070.2) se utilizaron para el diseño de los morfolinios correspondientes que hibridan contra el codón de inicio de la traducción. Un morfolino estándar control (stdctrlMO) o la inyección de buffer Danieau se utilizó como control. Las secuencias de los morfolinios fueron las siguientes:

*gpx4a*MO 5'-CAGCAGACCCTAAGAAACGCATGAC -3', *gpx4b*MO 5'-GCGCTCTCTGAAACAACCACATACT- 3' (Mendieta-Serrano et al. 2015). stdctrlMO, 5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA- 3'.

4.9. Tratamiento farmacológico de los embriones.

Los embriones de pez cebra con o sin corion se mantuvieron en agua de sistema a 28°C hasta que llegaron a la etapa de interés para el inicio del tratamiento. Para los ensayos de la inhibición farmacológica, se usó la molécula VAS2870 (Sigma-Aldrich, SML0273) que es un inhibidor general de la actividad de las NADPH oxidasas (ten Freyhaus et al. 2006) y se diluyó en DMSO anhidro (276855, Sigma-Aldrich). Las diluciones concentradas que se utilizaron fueron las siguientes: peróxido de hidrógeno (H1009, Sigma-Aldrich), solución de tert-Butil hidroperóxido (Luperox TBH70X, 458139, Sigma-Aldrich) y VAS2870 (10 mg/ml, SML0273, Sigma-Aldrich). Las diluciones de trabajo se prepararon con medio de crecimiento de embrión. Para cada tratamiento se utilizaron grupos de 30 embriones en la etapa de esfera o 50%-epibolia y se incubaron en placas de 48 pozos, 10 embriones por pozo en un volumen total de 300 µl por tratamiento. Los embriones controles se trataron con una dilución de DMSO al 1% en medio de crecimiento de embrión.

4.10. Tinciones de embriones completos para el marcaje de especies de oxígeno reactivas, mitocondrias, células del blastodermo, núcleos y filamentos de actina.

Para el marcaje *in vivo* de las especies de oxígeno reactivas, mitocondrias y células del blastodermo, los embriones se decoraron manualmente con pinzas para permitir la

penetración de los colorantes. Para la detección general en embriones completos de las especies de oxígeno reactivas se usó el reactivo CM-H₂DCFDA (C6827, Molecular Probes) como se describió por Schnabel y col. (Schnabel et al. 2006) con ligeras modificaciones. De manera breve, se preparó una solución concentrada a partir de un vial con 50 µg de CM-H₂DCFDA y se diluyó en 19 µl de DMSO anhidro a una concentración final de 400 mM. Los embriones se incubaron en una solución de 40 µM de CM-H₂DCFDA diluido en medio de embrión (DMSO al 1% final) durante 40 minutos. Después, los embriones se lavaron dos veces con medio de embrión e inmediatamente se transfirieron a un volumen de 10 µl en agarosa de bajo punto de fusión diluida al 1% en medio de embrión para su visualización por microscopía confocal.

Para la visualización simultánea de las especies de oxígeno reactivas con las mitocondrias o con las células de blastodermo, los embriones se incubaron con 0.5 µM MitoTracker Red CMXRos (M-7512, Molecular Probes) por 30 minutos para visualizar las mitocondrias (Popgeorgiev et al. 2011) o con 100 µM BODIPY TR (C34556, Molecular Probes) por una hora para visualizar las células del blastodermo (Mark S Cooper et al. 2005). Después, los embriones se lavaron tres veces con medio de embrión y posteriormente se incubaron con CM-H₂DCFDA como se mencionó previamente. La incubación con los reactivos fluorescente se realizaron a 28°C en oscuridad. Para el marcaje *in vivo* de los núcleos del vitelo, los embriones posteriores a la etapa de 1k-células se inyectaron en el vitelo con 1 nl de una solución 0.5 mM de SYTOX Green (Invitrogen, USA) diluida en buffer Danieau como se describió previamente (D'Amico y Cooper 2001). Una vez que los embriones se desarrollaron hasta la etapa de escudo, los embriones se inspeccionaron bajo el microscopio de epifluorescencia para seleccionar sólo aquellos que tenían una tinción positiva en los núcleos del vitelo. Los embriones seleccionados se co-tiñieron con 0.5 µM Mitotracker Red CMXRos.

4.11. Tinción con nitroazul de tetrazolio para la detección de superóxido.

Para la detección de superóxido *in situ* e *in vivo* en los embriones completos, se utilizó la sal nitroazul de tetrazolio (NBT), por un protocolo descrito previamente para plantas (Montiel et al. 2012) pero con modificaciones importantes para llevarlo a cabo en embriones de pez cebra. Grupos de 10 embriones en proceso de epibolia se incubaron con

una solución 1.4 mM de NBT en medio de embrión hasta la detección de la precipitación del colorante e inmediatamente los embriones se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante la noche.

4.12. Visualización de la dinámica de especies de oxígeno reactivas, mitocondrias y células del blastodermo.

Los embriones coteñidos con CM-H₂DCFDA y con Mitotracker Red CMXRos o BODIPY TR se visualizaron en series de tiempo con un sistema de microscopía confocal FluoView FV1000, un objetivo 20x (apertura numérica 0.75) y las fuentes láser de excitación fueron 488 nm para el CM-H₂DCFDA y 542 nm tanto para el Mitotracker Red CMXRos como para el BODIPY TR. Los colorantes se excitaron de forma independiente. Los embriones se mantuvieron en una incubadora montada en la platina (TC-GSH, Bioscience Tools) y acoplada a un controlador de temperatura (TC-TP, Bioscience Tools) para mantener la temperatura a 28°C durante la adquisición de las series de tiempo.

4.13. Visualización de núcleos y filamentos de actina.

Para determinar los patrones de localización de los núcleos y de los filamentos de actina en los embriones tratados con VAS2870, los embriones se fijaron toda la noche a 4°C en paraformaldehído al 4% en PBS. Después se lavaron tres veces en buffer de bloqueo (PBS, BSA 0.1%, TX100 1%) y se les removió el corión manualmente. Los embriones se bloquearon por al menos 4 horas a temperatura ambiente en buffer de bloqueo. El bloqueo y las incubaciones siguientes se realizaron con agitación moderada y constante. Para visualizar los filamentos de actina, los embriones se incubaron toda la noche a 4°C con faloidina Alexa fluor 488 (A12379, Molecular Probes) diluída 1:100 en buffer de bloqueo. Los embriones se lavaron tres veces y se trataron con una dilución de 0.4 mg/ml de RNAsa (Roche) en buffer de bloqueo por una hora a 37°C. Los embriones se lavaron tres veces y se tiñieron con Hoechst 33258 (H1398, Molecular Probes) diluído 1:4000 en buffer de bloqueo. Finalmente, los embriones se lavaron tres veces con buffer de bloqueo y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% diluida en PBS para su visualización por microscopía confocal o epifluorescencia.

4.14. Microscopía de epifluorescencia y cuantificación de la señal de CM-H₂DCFDA.

Los embriones teñidos con CM-H₂DCFDA se visualizaron con un sistema de microscopía de epifluorescencia equipado con un microscopio Zeiss Axioscop y un objetivo 5x (apertura numérica 0.15) plan neofluoar. Las imágenes se adquirieron con una cámara CoolSNAP cfd CCD (Roper Scientific, Tucson Arizona), controlada con el programa MicroManager 1.5 (NIH. USA). Las imágenes fueron guardadas en formato TIFF de 16-bit con una resolución de 1392x1040. Los tiempos de exposición de los embriones a la luz UV se mantuvieron al mínimo (50 a 100 milisegundos aproximadamente). Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ.

La cuantificación de la señal del CM-H₂DCFDA en presencia de peróxido de hidrógeno o de tert-Butil hidropéroxido se realizó como fue descrita por Cárdenas y col. (Cárdenas et al. 2008) con ligeras modificaciones para adaptar a las condiciones de incubación de los embriones de pez cebra. Las imágenes se adquirieron con una cámara CCD de alta velocidad (Sensys; Roper Scientific) acoplada a un microscopio invertido Nikon TE300 con un objetivo 4x (apertura numérica 0.2). Los embriones teñidos se excitaron con una fuente de iluminación xenón (DG-4; Sutter Instruments), la cual contiene una lámpara de xenón libre de ozono (330-700 nm) y un galvanómetro para el cambio de longitud de onda. La longitud de onda para la excitación del colorante fue 490 nm y la emisión fue colectada a 535 nm (bandpass: 25 nm). Los embriones se expusieron a la fuente de luz de excitación por 15 a 20 ms. Las imágenes fueron colectadas cada 2 segundos con un binning de 2 x 2. Los filtros fueron de Chroma Technology y los filtros de emisión se colocaron en un rueda de filtros (Sutter Instruments). El control, ajuste y adquisición de las imágenes se controló con el programa MetaMorph/MetaFluor (Universal Imaging).

5. Resultados.

En el presente trabajo se analizaron los patrones de localización de las EOR, así como de la enzima antioxidante GPx4 durante el desarrollo embrionario. Al evaluar los patrones normales de la distribución de EOR y GPx4, se encontró que presentan patrones característicos que coinciden con procesos importantes del desarrollo embrionario, como la migración celular que ocurre durante la gastrulación.

En las siguientes secciones se presentarán los resultados obtenidos del patrón de localización de la enzima antioxidante GPx4, la localización de las EOR y finalmente los resultados que muestran evidencia de la participación de las EOR en la migración celular que ocurre durante la epibolia, que es el primer movimiento morfogénico de la gastrulación en pez cebra.

5.1. Patrón de expresión temporal y espacial de GPx4 en el desarrollo embrionario.

5.1.1. Análisis de la expresión de los transcritos *gpx4a* y *gpx4b* durante el desarrollo embrionario.

La GPx4 es una proteína con actividad antioxidante que es indispensable para el desarrollo embrionario en mamíferos (Yant et al. 2003). Este hecho sugiere que los mecanismos antioxidantes encargados del balance redox son importantes durante el desarrollo embrionario.

Dada la relevancia biológica de la GPx4, uno de los objetivos del presente proyecto fue caracterizar los patrones de expresión y localización de la enzima antioxidante GPx4 que hasta el momento no estaban caracterizados durante el desarrollo embrionario. Aunque durante el trabajo de maestría (Mendieta-Serrano 2011) se habían realizado inmunotinciones para la localización de GPx4 aún no se contaba con evidencia de cuando y en donde se localizan los transcritos que codifican para esta proteína durante las primeras 24 horas de desarrollo.

En el pez cebra hay dos genes que codifican para la proteína GPx4, el *gpx4a* y el *gpx4b* (Thisse et al. 2003). Para caracterizar el patrón temporal de expresión de los transcritos *gpx4a* y *gpx4b* durante el desarrollo embrionario, se amplificaron por RT-PCR ambos transcritos en muestras de ARN total extraído de diferentes etapas del desarrollo. Las etapas que se analizaron representan eventos importantes en el desarrollo embrionario del pez cebra. Por ejemplo, las etapas de 16- a 32-células representan la herencia materna, que es un conjunto de moléculas, que incluyen ARNs y proteínas depositados por la madre en el ovocito; en las etapas de esfera a domo ya ocurrió la activación del genoma del embrión; durante las etapas de escudo y 70%-epibolia es cuando ocurre la gastulación y progresión de la epibolia; la etapa de primordio representa el término de la epibolia y 24 hpf se considera como el final del desarrollo embrionario temprano.

En la figura 1 se muestra la detección por RT-PCR e hibridación *in situ* de los ARN mensajeros *gpx4a* y *gpx4b* a lo largo del desarrollo. En el caso del transcrito *gpx4a* no se detectó expresión en las etapas de 16- a 32-células ni en esfera-domo (Fig. 1A). Lo cual sugiere que *gpx4a* está ausente en la herencia materna. En la etapa de escudo fue cuando se detectó el fragmento de PCR correspondiente a *gpx4a* y a partir de esta etapa en adelante se mantiene la expresión de *gpx4a* hasta las 24 hpf (Fig. 1A). En el caso de *gpx4b*, se detectó un producto de PCR en todas las etapas analizadas y a diferencia de *gpx4a*, el transcrito de *gpx4b* está presente en la herencia materna (Fig. 1A). Los productos de PCR de ambos genes, se clonaron y se secuenciaron para verificar la secuencia de cada producto de PCR amplificado correspondiera con los genes *gpx4a* y *gpx4b*. Una vez que se identificó en que etapas del desarrollo embrionario están presentes los transcritos *gpx4a* y *gpx4b*, se continuó con el análisis de la localización de *gpx4a* y *gpx4b* por hibridación *in situ*. Se decidió evaluar las etapas de 512-células, esfera, escudo, 18-somitas, 24 y 36 hpf. Estas dos últimas etapas se consideraron como un control ya que se conocía el patrón de expresión de *gpx4a* y *gpx4b* de acuerdo a lo reportado por Thisse y col. (Thisse et al. 2003). Como se muestra en la Fig. 1B, en la hibridación *in situ* no se detectó señal de la expresión de *gpx4a* durante las etapas de 512-células y esfera en comparación con los embriones incubados con la sonda antisentido, este resultado es consistente con los resultados obtenidos por RT-PCR (Fig. 1A).

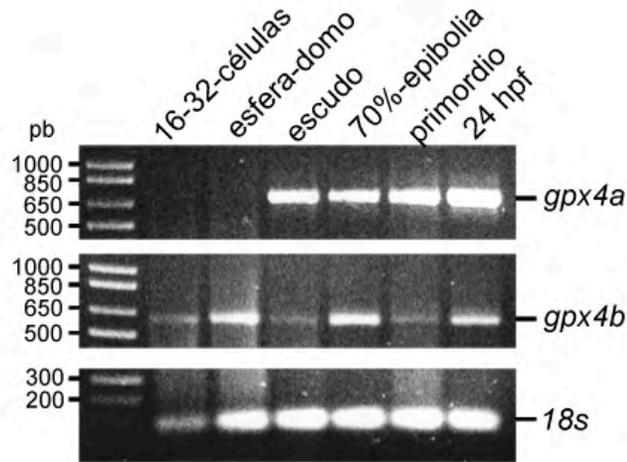
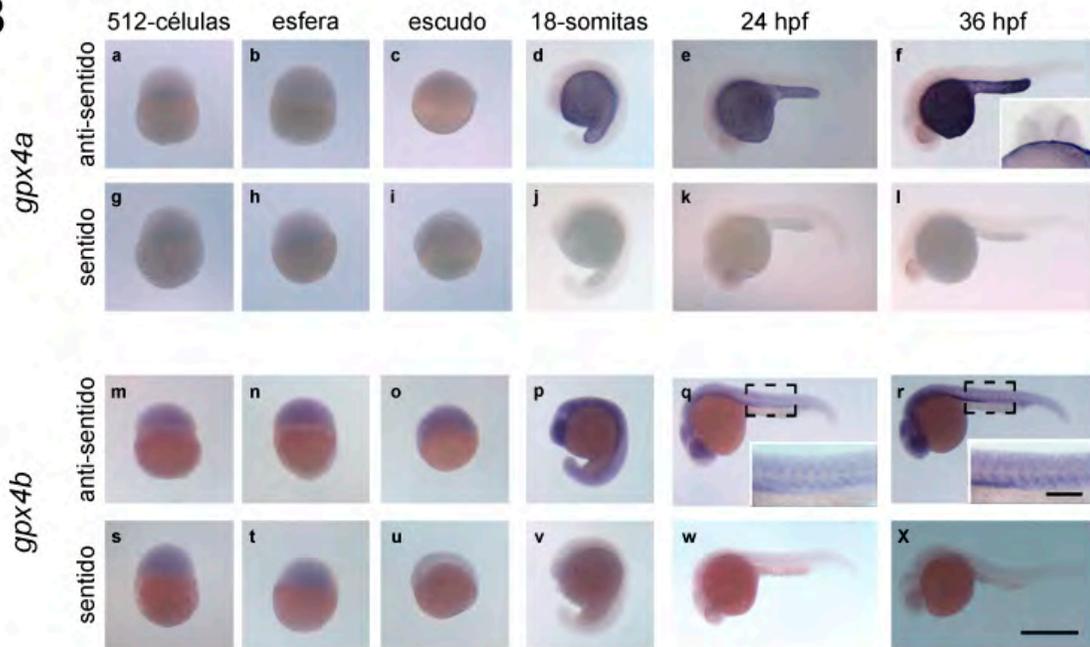
A**B**

Fig. 1. Patrón de expresión de los ARN mensajeros de *gpx4a* y *gpx4b* durante el desarrollo embrionario. (A) Análisis de expresión de *gpx4a* y *gpx4b* en diferentes etapas del desarrollo embrionario, 16- a 32-células, esfera a domo, escudo, 70%-epibolia, primordio, y 24 hpf. (B) Análisis de la expresión de *gpx4a* y *gpx4b* por hibridación *in situ* en las etapas de 512-células, esfera, escudo, 18-somitas, 24 hpf y 36 hpf. Las sondas sentido fueron incluidas en el análisis para mostrar la especificidad de la hibridación de la sonda anti sentido. Inserto en f, imágenes de embriones que se montaron en agarosa y se cortaron manualmente para mostrar que la señal de *gpx4a* se localiza en el peridermo que recubre al vitelo. Insertos en q y r, imágenes a mayor amplificación que muestran la localización de *gpx4b* en los miotomos. Barra de escala, 1 mm en todas las etapas y 250 μ m para los insertos.

Tampoco se detectó señal en la etapa de escudo, contrario a lo observado en el RT-PCR donde si se amplificó el fragmento de *gpx4a* (Fig. 1B; c, i). Esta discrepancia se puede deber a la diferencia de sensibilidad para la detección de los ARN mensajeros entre el RT-PCR y la hibridación *in situ*.

Más adelante en el desarrollo embrionario, a partir de la etapa de 18-somitas y a las 24 y 36 hpf se observó que *gpx4a* se expresa en el vitelo (Fig. 1B; d-f). Cabe señalar que aunque a primera vista la expresión de *gpx4a* se observa en el vitelo en estas etapas, un análisis a mayor detalle en cortes transversales de la región del vitelo mostraron que la expresión de *gpx4a* se localiza en las células del peridermo que recubre al vitelo y a la extensión del vitelo (Fig. 1B; inserto en f). En el caso de *gpx4b*, se observó que el mensajero se expresa de manera ubicua en el blastodermo de los embriones en las etapas analizadas y a las 24 y 36 hrs se detectó que la señal del mensajero se localiza principalmente en los miotómos (Fig. 1B; insertos en q, r).

5.1.2. Validación del anticuerpo anti GPx4 y análisis de la secuencias de GPx4 de humano y pez cebra.

En el presente trabajo se visualizó la localización de GPx4 (publicado en Mendieta-Serrano et al. 2015) usando un anticuerpo primario comercial que reconoce el carboxilo terminal de la proteína GPx4 humana (Schoenmakers et al. 2010; Huang et al. 2009). Este anticuerpo podría reconocer a las dos proteínas GPx4 (GPx4a y GPx4b) predichas en el pez cebra, ya que las secuencias de los epítopes de las proteínas de pez cebra presentan un porcentaje de identidad del 70% para GPx4a y 77% GPx4b en comparación con el epítipo de la GPx4 humana. Sin embargo, ya que el transcrito *gpx4b* se detectó en las células del blastodermo y que *gpx4a* se detectó en el peridermo que recubre al vitelo, se consideró que los patrones de la proteína GPx4 localizados en las células del embrión descritos en el presente trabajo corresponden principalmente a la localización de la proteína GPx4b, mientras que los patrones de localización en el peridermo que recubre al vitelo y a la extensión del vitelo a partir de la etapa de 14-somitas corresponden a la proteína GPx4a.

Además, en el análisis de las secuencias se encontró que la proteína GPx4b de pez cebra tiene una mayor homología con la GPx4 de humano. Ambas proteínas conservan características similares como el residuo de selenocisteína y un sitio potencial de

fosforilación (Fig. 2) que originalmente fue descrito en la proteína GPx4 humana (Esworthy et al 1994).

Previamente en la tesis de maestría (Mendieta-Serrano 2011) se presentó la detección de la GPx4 en el desarrollo embrionario de peces cebra por ensayos de inmunolocalización; sin que se evaluara la especificidad del anticuerpo. En el presente trabajo se confirmó la especificidad del anticuerpo anti-GPx4 por diferentes criterios. Primero se incubaron los embriones solo con el anticuerpo secundario y no se detectó señal positiva en los embriones que fueron visualizados con las mismas condiciones en que se adquirieron las imágenes donde se usó el anticuerpo anti-GPx4 (Fig. 3 y Fig. 4O). Este resultado indica que los patrones observados con el anticuerpo primario anti-GPx4 no se deben a una unión inespecífica del anticuerpo secundario utilizado.

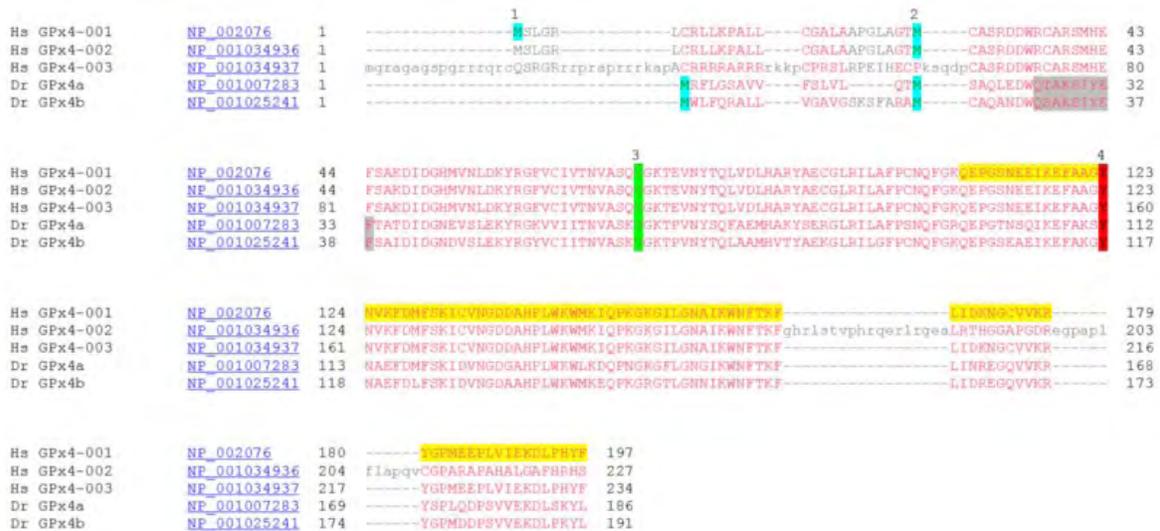


Fig. 2. Alineamiento de la secuencias de aminoácidos de GPx4 de las diferentes isoenzimas encontradas en humano y en pez cebra. 1, primer metionina. 2, segunda metionina. 3, selenocisteína. 4, sitio de fosforilación. La secuencia inmunogénica de aminoácidos esta resaltada en amarillo. Las señales potenciales de localización nuclear encontradas en GPx4a y b en pez cebra están resaltadas en fondo gris. Hs, *homo sapiens*; Dr, *danio rerio*.

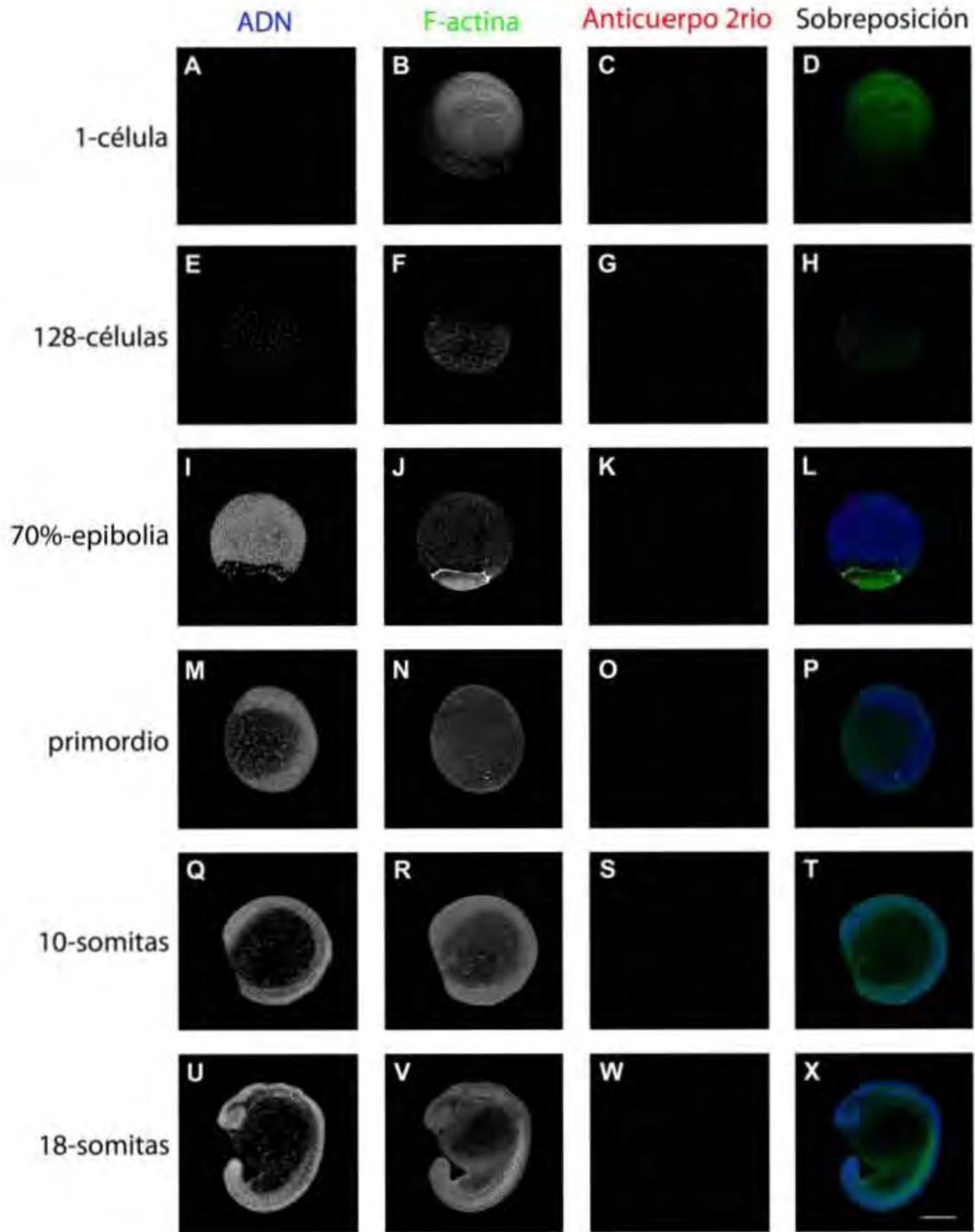


Fig. 3. Validación del anticuerpo secundario en embriones de pez cebra en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Los embriones fueron incubados en ausencia del anticuerpo anti GPx4 y sólo se incubaron con el anticuerpo secundario. Los embriones fueron visualizados con las mismas condiciones y durante las mismas sesiones de adquisición. Barra de escala 250 μ m.

Segundo, en lisados de proteínas totales de embriones en etapas de escudo y 21-somitas que fueron analizados por westernblot se detectó una sola banda de 21 kDa, la cual corresponde al tamaño esperado de las proteínas GPx4 de pez cebra (Fig. 4P). Para verificar que efectivamente la banda de 21 kDa detectada por westernblot correspondía a una o ambas proteínas GPx4 de pez cebra, adicionalmente se disminuyeron los niveles de las proteínas GPx4a y GPx4b por medio de la inyección de morfolinós. Se confirmó una disminución de los niveles de GPx4b en los embriones en la etapa de escudo que fueron inyectados con el morfolino *gpx4b*MO que hibrida contra la región alrededor del ATG del ARN mensajero de *gpx4b* (Fig. 4P, blot inferior). En cambio, cuando se inyectó el morfolino *gpx4a*MO que hibrida contra la región alrededor del ATG del ARN mensajero de *gpx4a*, no se observó una disminución de los niveles de GPx4 en extractos proteicos de embriones en la misma etapa de escudo (Fig. 4P, blot superior). En cambio, en la etapa de 21 somitas se observó una disminución de los niveles de GPx4 total en los embriones inyectados con el *gpx4a*MO (Fig. 4P, blot superior).

En conjunto los resultados obtenidos de la inyección de los morfolinós concuerdan con el patrón temporal y espacial de la expresión de los mRNA de *gpx4a* y *gpx4b* por RT-PCR e hibridación *in situ*; además indican que la proteína de 21 kDa detectada por westernblot corresponde a las proteínas GPx4a y GPx4b.

Aunque el objetivo principal de la inyección de los morfolinós fue para disminuir los niveles de GPx4a y GPx4b y así demostrar la especificidad del anticuerpo anti GPx4, fue interesante observar que la inyección de ambos morfolinós afectan el desarrollo embrionario. En el caso de las inyecciones con el *gpx4b*MO se observó que los embriones con pérdida parcial de GPx4b presentan arresto del desarrollo embrionario, no avanzan en el desarrollo más allá de la etapa de escudo (6 hpf) y eventualmente mueren (Fig. 5 y Video 1). Este fenotipo es similar al descrito en los embriones del ratón nulo para GPx4 que también se detienen en el desarrollo durante la gastrulación (Yant et al. 2003). Por otro lado, los embriones que fueron inyectados con el *gpx4a*MO avanzan más en el desarrollo en comparación con los inyectados con el *gpx4b*MO, lo cual concuerda con el patrón de expresión por hibridación *in situ*. Hay que señalar que estos resultados aún son preliminares, ya que se requiere realizar más repeticiones para caracterizar a mayor detalle

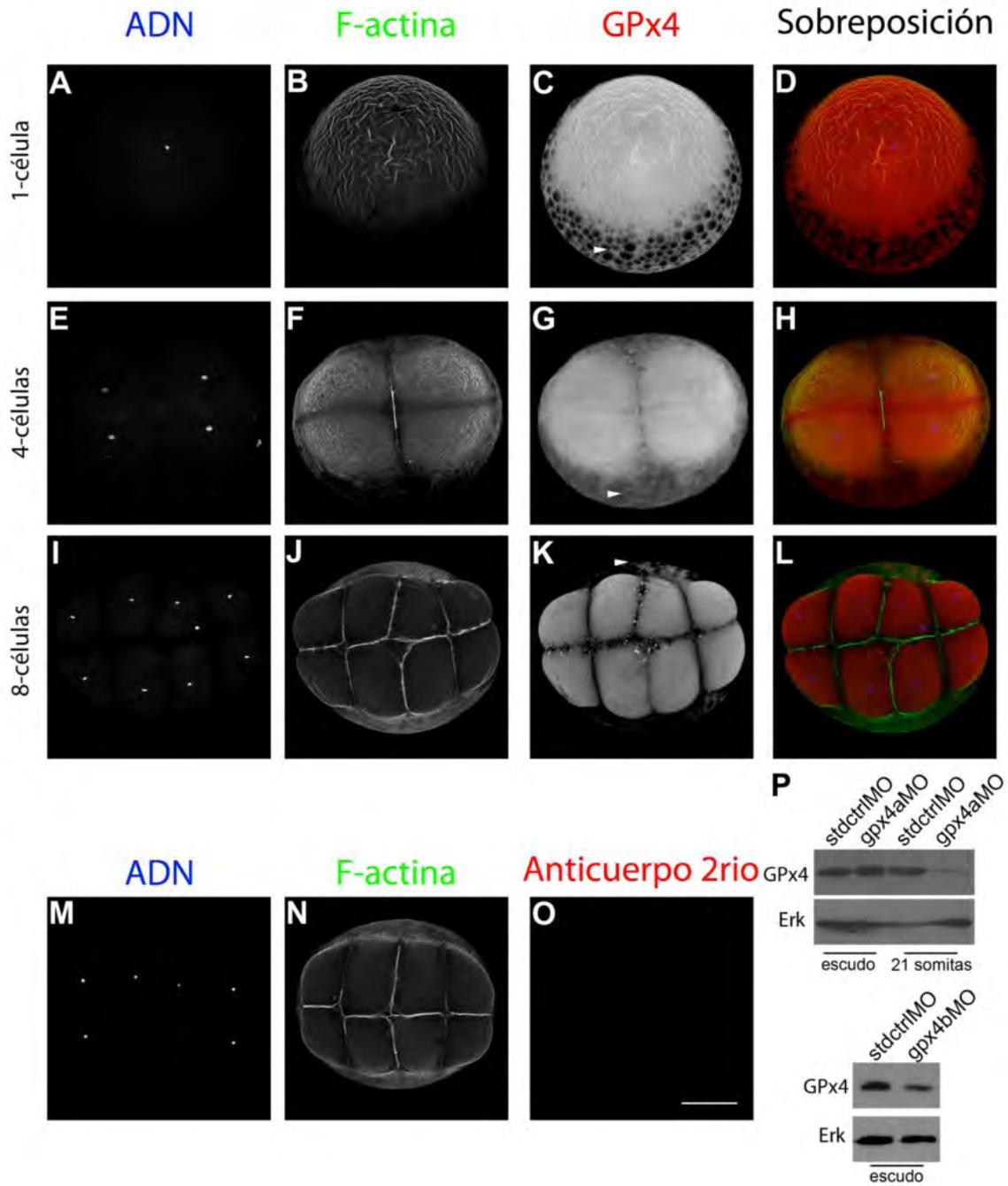


Fig. 4. Patrones de localización por inmunofluorescencia de GPx4 en embriones completos en las etapas de 1- a 8-células visualizados por microscopía confocal. (A, B, C, y D) 1-célula. (E, F G, y H) 4-células. (I, J, K y L) 8-células. (M, N y O) Embrión control en la etapa de 8-células, el cual no fue incubado con el anticuerpo primario y sólo se incubó en presencia del anticuerpo secundario. Los embriones se tiñieron con Hoechst para visualizar el DNA (A, E, I y M), con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (B, F, J y N). Inmunolocalización de GPx4 (C, G y K). Las cabezas de flecha en C, G y K indican la señal de GPx4 en el vitelo. Imágenes desde una vista del polo animal. Barra de escala 200 μ m. (P) Validación por westernblot del anticuerpo anti- GPx4 en extractos protéicos totales de embriones en la etapa de escudo y en la etapa de 21 somitas. Se observó que los niveles de GPx4a y GPx4b disminuyeron por la inyección de morfolinós. Los niveles de Erk total se presentan como control de carga.

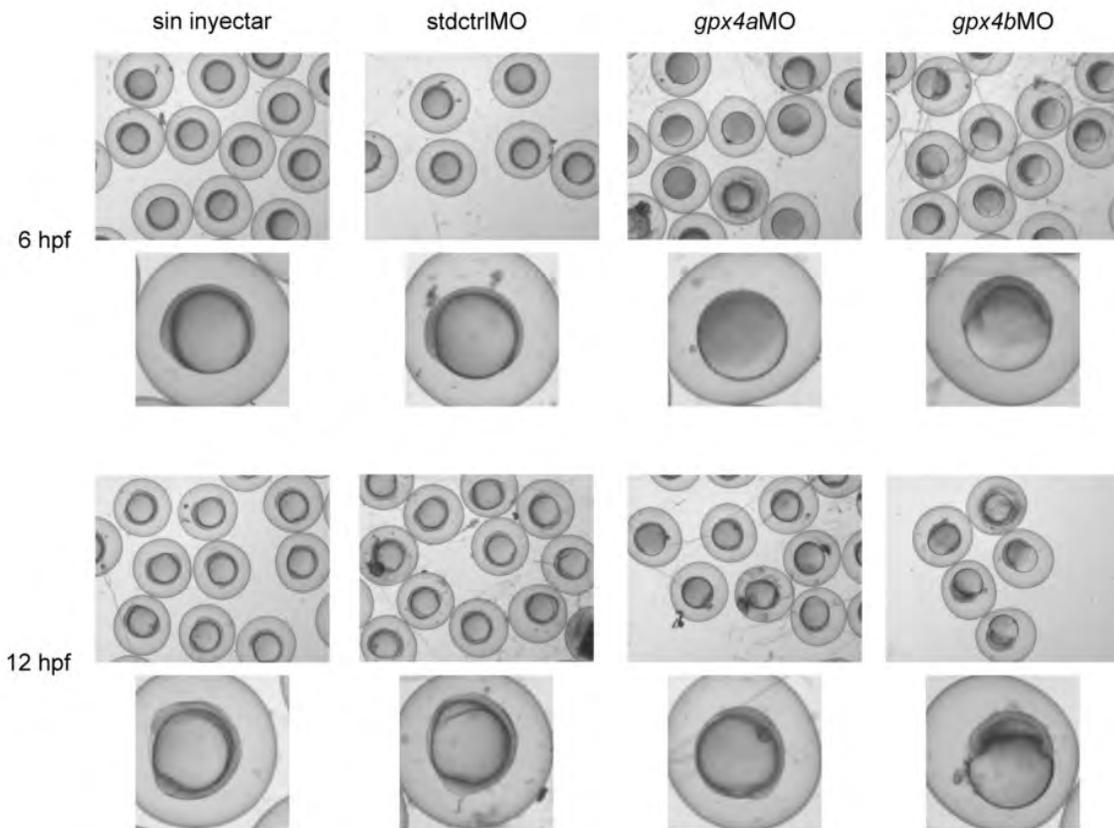


Fig. 5. Efecto de la pérdida de función parcial de GPx4a y GPx4b durante el desarrollo embrionario. Fenotipo de los embriones inyectados con 7.5 ng de *gpx4aMO1* o *gpx4bMO1* a las 6 y 12 horas post fertilización. Como control se inyectaron embriones con el *stdctrlMO* (que no hibrida con ningún ARN de pez cebra) o sin inyectar. La inyección del *gpx4bMO* afecta el desarrollo embrionario durante la gastrulación.

los fenotipos asociados a la disminución de las isoenzimas de GPx4 en el pez cebra. Sin embargo, a primera vista estos resultados sugieren que la proteína antioxidante GPx4b tiene un papel vital en el desarrollo embrionario del pez cebra y no puede ser compensado por la GPx4a o cualquier otra glutatión peroxidasa.

5.1.3. Localización de GPx4 en las primeras divisiones celulares del embrión.

Las primeras divisiones celulares del huevo recién fertilizado se caracterizan por ser rápidas y sincrónicas. Pero entre el noveno y décimo ciclo celular se pierde la sincronía en las divisiones celulares, se activa el genoma del embrión, se fusionan los blastómeros adyacentes al vitelo y se liberan núcleos al vitelo para formar el sincicio del vitelo (Kane y Kimmel 1993).

En los embriones fertilizados que ya formaron la primera célula, se observó que la proteína GPx4 se localiza en el primer blastómero del embrión y en el vitelo (Fig. 4C). Más adelante en los embriones donde ya ocurrieron dos divisiones celulares (etapa de 4-células) se observó que la GPx4 se mantiene localizada de manera homogénea en los blastómeros, sin embargo, en los surcos de división donde hay una mayor acumulación de actina polimerizada se detectó una menor acumulación de los niveles de GPx4 (Fig. 4G). Para analizar a mayor detalle esta observación, se realizó una medición de los niveles de la intensidad de fluorescencia de la señal tanto de GPx4 como de los filamentos de actina polimerizada, ya que la acumulación de actina en las primeras divisiones celulares se localiza en los surcos donde ocurre la citocinesis. Como se puede observar en el gráfico de la Fig. 6C, se observó una relación inversa en los niveles de actina polimerizada y GPx4. En el surco de división se detectó una señal alta que corresponde a la actina polimerizada (línea verde, Fig. 6C), en cambio, la señal correspondiente a la GPx4 disminuyó formando un valle en la zona central del surco de división que coincide con la región de actina polimerizada (línea roja, Fig. 6C). Esto sugiere que hay menor cantidad de GPx4 en los surcos donde ocurre la citocinesis. También se observó la presencia de GPx4 en el vitelo de los embriones en las etapas de 1-, 4- y 8-células (Fig. 4; C, G, K, cabezas de flecha), pero de manera gradual la señal de GPx4 se restringe a los blastómeros a partir de la etapa de 8-células y ya no se observa en el vitelo en etapas posteriores, lo cual sugiere que al igual que el ARN mensajero, la proteína GPx4 se deposita en el ovocito por la herencia materna.

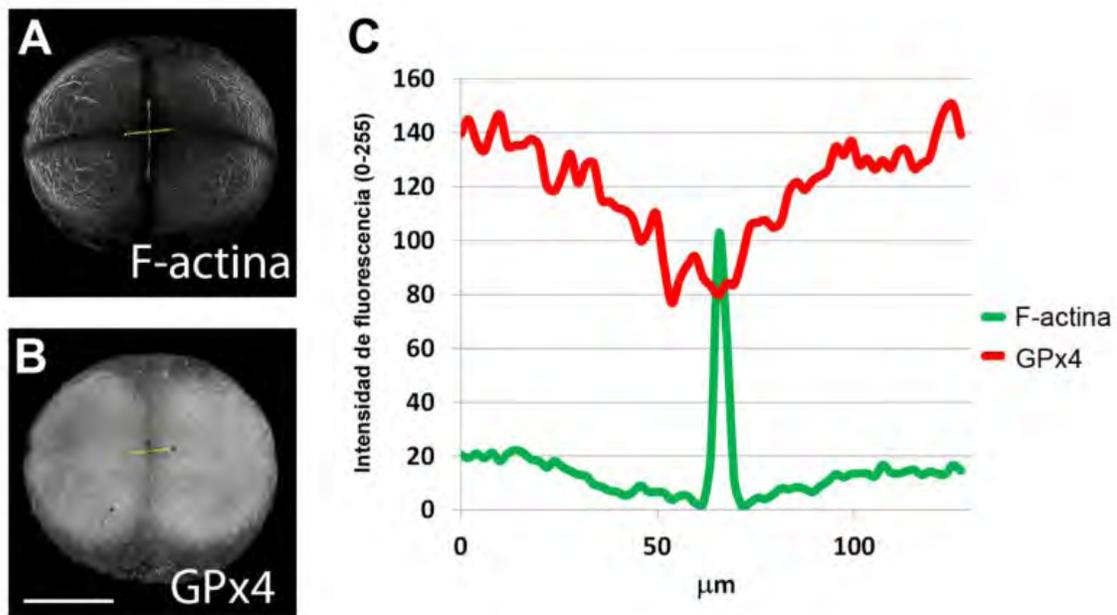


Fig. 6. La proteína GPx4 está localizada en los blastómeros y es menos abundante en el surco de división (B), que coincide donde hay una mayor acumulación de actina (A). La intensidad de fluorescencia fue determinada por los valores de gris a lo largo de la línea amarilla indicada. Los perfiles de intensidad de A y B fueron graficados en (C), la línea roja corresponde a la señal de GPx4 y la línea verde corresponde a la señal de la actina polimerizada.

En general, en los embriones en las etapas entre 128- a 512-células la GPx4 se encontró de manera uniforme en el citoplasma de los blastómeros, pero fue a partir de la etapa de 128-células que se detectó una acumulación de GPx4 en los núcleos de los blastómeros más marginales en comparación a los núcleos de las células más centrales del embrión (Fig. 7C, insertos 5 y 6). Posteriormente, en los embriones de las etapas de 256- y 512-células se observó que la proteína GPx4 presenta una localización nuclear en todos los blastómeros (Fig. 7G y K, insertos 13 y 21). En imágenes a mayor amplificación de los embriones en estas etapas se encontró que la localización nuclear de GPx4 ocurre preferencialmente en los núcleos que se encuentran en interfase (núcleos con forma redonda, Fig. 8 C y D) ya que durante la mitosis los cromosomas se condensan y la región adyacente no presenta acumulación de GPx4 (Fig. 8 A y B). Estas observaciones sugieren que la GPx4 se localiza inicialmente en el blastodermo de manera ubicua durante los primeros ciclos celulares del ovocito fertilizado y posteriormente a partir del séptimo ciclo celular en la etapa de 128-células, la GPx4 se comienza a enriquecer en los núcleos de los blastómeros marginales y después en el resto de los blastómeros.

Otro detalle que se observó fue que en los embriones en la etapa de 256-células, la GPx4 se localiza alrededor del borde de los blastómeros más marginales (Fig. 7G, inserto 14, cabezas de flecha). Hay que destacar que esta señal de la proteína GPx4 no se encuentra delimitada por la actina cortical de ningún blastómero, lo que indica que esta GPx4 en particular se localiza en el vitelo y no en los blastómeros. De la misma manera, en los embriones en la etapa de 512-células se observó GPx4 extracelular en el vitelo al igual que en la etapa de 256-células, con la diferencia de que en la etapa 512-células se puede observar que la zona donde se localiza la GPx4 extracelular rodea a los primeros núcleos del vitelo que se están formando durante esta etapa (Fig. 7K, inserto 22 y Fig. 7L, inserto 24; cabezas de flecha). Cabe señalar que los núcleos del vitelo no presentan una acumulación de GPx4 tan abundante en comparación con los núcleos de los blastómeros (Fig. 7L, inserto 24; flechas).

Ya que hasta el momento el presente trabajo es el único reporte que muestra la localización nuclear de GPx4 en embriones de pez cebra, se realizó un análisis *in silico* para verificar si las secuencias de aminoácidos de GPx4a y GPx4b presentan señales de localización nuclear. Para este análisis se utilizaron dos programas. Al analizar las secuencias de las

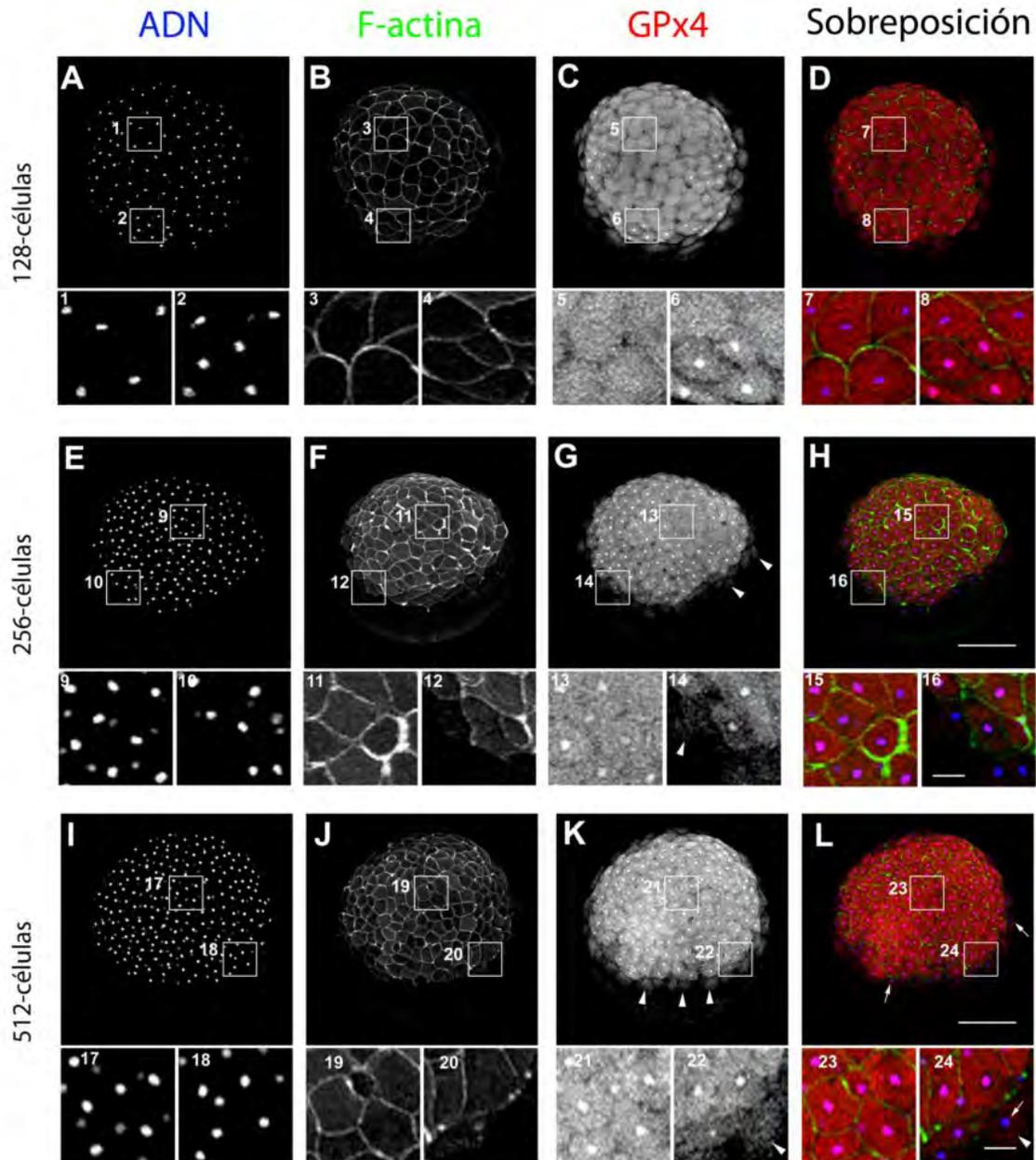


Fig. 7. Patrón de localización por inmunofluorescencia de GPx4 en embriones completos en las etapas de 128-, 256- y 512-células visualizados por microscopía confocal. (A, B, C, y D) 128-células, 1 al 8 muestran ampliificaciones de dos diferentes regiones que resaltan el inicio de la presencia de GPx4 nuclear. (E, F G, y H) 256-células, en esta etapa se observa la presencia de GPx4 en el vitelo (cabezas de flecha en G e inserto 14), 9 al 16 muestran ampliificaciones de dos regiones con blastómeros que presentan GPx4 nuclear (I, J, K y L) 512-células, 17 al 24 muestran ampliificaciones de las regiones centrales y marginales del embrión. GPx4 se localiza en los blastómeros (K), en el vitelo (cabezas de flecha en K y en los inserto 22 y 23) y en algunos núcleos del vitelo (flechas en L y en el inserto 24). Los embriones se tiñeron con Hoechst para visualizar el ADN (A, E y I), con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (B, F y J). Inmunolocalización de GPx4 (C, G y K). Imágenes desde una vista del polo animal. Barra de escala 200 μm , insertos barra de escala 50 μm .

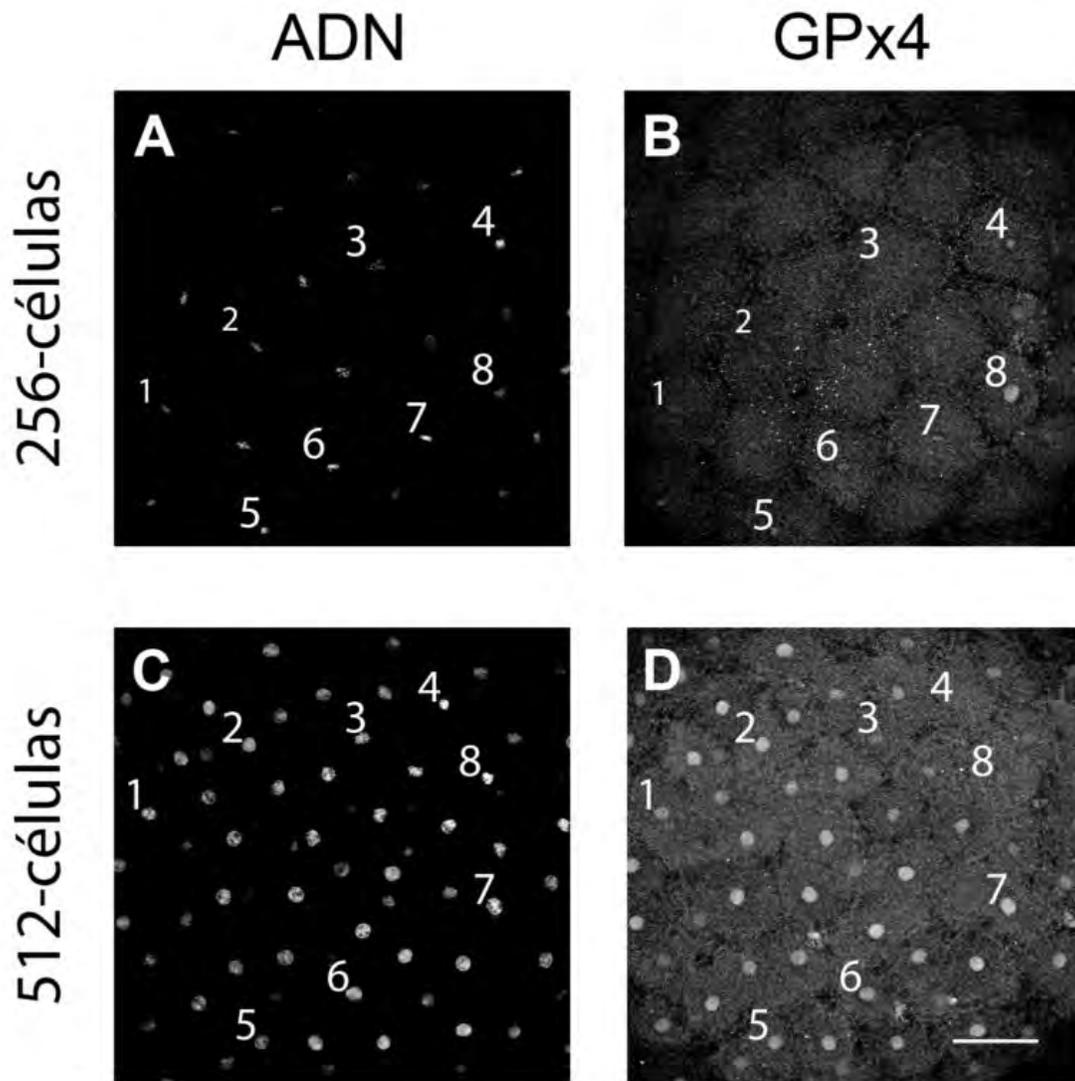


Fig. 8. Localización nuclear de GPx4. (B y D) Amplificaciones de la localización de GPx4 en embriones en las etapas de 256- y 512 células que se tiñeron con Hoescht (A y B) para analizar a mayor detalle los núcleos. La presencia de GPx4 nuclear coincide en los núcleos que presentan una forma redondeada que es típica de la interfase. Se numeran algunos de los núcleos para una mejor identificación. Barra de escala 60 μ m.

isoenzimas de GPx4 de pez cebra con el programa PSORT II (Naki 2000) no se detectó la presencia de señales de localización nuclear en la secuencias de las proteínas GPx4a o GPx4b de pez comparado con la proteína GPx4 humana derivada del transcrito variante 3 (NM_001039848.2) la cual contiene una señal de localización nuclear (SLN) entre los aminoácidos 21 al 47, que se detectó con una probabilidad de predicción de ser encontrada en el núcleo del 69.9%. De manera alternativa, se realizó un análisis similar con el programa SeqNLS (Lin y Hu 2013) y se identificó que las GPx4a y GPx4b contienen una SLN potencial entre los aminoácidos 25 al 33 y 30 al 38, los cuales corresponden a las secuencias QTAKSIYEF y QSAKSIYEF, respectivamente (Fig. 2). Estos datos indican que las proteínas GPx4 de pez cebra tienen en su secuencia una señal de localización nuclear y lo cual es congruente con la acumulación de la GPx4 en el núcleo partir de la etapa de 128-células.

5.1.4. Localización de GPx4 durante el período de gástrula.

Durante la gastrulación en animales como en el pez cebra, las células del embrión exhiben una variedad de movimientos de migración celular, como la epibolia, la involución, la convergencia y extensión (Warga y Kimmel 1990). Estos movimientos celulares contribuyen a la generación de las capas germinales que posteriormente formarán los tejidos del organismo adulto. En la gastrulación de pez cebra, se observó que en las etapas de escudo, 70%-epibolia y primordio, la GPx4 se localiza de manera ubicua en las células del blastodermo mientras que en el vitelo no se detectó la señal de GPx4 (Fig. 9).

Estas observaciones en conjunto con los resultados de la hibridación *in situ* indican que la señal detectada en el blastodermo durante estas etapas corresponde a la proteína GPx4b.

En la etapa de primordio se detectó una menor acumulación de la GPx4b en la zona de evacuación en comparación con la región más dorsal del embrión (Fig. 9K, asterisco). La zona de evacuación exhibe una menor densidad celular y se forma como consecuencia del movimiento de convergencia de las células hacia la región dorsal del embrión. La disminución de la GPx4b observada en la zona de evacuación puede deberse principalmente a la disminución de la densidad de células profundas en esta región del embrión.

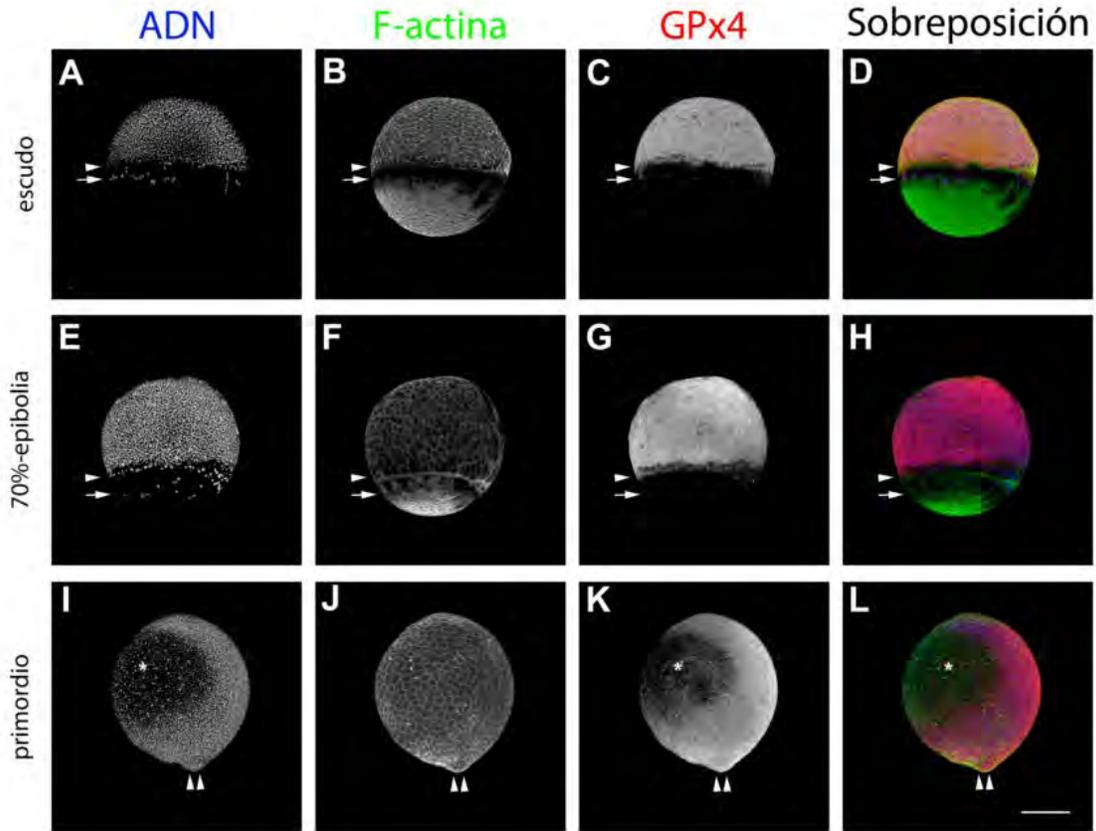


Fig. 9. Patrón de localización por inmunofluorescencia de GPx4 en embriones completos en las etapas de escudo, 70%-epibolia y primordio visualizados por microscopía confocal. (A, B, C, y D) escudo. (E, F G, y H) 70%-epibolia. (I, J, K y L) primordio. Los embriones se tiñeron con Hoechst para visualizar el DNA (A, E y D), con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (B, F y J). Inmunolocalización de GPx4 (C, G y K). Imágenes laterales. El lado dorsal esta a la derecha. Las cabezas de flecha indican el frente de migración por epibolia de la capa envolvente. Las flechas indican la posición de los núcleos del vitelo en el frente de migración por epibolia. Las dos cabezas de flecha indican la posición del primordio de la cola. El asterisco en I, K y L indica la zona de evacuación. Barra de escala 250 μ m.

5.1.5. Localización de GPx4a y GPx4b durante la somitogénesis y a las 24 horas de desarrollo embrionario.

Durante el período de formación de las somitas se observó que la GPx4 se mantiene localizada de manera ubicua en las células del embrión (Fig. 10). Sin embargo, en las etapas de 5-, 14- y 18-somitas se detectó un incremento de la señal de GPx4 en el vitelo (Fig. 10C) y en la extensión del vitelo (Fig. 10, G y K; asteriscos). Esta observación de la proteína se relaciona con el incremento de la señal en el vitelo del mensajero de *gpx4a* en la hibridación *in situ* (Fig. 1B). Estos datos sugieren que la señal detectada en la inmunolocalización de GPx4 en el vitelo durante estas etapas corresponde a la GPx4a.

Más tarde en el desarrollo, a las 24 hpf, en los embriones en la etapa de 21-somitas se encontró que la GPx4b se localiza en los miotomos y a lo largo del miosepto horizontal (Fig. 11C, cabeza de flecha). Es importante destacar que el patrón de localización de la proteína GPx4b a las 24 hpf coincide con la localización del transcrito de *gpx4b* que también se observó en los miotomos (Fig. 1B, q). También se observó que en embriones de la misma etapa de 21-somitas pero ligeramente más avanzados, la GPx4b disminuyó su acumulación en los miotomos y ya no se detectó GPx4b en el miosepto longitudinal (Fig. 11F). Para analizar a mayor detalle la localización de GPx4b en los miotomos, estas estructuras embrionarias se visualizaron a mayor amplificación usando tinciones para visualizar los núcleos y los filamentos de actina polimerizada (Fig. 12, panel 1). Se encontró que la señal positiva de GPx4b detectada en los miotomos (Fig. 12G) corresponde a las fibras musculares lentas y no a las fibras musculares rápidas. La localización de GPx4b se determinó de acuerdo a la ubicación y morfología de las fibras en el miotomo (Stickney, Barresi, y Devoto 2000), las fibras lentas se encuentran en la superficie del miotomo a una profundidad entre 5 y 8 micras (Fig. 12, F y M2); mientras que las fibras musculares rápidas se localizan más profundo en el tejido del miotomo a una profundidad entre 10 y 25 micras (Fig. 12, J y M3). Otro criterio para determinar la localización de GPx4 entre ambas fibras musculares fue la morfología, que se puede visualizar por la tinción de actina polimerizada. Las fibras musculares lentas son gruesas y tiene un arreglo longitudinal paralelo al eje antero-posterior del embrión (Fig. 12F) y en el caso de las fibras musculares rápidas son más delgadas y presentan un arreglo inclinado (Fig. 12J).

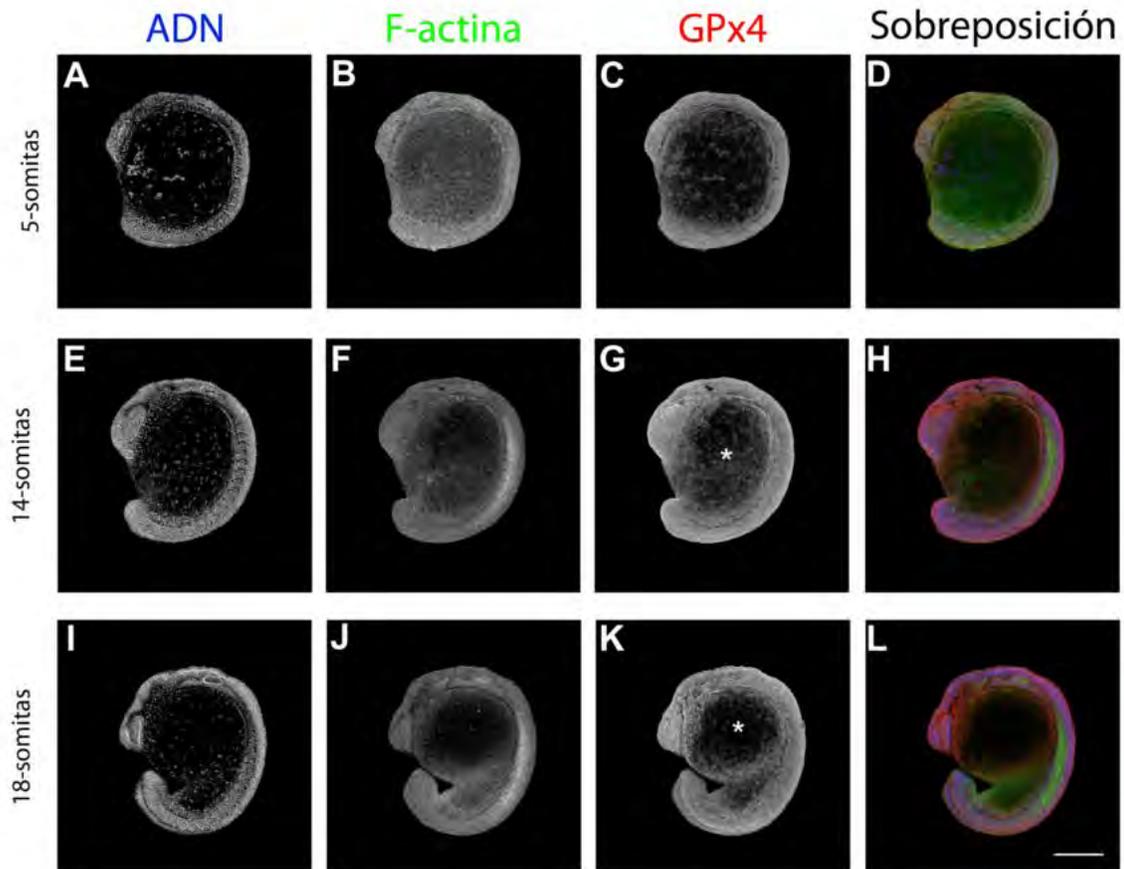


Fig. 10. Patrón de localización por inmunofluorescencia de GPx4 en embriones completos en diferentes etapas durante la somitogénesis visualizados por microscopía confocal. **(A, B, C, y D)** 5-somitas. **(E, F G, y H)** 14-somitas. **(I, J, K y L)** 18-somitas. Los embriones se tiñieron con Hoechst para visualizar el DNA (A, E y I), con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (B, F y J). Inmunolocalización de GPx4 (C, G y K). Imágenes laterales. El lado dorsal esta a la derecha. El asterisco indican la detección de GPx4 en el vitelo. Barra de escala 250 μ m.



Fig. 11. Patrón de localización por inmunofluorescencia de GPx4 en embriones completos a las 24 hpf visualizados por microscopía confocal. Los embriones se tiñeron con Hoechst para visualizar el DNA (A y D), con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (B y E). Inmunolocalización de GPx4 (C y F). En los embriones a las 24 horas de desarrollo (A, B y C) la GPx4 se localiza en los miotomos, en el miosepto longitudinal (cabeza de flecha en C). En los embriones a las 24 hrs y en los embriones en etapas un poco más avanzadas (D, E y F, la extensión del vitelo esta más extendida y delgada en comparación con los embriones más jóvenes) se observa la presencia de GPx4 en el vitelo (asterisco en C) y en la extensión del vitelo (doble asterisco en C) que correspondería a la isoforma GPx4a. En los embriones más avanzados la inmunolocalización de GPx4 se mantiene en los miotomos pero ya no se detecta en el miosepto longitudinal (F). Barra de escala 500 μ m.

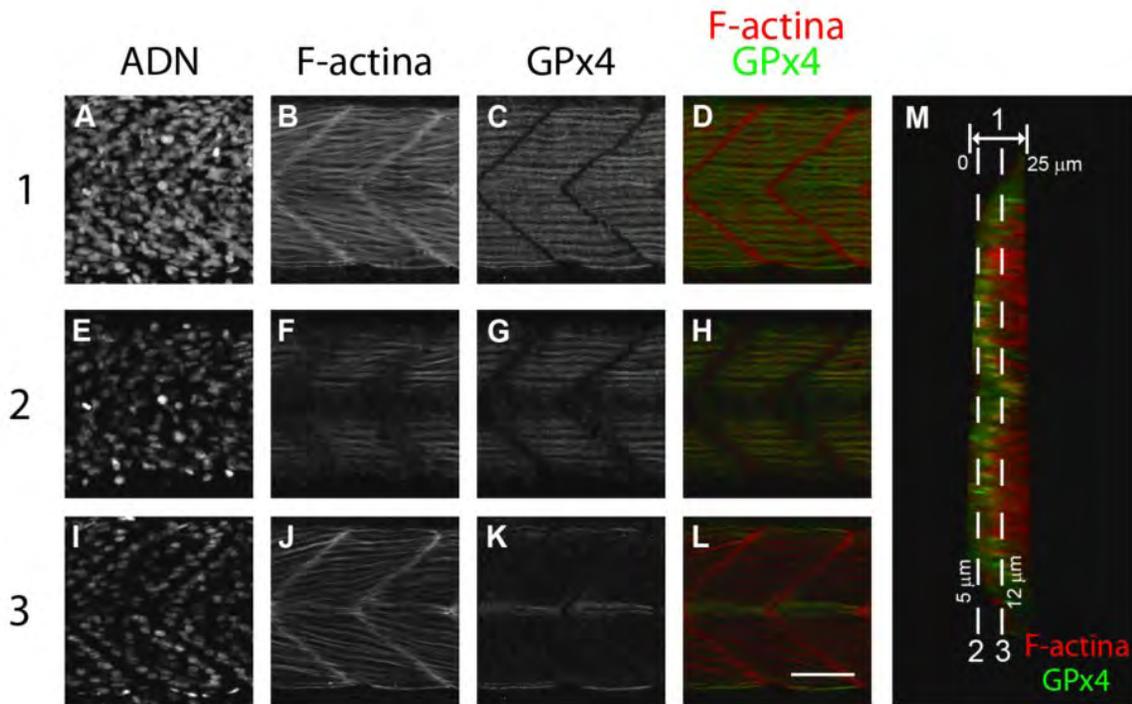


Fig. 12. GPx4b se localiza en las fibras musculares lentas en los miotomos de embriones a las 24 hpf. Para identificar a mayor detalle la localización de GPx4b en el tejido del miotomo, se generaron diferentes proyecciones de máxima intensidad a partir de la serie de cortes ópticos obtenidos por microscopía confocal. **(1)** A-D, proyección de máxima intensidad de la serie de corte ópticos completa que representa $\sim 25 \mu\text{m}$ de profundidad en el tejido. **(2)** E-H, proyección de máxima intensidad parcial de los cortes ópticos localizados entre la superficie y $5 \mu\text{m}$ de profundidad en el tejido, en esta proyección se muestra que las fibras musculares lentas se localizan en la región más superficial del miotomo. La inmunolocalización de GPx4b es intensa en los fibras musculares lentas (G). **(3)** I-L, proyección de máxima intensidad parcial de los cortes ópticos localizados entre 12 y $25 \mu\text{m}$ de profundidad en el tejido, a $12 \mu\text{m}$ se observan las fibras musculares rápidas y una disminución en la señal de GPx4b en esta región (K). Los embriones se tiñieron con Hoechst para visualizar el DNA (A, E y I), con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (B, F y J). Inmunolocalización de GPx4b (C, G y K). Sobreposición de actina y GPx4b (D, H, L y M), corte ortogonal. Barra de escala $50 \mu\text{m}$.

5.2. Patrón de localización de EOR durante el desarrollo embrionario.

5.2.1. Identificación de especies de oxígeno reactivas durante el desarrollo embrionario.

Se ha descrito que las EOR participan en la regulación de diferentes procesos celulares como la muerte, proliferación, diferenciación y la migración celular (Covarrubias et al. 2008b). Sin embargo, hasta el momento no se ha llevado a cabo un análisis de los patrones de localización de las EOR en embriones completos durante el desarrollo embrionario y mucho menos algún estudio que muestre evidencia experimental relacionada a la participación de las EOR en procesos importantes del desarrollo de vertebrados como por ejemplo la gastrulación.

Para analizar las regiones de formación de especies de oxígeno reactivas (EOR) a lo largo del desarrollo embrionario se utilizó un reactivo sensible a EOR, el clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA). El CM-H2DCFDA es una molécula no fluorescente que al interactuar con EOR se oxida para dar lugar al DCF el cual es una molécula fluorescente. Previamente durante el trabajo de maestría (Mendieta-Serrano 2011) se realizaron ensayos preliminares de la tinción de embriones completos de pez cebra con CM-H2DCFDA, sin embargo en ese trabajo sólo se visualizaron los patrones de EOR por microscopía de epifluorescencia y de manera paralela se inició con la estandarización de las condiciones de montaje y adquisición de las imágenes por microscopía confocal para la visualización de embriones vivos teñidos con CM-H2DCFDA. Para estos primeros ensayos sólo se analizaron embriones en la etapa de 24 hpf y en ese momento no se visualizaron embriones en etapas más tempranas debido a la fragilidad y sensibilidad de los embriones.

En el presente trabajo se mejoró el protocolo de montaje de los embriones teñidos con CM-H2DCFDA y se logró analizar el desarrollo temprano incluyendo las primeras divisiones celulares. Además con esta metodología se realizaron series de tiempo por microscopía confocal para la visualización y análisis a detalle de la dinámica espacio temporal de la formación de EOR durante el desarrollo embrionario.

A continuación se hará una descripción de los hallazgos principales relacionados con los patrones de formación de EOR enfocándose a las observaciones realizadas durante la primeras divisiones celulares y la progresión de la epibolia.

5.2.2. Localización de la señal de DCF durante las primeras divisiones celulares.

En los embriones de las etapas de 4-, 8- y 16-células que se incubaron con CM-H2DCFDA, se observó una acumulación de DCF que coincide con los surcos de división celular durante la citocinesis de los blastómeros (Fig. 13; A y B). De igual manera, a partir de la etapa de 64- a 128-células también se observó que la señal coincide con los surcos de división celular y con el espacio extracelular (Fig. 13, C y D). En este espacio extracelular, que se forma entre los blastómeros se observó que la señal de DCF no es homogénea y es más intensa en los espacios más centrales del polo animal (Fig. 13C).

Al finalizar las sesiones de adquisición de las imágenes de los embriones de 4-células y en etapas posteriores se observó que los patrones de distribución de la señal de DCF cambiaban en los embriones analizados, esto podría indicar que los patrones de EOR visualizados de manera indirecta por la presencia de la señal fluorescente del DCF eran dinámicos durante el desarrollo embrionario (video 2). Con el objetivo de analizar a más detalle como ocurre la dinámica espacio-temporal de los patrones de EOR, se adquirieron y analizaron series de tiempo por microscopía confocal durante las primeras divisiones celulares del embrión. Estas series de tiempo mostraron que los patrones de DCF en los embriones son dinámicos y parecen estar coordinados con la divisiones celulares de los blastómeros (Fig. 14, A y B, video 3 y 4). Cuando se analizaron los embriones en la etapa de 128-células (aproximadamente) se observaron cambios en la distribución de la señal del DCF que semejan tener el patrón de una pseudo oleada que inicia en la parte más animal del embrión y se mueve en dirección vegetal (Fig. 14B, video 4).

Para caracterizar la dinámica de pseudo oleadas de la señal del DCF observadas desde la etapa de 128-células (aproximadamente), se realizó un análisis de “particle image velocimetry” (PIV) (Yi et al. 2011). De manera general, el análisis de PIV permite analizar y cuantificar la magnitud y dirección del movimiento de objetos en una serie de imágenes a lo largo de una ventana de tiempo. Con este análisis se identificó una serie de movimientos periódicos que consta de tres oscilaciones (Fig. 14D). Estos tres movimientos periódicos

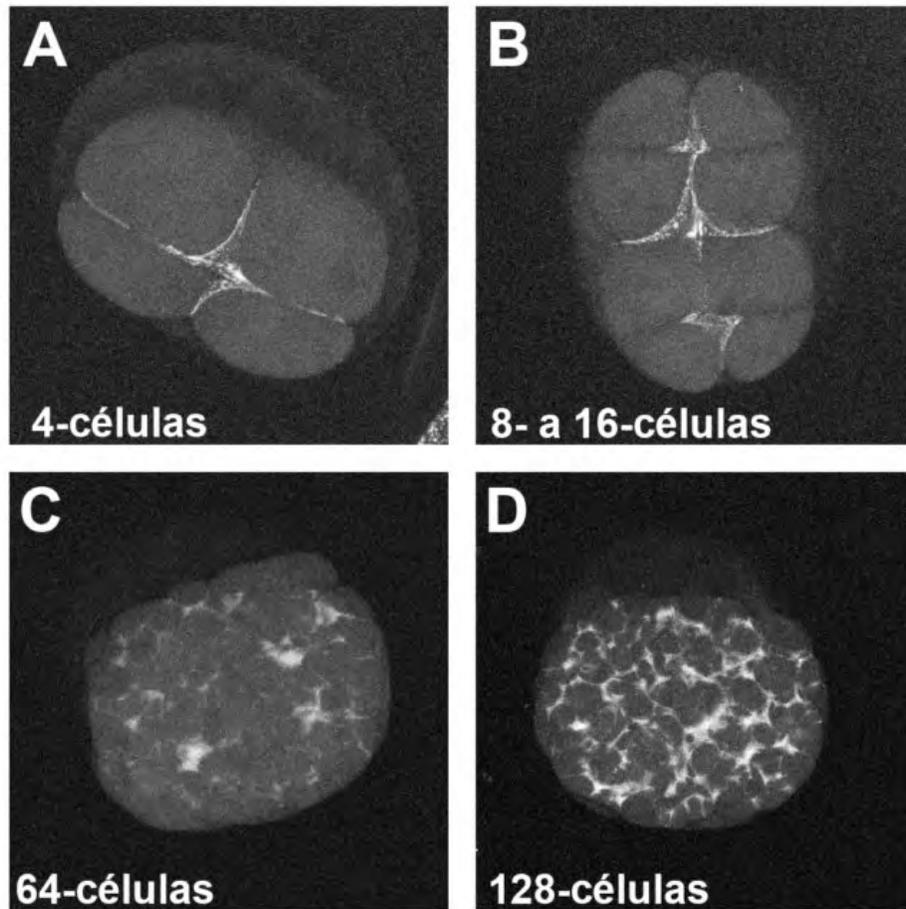


Fig. 13. Patrones de localización de la señal de DCF en embriones completos durante las primeras divisiones celulares. Embriones visualizados por microscopía confocal. (A) 4-células, (B) 8- a 16-células, (C) 64-células, (D) 128-células. Imágenes del polo animal. Barra de escala, 200 μm .

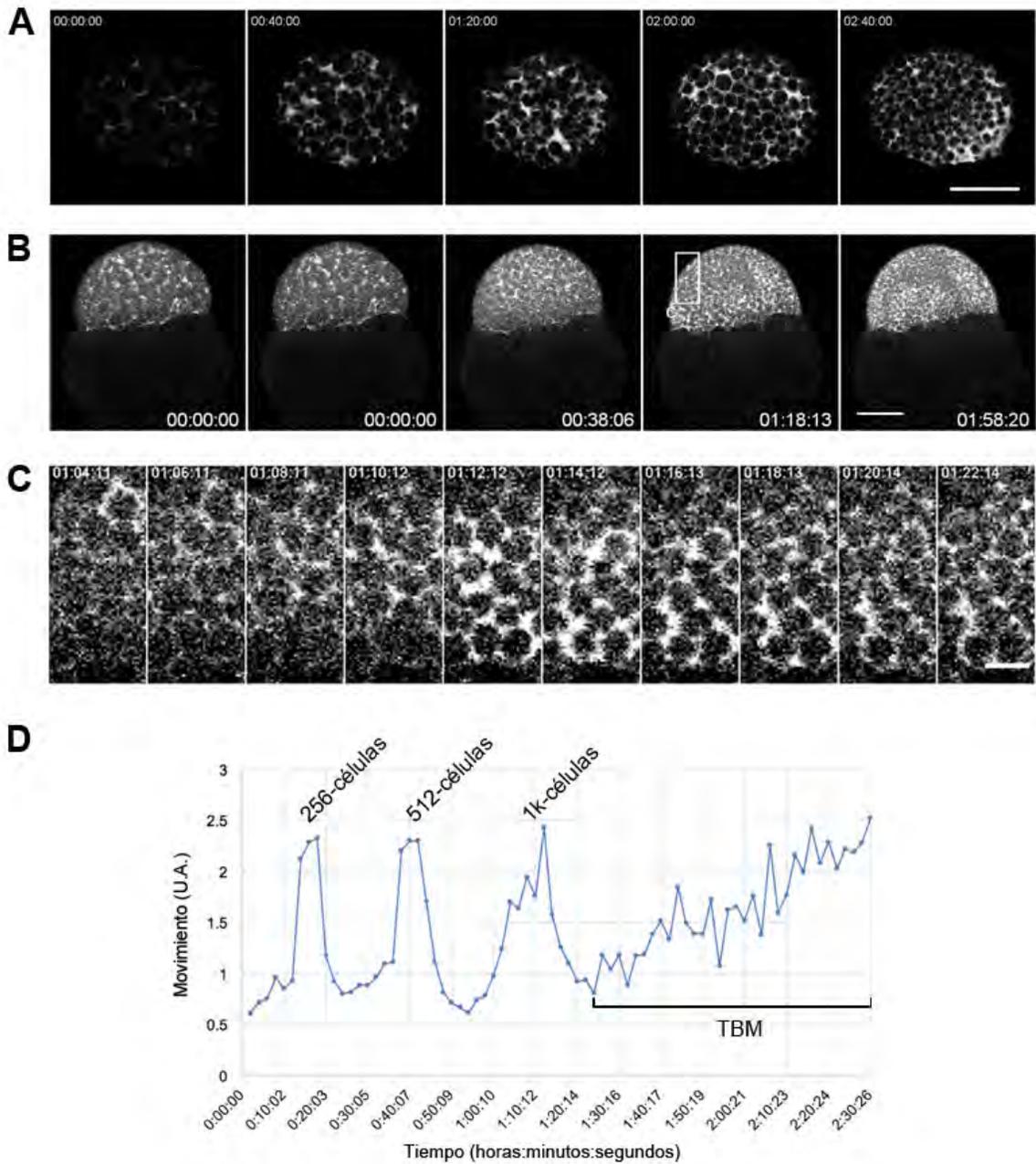


Fig. 14. Patrones de localización de la señal de DCF en embriones completos en el período de blástula visualizados por microscopía confocal. **(A)** imágenes a diferentes tiempos que muestran como cambia el patrón de distribución de la señal de DCF durante las divisiones de los blastómeros. **(B)** imágenes seleccionadas de una serie de tiempo desde una vista lateral. **(C)** imágenes correspondientes a la tercera pseudo oleada (1k-células, en D) **(D)** gráfica que representa el patrón oscilatorio de la señal fluorescente del DCF de la serie de tiempo presentada en B y en el video 4. Transición de la blástula media, TBM. Barra de escala, A y B, 200 μ m; C, 50 μ m.

coinciden con las tres pseudo oleadas que se observan a simple vista en el video 4. A partir de la tercera pseudo oleada no se detectaron más movimientos periódicos y lo que se observa son movimientos aleatorios (Fig. 14D). Esta reportado que en los embriones de pez cebra, las primeras divisiones celulares de los blastómeros ocurren en forma de pseudo oleadas sincrónicas, y es partir del ciclo 10 cuando se pierde esta sincronía y las divisiones se vuelven asincrónicas (Keller et al. 2008; Mendieta-Serrano et al. 2013; Olivier et al. 2010). Si se compara la dinámica de las pseudo oleadas de la señal del DCF con la dinámica de la división celular reportada en los trabajos de Keller et al. y Olivier et al. (Keller et al. 2008; Olivier et al. 2010), lo que se puede observar es que las tres pseudo oleadas de la señal del DCF podrían corresponder a las tres últimas divisiones sincrónicas, cuando los embriones pasan de las etapas de 128- a 256-células, 256- a 512-células y de 512- a 1000-células.

Dadas la características del patrón oscilatorio en forma de pseudo oledas tanto de la señal de DCF como de las divisiones celulares, cabe la posibilidad de que la dinámica de la señal de DCF este correlacionada con la progresión del ciclo celular. Hasta el momento estos resultados son preliminares, por lo que falta realizar experimentos en los que se analice de manera conjunta la dinámica de las divisiones celulares y de la señal de DCF para corroborar si existe correlación entre ambas dinámicas.

5.2.3. Patrón de localización de la tinción de DCF durante la gastrulación.

La gastrulación del pez cebra comprende varios tipos de movimientos celulares de los cuales el primero que ocurre es el movimiento de epibolia. Este movimiento provoca que el blastodermo se adelgace y migre sobre el vitelo recubriéndolo en dirección animal-vegetal (Warga y Kimmel 1990). En los embriones que se tiñieron con CM-H2DCFDA durante la progresión de la epibolia, se observó que la tinción de DCF en el blastodermo presenta un patrón similar al de una red intersticial interconectada que presenta regiones sin tinción de DCF, que parecen ser las células del blastodermo (Fig. 15B). Además, hay que destacar que en los embriones analizados durante la progresión de la epibolia se observó un anillo de tinción intensa de DCF que se localiza muy cerca del frente de migración (Fig. 15, D-I).

Durante la progresión de la epibolia los márgenes de la capa de las células profundas, la capa envolvente y los núcleos del vitelo se mueven en dirección vegetal siguiendo el

movimiento de epibolia. Para analizar si el anillo de DCF tenía correlación con el movimiento de epibolia se adquirieron series de tiempo de embriones teñidos con CM-H2DCFDA durante la progresión de la epibolia. En los videos 5 y 6 se observó que el anillo de DCF avanza en dirección vegetal liderando el frente de migración y se mantiene presente hasta el final de la epibolia (Fig. 15, cabezas de flecha y videos 5 y 6).

Tomando en cuenta las observaciones de los patrones dinámicos de DCF durante la epibolia se tomó la decisión de que el presente trabajo se enfocara en caracterizar si el patrón de DCF observado en la epibolia tenía alguna relevancia biológica. Para resolver esta pregunta se realizaron experimentos enfocados a dos aspectos: 1) caracterizar a detalle la localización del DCF y la posible fuente responsable de la formación EOR tanto en el blastodermo como en el frente de migración. 2) evaluar la especificidad del colorante CM-H2DCFDA para reconocer EOR. En las siguientes secciones se presentan los resultados de los experimentos relacionados con los dos aspectos mencionados anteriormente.

5.2.4. Los patrones de tinción de DCF son dinámicos en el espacio intersticial y en el frente de migración durante la epibolia.

Una estrategia para tratar de entender la relevancia biológica de los patrones de DCF es identificar las posibles fuentes de formación de EOR. A nivel celular está reportado que una fuente importante de EOR son las mitocondrias (Holmström y Finkel 2014). En particular en los embriones de pez cebra se ha reportado la presencia de mitocondrias activas durante la epibolia y además forman un anillo en el frente de migración (Popgeorgiev et al., 2011). Tomando en cuenta esta evidencia, se consideró que el cinturón de mitocondrias activas podría ser una de las fuentes responsables de la formación de EOR en el cinturón de DCF que se detectó durante la progresión de la epibolia. Para analizar la coincidencia del cinturón de DCF y de mitocondrias activas, los embriones se tiñeron simultáneamente con CM-H2DCFDA y con MitoTracker, un colorante que ha sido utilizado ampliamente para la detección de mitocondrias en muestras vivas (Popgeorgiev et al. 2011). Se encontró que las señales de los cinturones de DCF y de mitocondrias activas se localizan en el frente de migración y ambas señales se desplazan durante la progresión del movimiento de epibolia (Fig. 16, A y B; video 7) Sin embargo, las dos señales no colocalizan, ya que la señal del cinturón de mitocondrias activas siempre se detectó más avanzado con respecto al cinturón de DCF (Fig. 16H).

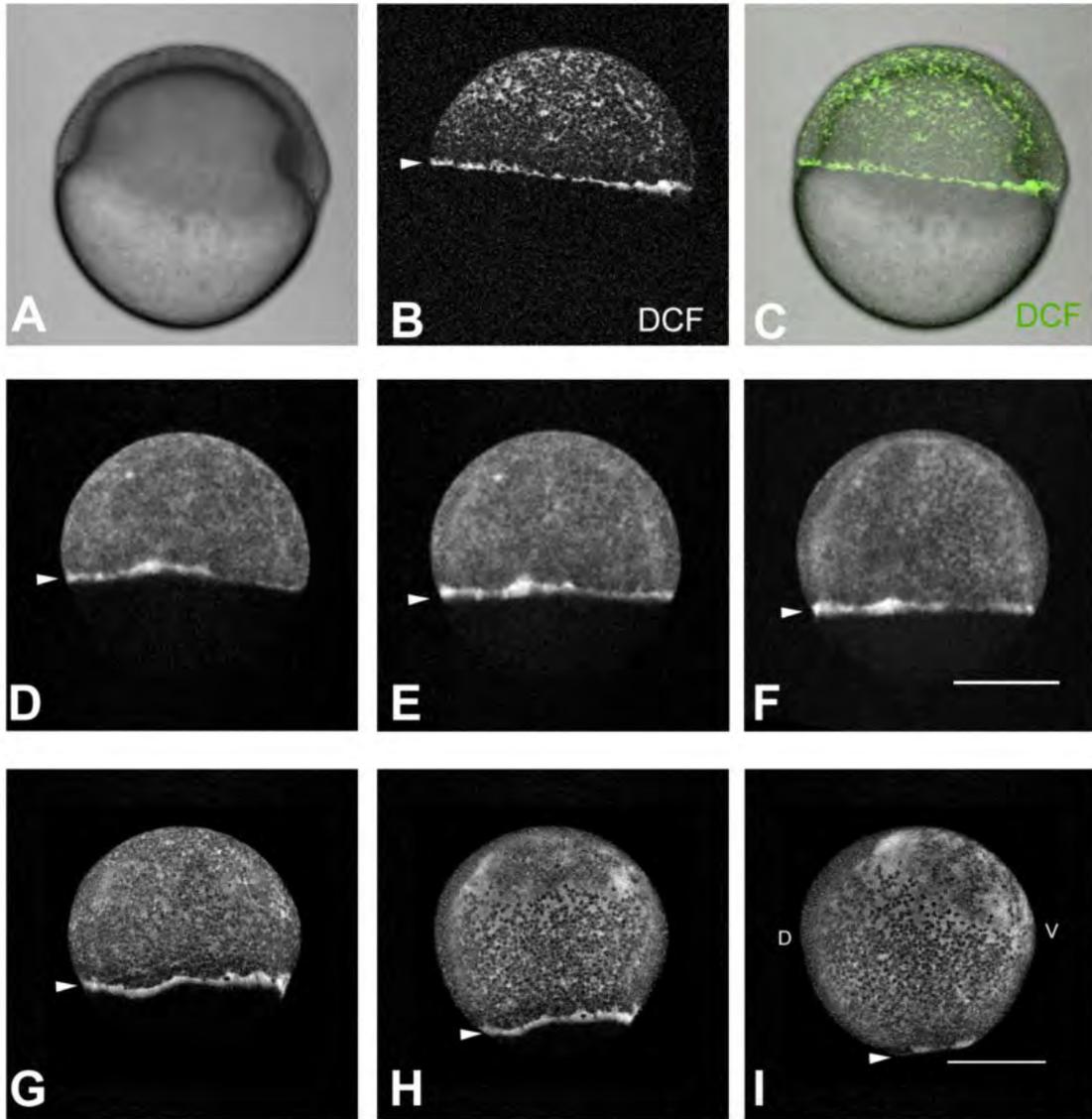


Fig. 15. Patrones de localización de la señal de DCF durante la progresión de la epibolia. (A-C) embrión en etapa de escudo. A, campo claro; B, DCF; C, sobreposición de A y B. (D-I) imágenes de la dinámica de la señal de DCF a lo largo de la progresión de la epibolia. Las cabezas de flecha indican la posición del cinturón de DCF al borde del frente de migración por epibolia. Las imágenes en D-F y G-I provienen de dos embriones distintos. Se muestran vistas laterales de los embriones. Barra de escala, 300 μ m.

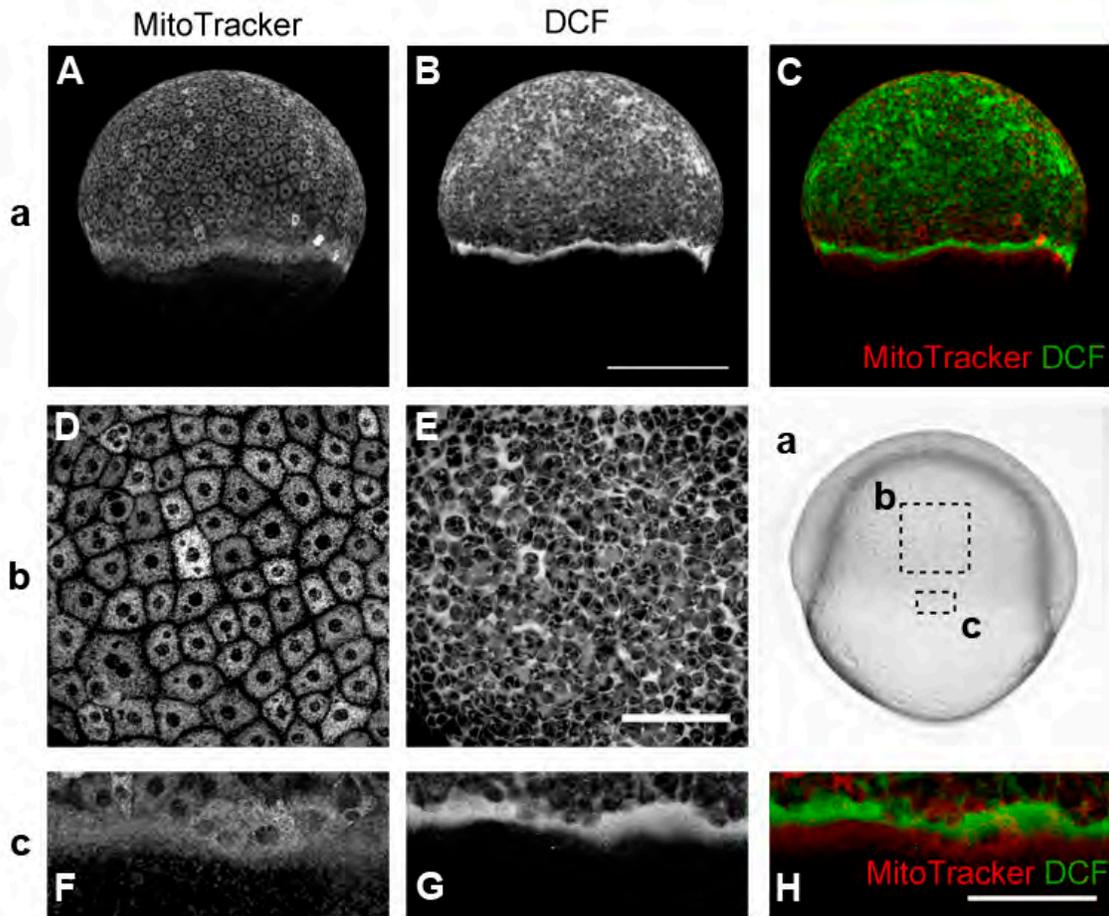


Fig. 16. Patrón de localización de la señal de DCF y de mitocondrias durante la progresión de la epibolia. (A-C) Embrión en la etapa de 60% epibolia. (D y E) Imágenes a mayor amplificación del blastodermo (b). (F-H) Imágenes a mayor amplificación del frente de migración (c). Los embriones se incubaron con CM-H2DCFDA (A, D y F) y con MitoTracker para visualizar las mitocondrias activas (F, G y H). (C y H) Sobreposición de las señales de DCF (verde) y MitoTracker (rojo). Barra de escala, A-C, 300 μm ; D y E, 100 μm ; F-H, 40 μm .

Lo siguiente que se realizó fue analizar a mayor detalle la localización de las señales del DCF y de las mitocondrias en los embriones durante la progresión de la epibolia. Primero se analizaron regiones centrales del blastodermo y se encontró que el DCF parece estar localizado en el espacio intersticial de las células profundas (Fig. 16E), mientras que la señal de las mitocondrias teñidas con MitoTracker se detectó en la capa envolvente (Fig. 16D), que esta formada por una sola capa de células que son más grandes y delgadas en comparación con las células profundas que son pequeñas y redondas. Para confirmar la diferencia de localización de ambas señales, se analizó a mayor detalle reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas por microscopía confocal (Fig. 17). La rotación del modelo tridimensional mostró que la señal del DCF se localiza en el blastodermo, en lo que corresponde a la ubicación de las células profundas (Fig. 17e y video 8), mientras que la señal correspondiente a las mitocondrias se localiza en la capa envolvente (Fig. 17f y video 8). No se detectó señal de las mitocondrias en las células profundas o en el espacio intersticial entre ellas (Fig. 17, e y h). El mismo estudio se realizó para analizar las señales en el frente de migración, de la misma manera se generó un modelo tridimensional y se rotó para evaluar una proyección transversal del frente de migración. Se observó nuevamente que las mitocondrias están localizadas en la capa envolvente (Fig. 17F y video 8) y en el caso del frente de migración se observó una acumulación de mitocondrias en forma de “V” (Fig. 17F), la cual esta formada por dos regiones; una región localizada en el vitelo (Fig. 17F) y la otra ubicada en el margen más vegetal de la capa envolvente (Fig. 17F).

Para verificar que uno de las regiones del patrón “V” mitocondrial están en el vitelo, embriones en la etapa de 1k-células se inyectaron con SYTOX Green para marcar exclusivamente los núcleos localizados en el vitelo como se reportó previamente por D’Amico y Cooper (D’Amico y Cooper 2001) y posteriormente se tiñeron con MitoTracker (Fig. 18). Los núcleos del vitelo marcados con SYTOX Green sirvieron como referencia para localizar los límites del vitelo; con esta referencia se confirmó que la región interna del patrón “V” mitocondrial se encuentra en el vitelo (Fig. 18E).

Al analizar más detalladamente la progresión de la epibolia desde una perspectiva del polo vegetal, se observaron dos hallazgos interesantes. El primero fue que los anillos tanto de mitocondrias como DCF a partir del 50% de epibolia se observaron bien delineados (Fig. 19, A y B), pero conforme la epibolia progresa la intensidad de ambos anillos disminuye y

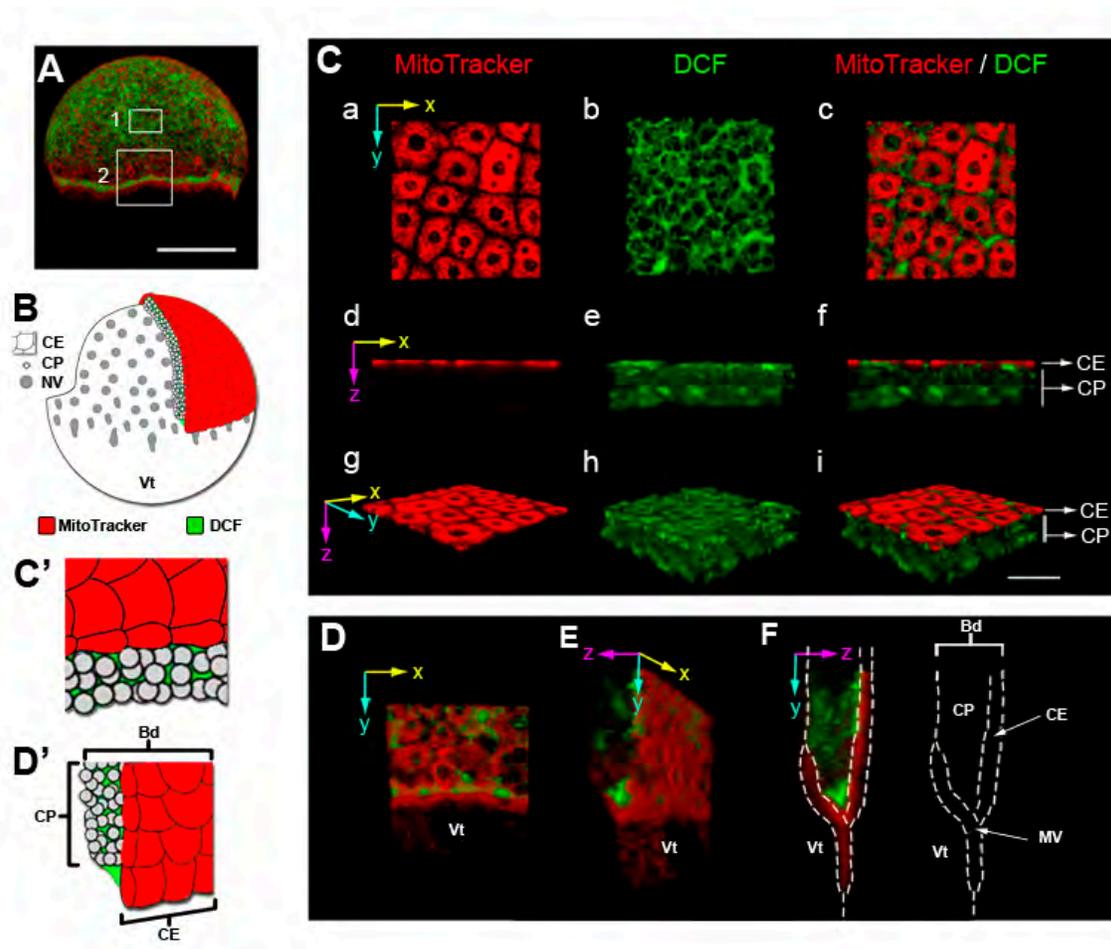


Fig. 17. Modelos tridimensionales que muestran la localización de la señal de DCF y mitocondrias en el blastodermo y en el frente de migración por epibolia. (A) Imagen de un embrión teñido con MitoTracker y CM-H2DCFDA como referencia de la ubicación de las regiones equivalentes donde se generaron los modelos tridimensionales. B, C' y D', esquemas que representan la ubicación de las células profundas, células de la capa envolvente, núcleos del vitelo y las señales fluorescentes del MitoTracker y DCF en un embrión en la etapa de 60% de epibolia. (C, a-i) Imágenes de un modelo tridimensional de la región central del blastodermo. (D-F) rotación de un modelo tridimensional que muestra una vista lateral del frente de migración donde se localizan las mitocondrias y la señal fluorescente de DCF. CE, células de la capa envolvente; CP, células profundas; Vt, vitelo; Bd, blastodermo; MV, mitocondrias del vitelo. Barra de escala, A, 300 μm ; C y D, 50 μm .

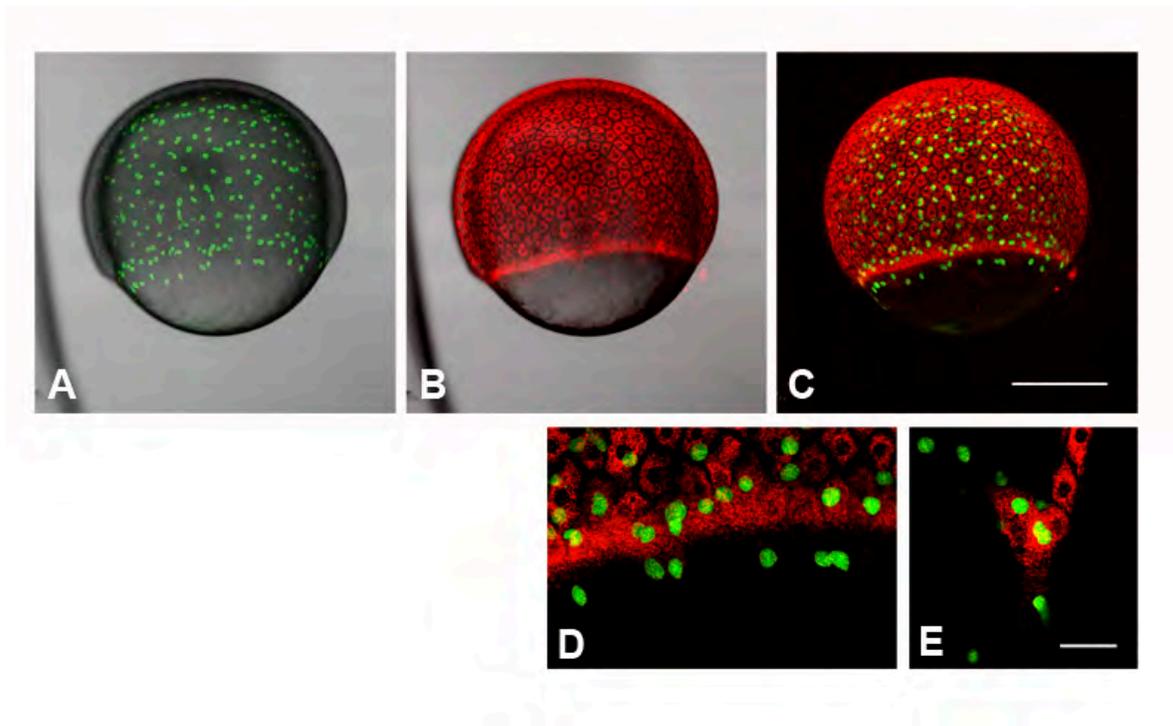


Fig. 18. Localización del cinturón de mitocondrias activas durante la progresión de la epibolia. Los embriones se inyectaron con SYTOX Green después de la etapa de 1k-células para marcar los núcleos del vitelo (A, C, D y E; en verde) y se tiñieron con MitoTracker para visualizar las mitocondrias (B, C, D y E; en rojo). D y E, imágenes a mayor amplificación del cinturón de mitocondrias activas. D, vista lateral. E, vista transversal. Barra de escala, A-C, 200 μm , D y E, 50 μm .

al final de la epibolia ya no se detectan ambos anillos (Fig. 19, D y E). El segundo fue que se observaron dos regiones donde se acumulan las señales del DCF y del MitoTracker localizadas en el lado dorsal del embrión (Fig. 19, D, E y F; cabezas de flecha). Ambas regiones migran colectivamente en dirección vegetal hasta el final de la epibolia y en ningún momento se sobrelapan entre ellos (video 10). Durante la epibolia un tipo de células denominadas como “dorsal forerunner cells” que derivan de la capa envolvente, migran como un grupo compacto que eventualmente formarán a la vesícula de Kupffer (Oteíza et al. 2008). En imágenes a mayor amplificación de embriones que ya finalizaron la epibolia (Fig. 19, G, H e I), se corroboró a nivel morfológico que la acumulación de mitocondrias se localiza en células que se derivan de la capa envolvente y que posteriormente forman la vesícula de Kupffer (Fig. 19O). Aún restaría realizar cotinciones de MitoTracker con marcadores de la vesícula de Kupffer para comprobar esta observación.

En resumen, las observaciones presentadas indican que la señal del DCF se localiza en el espacio intersticial formado entre las células profundas y en un anillo localizado en el frente de migración. Para corroborar estas observaciones, se decidió realizar un análisis más detallado de la localización de la señal del DCF tanto en el espacio intersticial como en el frente de migración. Los resultados de estos experimentos se presentan en las siguientes secciones.

5.2.5. La señal fluorescente de DCF se localiza en el espacio intersticial durante la epibolia.

Desde las primeras divisiones celulares y hasta la progresión de la epibolia, los patrones de tinción con CM-H2DCFDA indicaban que la señal del DCF se localizaba en el espacio intersticial formado entre las células. Para verificar esta observación se realizaron cotinciones de CM-H2DCFDA y BODIPY en embriones durante la etapa de 50% de epibolia. Se usó el colorante BODIPY debido a que marca el citoplasma de las células del blastodermo y no tiñe el espacio intersticial. En los embriones co-teñidos se observó que el BODIPY marca las células del blastodermo, mientras que el espacio intersticial es negativo para la señal del BODIPY (Fig. 20F) como fue reportado por Cooper y col. (M S Cooper, D'Amico, y Henry 1999). En el caso de la señal fluorescente de DCF se detectó en el espacio intersticial que coincide con los espacios formados entre las células y que a su vez son negativos para BODIPY (Fig. 20, F, G y H). Estas observaciones confirman que la

señal del DCF se detecta principalmente en el espacio intersticial formado entre las células profundas.

5.2.6. Caracterización espacio temporal de la formación del anillo de DCF.

Previamente se había visualizado por microscopía de epifluorescencia que en los embriones en etapas previas al 50% de epibolia no se detecta el cinturón de DCF. Teniendo en cuenta este antecedente, se usó la misma combinación de CM-H2DCFDA y BODIPY para analizar la dinámica espacio temporal de la formación del cinturón de DCF. Los embriones coteñidos en 50% de epibolia se visualizaron en series de tiempo por microscopía confocal. Como se puede observar en el video 11 y en la Fig. 20I, al inicio de la adquisición de las imágenes se observan las células del blastodermo positivas para BODIPY, mientras que el DCF se observa en el espacio intersticial y no se detecta el cinturón del DCF al frente de las células del blastodermo (Fig. 20I). Después de 40 minutos, al frente de las células del blastodermo se comienza a observar la formación de un espacio negativo para BODIPY pero positivo para DCF (Fig. 20I, cabeza de flecha). En los siguientes 45 minutos, el espacio negativo aumenta de área marginalmente y a medida que se incrementa el espacio, el mismo espacio se vuelve positivo para DCF (Fig. 20I, cabezas de flecha). Adicionalmente, se observó que a medida que el espacio se forma y aumenta su tamaño es invadido por células que se sumergen en la señal de DCF, lo que indica de manera indirecta que este espacio es una cavidad (Fig. 20I, flechas; video 11). El hundimiento de las células en la cavidad es un comportamiento de las células profundas que están realizando una migración por involución hacia el interior del blastodermo; este movimiento es característico de la etapa de anillo germinal y antecede la formación del escudo embrionario que ocurre durante el proceso de gastrulación (Montero et al. 2005). Un análisis a mayor amplificación de una región transversal y marginal de los embriones permitió corroborar que el cinturón de DCF es una cavidad conectada con el espacio intersticial (Fig. 20; F, G y H).

Estas observaciones indican que la señal detectada del cinturón de DCF durante la epibolia se localiza en una cavidad que esta conectada con el espacio intersticial formado entre las células profundas. La aparición del cinturón de DCF ocurre durante la gastrulación entre las etapas de anillo germinal y 50% de epibolia .

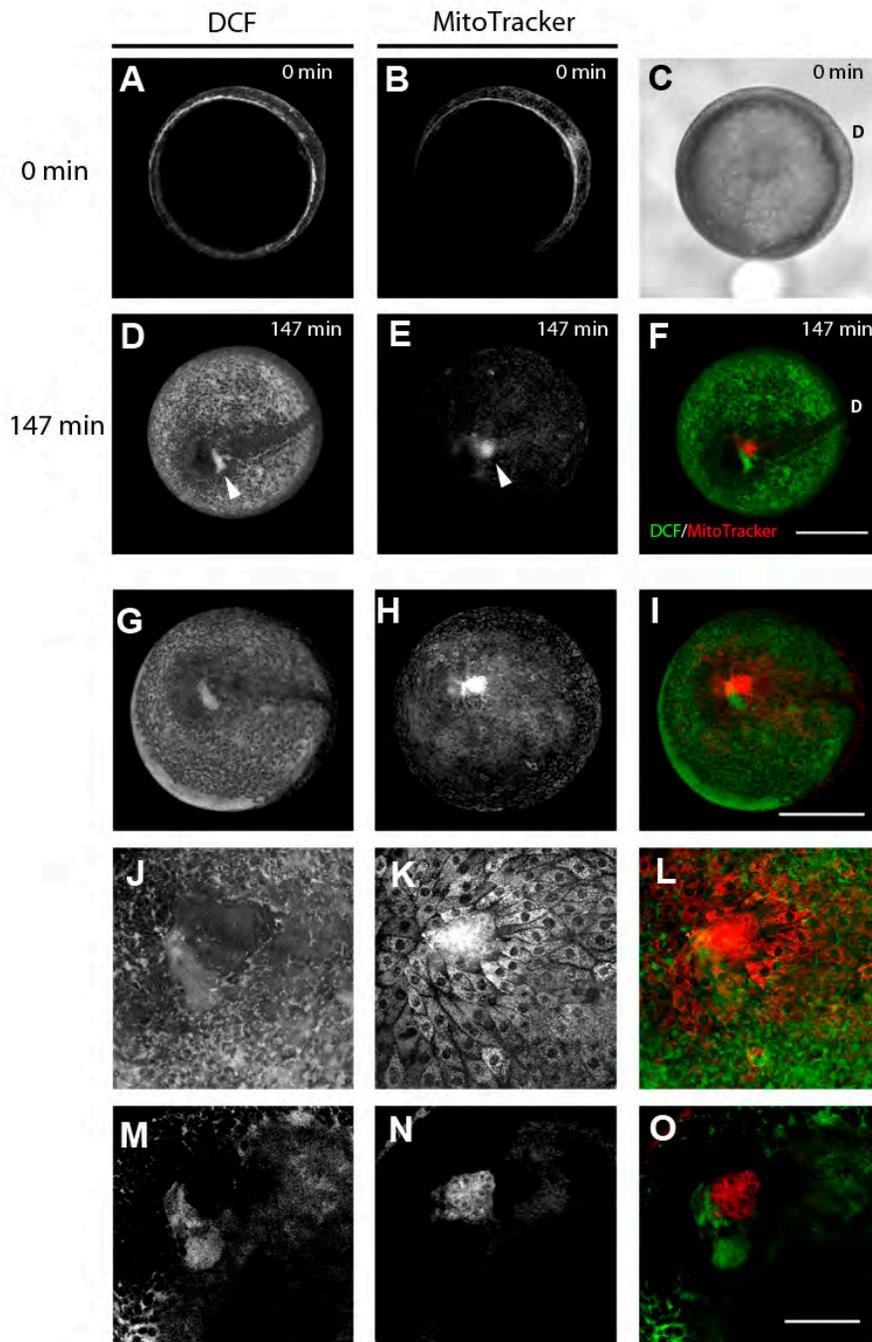


Fig. 19. Los anillos de DCF y mitocondrias activas se localizan en el frente de migración y avanzan durante la progresión de la epibolia. (A-F) imágenes del seguimiento temporal de la progresión de la epibolia. A-C, inicio de la serie de tiempo en la etapa de 60%-epibolia. C, campo claro. D-F, final de la serie de tiempo en la etapa de 90%-epibolia donde se observa la presencia de dos puntos brillantes que corresponden a las señales de DCF y mitocondrias (cabezas de flecha en D y E). D, lado dorsal. (G-O) El punto brillante de mitocondrias activas al final de la epibolia corresponde a las células que van a originar a la vesícula de Kupffer. J-L, ampliificaciones de la proyección de máxima intensidad presentada en G-I. M-O, proyecciones parciales que muestran señal postiva de MitoTracker en las células de la vesícula de Kupffer (N). A, D, G, J y M, señal de DCF. B, E, H, K y N, mitocondrias activas. DCF, en verde; MitoTracker, en rojo. Barra de escala, A-I, 300 μm ; J-O, 100 μm .

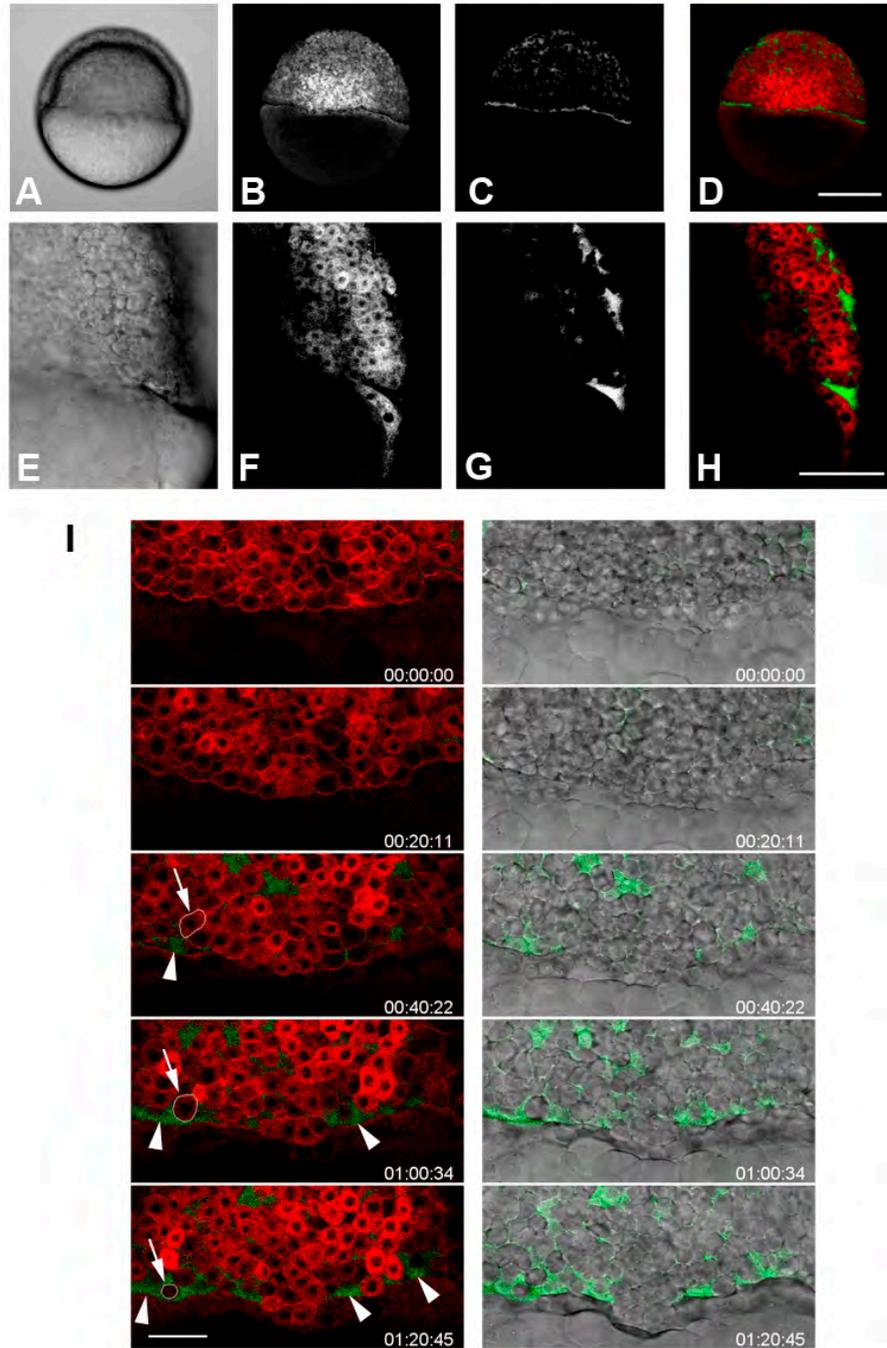


Fig. 20. La señal fluorescente de DCF se localiza en una cavidad conectada en el espacio intersticial. **(A-D)** Embriones incubados con BODIPY para visualizar las células del blastodermo (rojo) y la señal de DCF (verde) en embriones completos en la etapa de anillo germinal. **(E-H)** Imágenes a mayor amplificación de una región transversal del embrión presentado en A-D. **(I)** Imágenes tomadas de una serie de tiempo que muestra la formación de la cavidad marginal positiva para DCF. Tiempo, Horas:Minutos:Segundos. 00:00:00, inicio de la serie de tiempo momentos antes de que se forme la cavidad marginal. Las cabezas de flecha indican la formación de la cavidad marginal. La flechas indican una célula profunda que se internaliza en la cavidad marginal. Panel derecho, sobreposición de la señal de DCF con la imagen de campo claro. A y E, imágenes de campo claro. B y F células del blastodermo marcadas con BODIPY. C y G señal de DCF. Células profundas, en rojo. Señal de DCF, en verde. Barra de escala: A-D, 300 μm ; E-H, 100 μm ; I, 50 μm .

5.2.7. La tinción de DCF fluorescente en los embriones completos indica regiones de EOR endógenas.

Como una alternativa experimental para evaluar si la señal de DCF observada en los embriones era específica para la detección de EOR, se realizaron tinciones con la sal nitroazul de tetrazolio (NBT por su siglas en inglés). Se ha reportado que la reacción de oxidación del NBT con superóxido genera formazán, que es un precipitado morado (Berridge, Herst, y Tan 2005). Las sales de tetrazolio como el NBT o el MTT se han utilizado para detectar la formación de EOR en células en cultivo, hongos, animales y plantas (Lejeune et al. 2006; Salas-Vidal et al. 1998; Egan et al. 2007; Ramel et al. 2009). En particular, estudios realizados en hongos han mostrado que la tinción de DCF coincide con los lugares donde se deposita la sal tetrazolica NBT oxidada, sugiriendo que los patrones NBT y DCF indican la formación de EOR (Egan et al. 2007). Siguiendo esta misma aproximación se realizaron tinciones con NBT en embriones vivos en la etapa de 70%-epibolia. Se observó la formación del precipitado morado en forma de un cinturón que parece estar localizado en el frente de migración, similar al cinturón de DCF observado en esta etapa (Fig. 21, A y B). Para corroborar la posición del cinturón de NBT, se incubaron embriones con NBT en etapa de 50% de epibolia y una vez formado el precipitado, inmediatamente se fijaron y posteriormente se tiñeron para visualizar los filamentos de actina y los núcleos. Como se puede observar, la tinción de filamentos de actina revela el frente de las células de la capa envolvente y la capa de las células profundas respectivamente (Fig. 21, H y L). Tomando la tinción de actina como referencia de la posición de ambos linajes celulares, se observó que el cinturón de NBT se localiza principalmente al frente de ambos linajes (Fig. 21, I, J, M y N). Adicionalmente, se verificó por videomicroscopía que durante el proceso de precipitación del formazán en los embriones, el precipitado se forma delante del frente de migración durante la epibolia (video 12). Estos resultados indican por primera vez que en el frente de migración durante la progresión de la epibolia se forma un cinturón de EOR que se puede visualizar por la tinción con DCF o por la precipitación de formazán.

Continuando con el análisis de la especificidad del CM-H2DCFDA para la detección de EOR, se realizó una comparación de embriones en 60% de epibolia sin teñir y teñidos con CM-H2DCFDA; en ambos casos se cotiñieron con MitoTracker para tener una

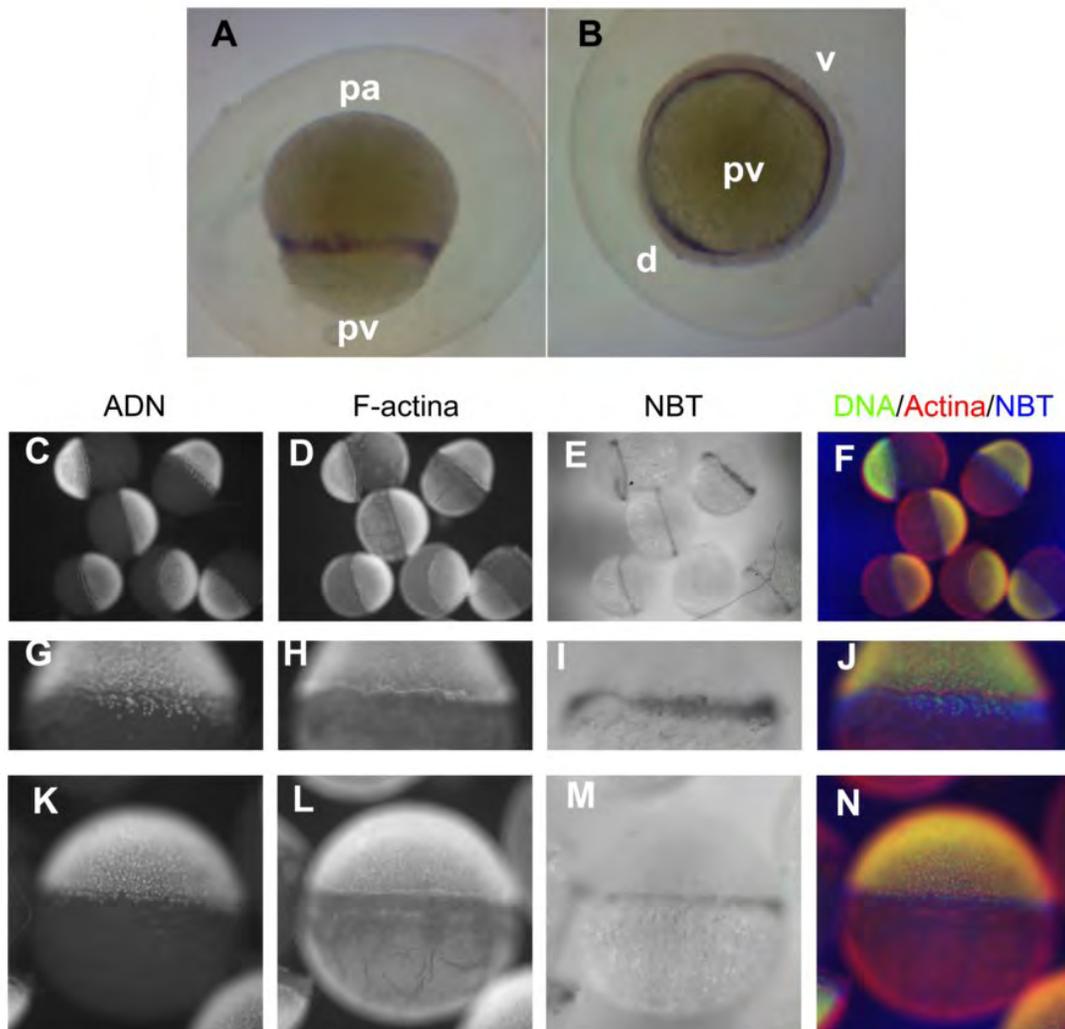


Fig. 21. Detección de especies de oxígeno reactivas con NBT durante la progresión de la epibolia. A, y B patrón de localización de la oxidación del NBT en embriones en la etapa de 70%-epibolia (precipitado morado en el frente de migración). A, vista lateral. B, vista del polo vegetal. C-N patrón de localización de la oxidación del NBT con respecto a la posición del frente de migración al 50% de epibolia. Los embriones vivos se incubaron en NBT, posteriormente se fijaron una vez que se formó el precipitado morado (E, I y M) y se tiñieron con Hoeschst para visualizar los núcleos (C, G y K) y con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina (D, H y L). Sobreposición con colores falsos (F, J y N; núcleos, verde; actina, rojo; NBT, azul). pa, polo animal; pv, polo vegetal; v, ventral; d, dorsal.

referencia del embrión. Se observó que los embriones sin teñir no presentaron fluorescencia lo cual confirma que la señal fluorescente detectada no es consecuencia de la autofluorescencia propia de los embriones (Fig. 22E). Después se verificó si el colorante CM-H2DCFDA cargado en los embriones es sensible a cambios de EOR exógenos como se reportó previamente en pollo (Fisher 2007) o en pez cebra con la diferencia que en ese trabajo se usó Hyper, un indicador de EOR codificado genéticamente (Niethammer et al. 2009). Los embriones se cargaron con CM-H2DCFDA y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión sumergidos en un volumen fijo de agua de embrión, y posteriormente se incubaron en presencia de peróxido de hidrógeno o de tert-butil hidroperóxido. Se observó que la señal de DCF incrementó con el tratamiento de peróxido de hidrógeno y tert-butil peróxido en comparación con los embriones controles que no fueron tratados con ningún oxidante (Fig. 22G). Además, se detectó que el incremento de la señal de DCF no es inmediato al tratamiento con ambos oxidantes y por el contrario, el aumento de la señal se detectó después de siete minutos a partir del momento de la adición de los oxidantes al medio (Fig. 22G). Una explicación del retraso en el incremento de la señal del DCF puede ser que los oxidantes tardan en difundir en el medio, y dentro de los embriones se demoran en reaccionar con el CM-H2DCFDA. Lo siguiente que se realizó fue evaluar si la señal de DCF se puede inhibir de manera exógena. Se sabe que a nivel celular existen varias fuentes que producen EOR, en particular una de las mejor caracterizadas involucra a la familia de las NADPH oxidasas (Bedard y Krause 2007). Se ha observado que las NADPH oxidasas sintetizan superóxido y/o peróxido de hidrógeno en cultivos celulares *in vitro* y en organismos completos como por ejemplo: plantas (Foreman et al. 2003; Cárdenas et al. 2008) el erizo de mar (Wong y Wessel 2005) y el pez cebra (Niethammer et al. 2009). En estos organismos se ha reportado que la generación de EOR disminuye como consecuencia del tratamiento con moléculas que son inhibidores generales de las actividad de NADPH oxidasas, como el difenil yodonio (en inglés diphenylene iodonium, DPI) (Roberts, Fredlund, y Møller 1995; Baker et al. 1998; Moller 2001) o con el VAS2870 (ten Freyhaus et al. 2006; Niethammer et al. 2009). Con base en lo anterior consideramos que la señal del DCF observada en los embriones en proceso de epibolia, en principio debería indicar las regiones en donde se forman y/o acumulan de manera importante las EOR, y a su vez estas EOR podrían ser derivadas de la actividad de las NADPH oxidasas. Para probar lo anterior se incubaron embriones en la etapa de esfera con el inhibidor VAS2870.

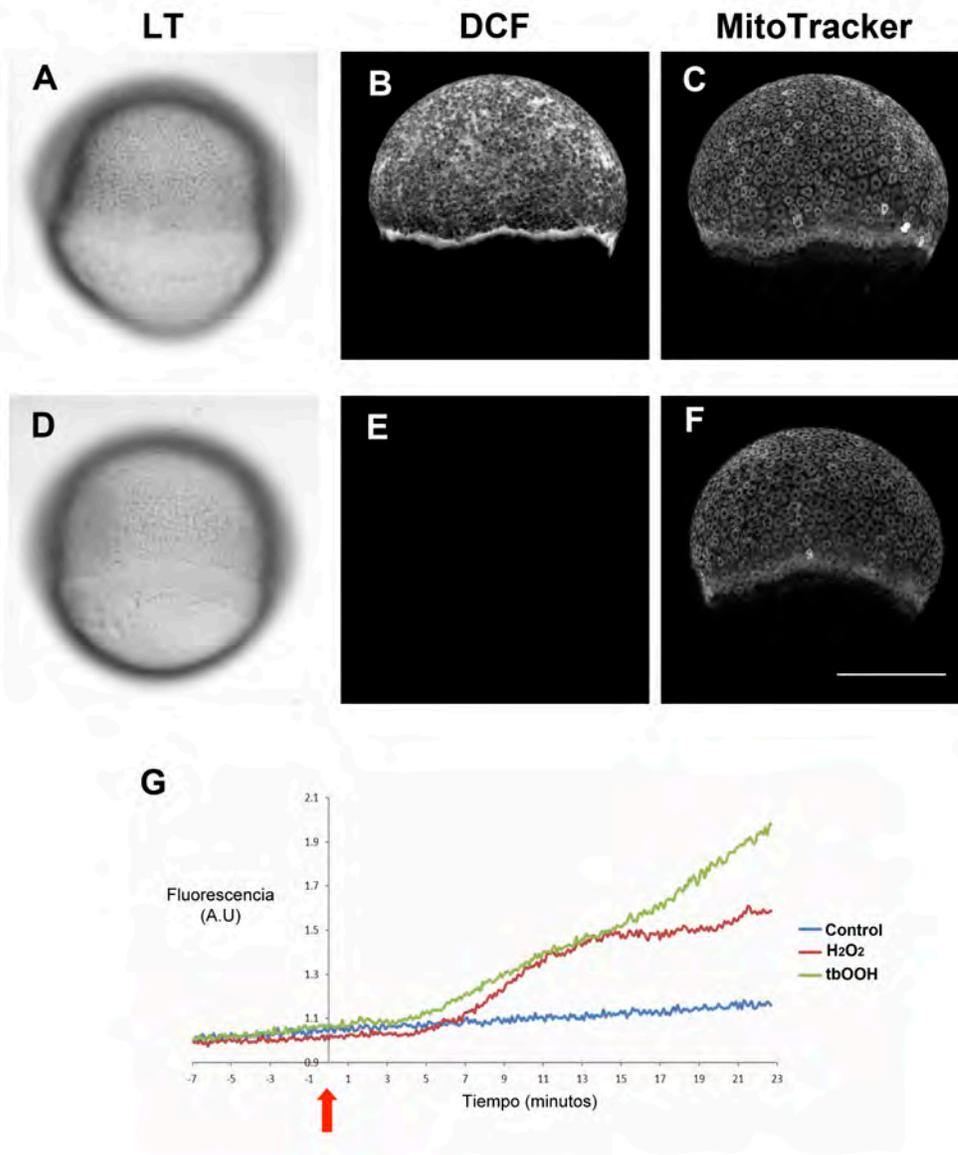


Fig. 22. (A-D) Control de la tinción con CM-H2DCFDA por microscopía confocal. (A-C) Detección de la fluorescencia del DCF en embriones incubados con CM-H2DCFDA, en (B) se observa el patrón característico de la señal del DCF en el espacio intersticial y en la cavidad marginal formada en el frente de migración al 60% de epibolia. Para la detección de la fluorescencia del DCF, los embriones se excitaron con un laser de 488 nm. (D-F) Imágenes de un embrión que no se incubó con CM-H2DCFDA y que se excitó con una fuente laser de 488 nm, en (E) no se detectó fluorescencia en las mismas condiciones de adquisición que en A-C. Tanto en A-C y D-F los embriones se tiñieron con MitoTracker para tener una referencia de la morfología del embrión. A y D imágenes de campo claro. C y F, imágenes de la detección de la señal del MitoTracker. (G) La intensidad de la señal fluorescente de DCF incrementa en respuesta a la incubación con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o con tert-Butil-hidroperóxido (tbOOH). Embriones en etapa de esfera se cargaron con CM-H2DCFDA, se montaron en agarosa de bajo punto de fusión y se analizaron por microscopía de epifluorescencia. La intensidad de la fluorescencia del DCF fue cuantificada antes y durante la incubación con H₂O₂ (trazo rojo) o con tbOOH (trazo verde). Tiempo expresado en minutos, signo negativo indica el tiempo antes del tratamiento; flecha roja, indica el momento de la adición de H₂O₂ o tbOOH al medio que baña a los embriones; signo positivo indica el tiempo posterior a la incubación con las moléculas oxidantes. El trazo azul representa la cuantificación de la señal de DCF en un embrión control al cual se añadió medio sin oxidante. N=3. Barra de escala, 300 μ m.

Se encontró que el tratamiento de los embriones con VAS2870 a 5 o 10 μM provoca una disminución de la señal de DCF en el espacio intersticial entre las células profundas y en la cavidad marginal que se forma en el frente de migración durante la epibolia (Fig. 23; d-f).

Sin embargo, también se observó que el tratamiento con el VAS2870 causó que la capa envolvente se volviera positiva para la señal de DCF a diferencia de los embriones control donde esta capa es negativa (datos no mostrados). Una posibilidad es que el tratamiento con VAS2870 vuelve más sensible la capa envolvente a la manipulación manual durante el proceso de remoción del corión y el montaje para la visualización. Para confirmar esta posibilidad, los embriones con el corión intacto se incubaron con VAS2870 y se observó que en estos embriones la señal de DCF disminuye y presentan menos o ninguna afectación en la capa envolvente, en comparación con los embriones control que se trataron con el vehículo (Fig. 23B).

En conjunto estos resultados demuestran que el CM-H2DCFDA se convierte a la forma fluorescente DCF en presencia de EOR endógenas producidas y/o acumuladas en los embriones vivos y las EOR detectadas son derivadas de la actividad de NADPH oxidasas. Además, se demuestra que el CM-H2DCFDA se puede utilizar para caracterizar las regiones de formación/acumulación de EOR en los embriones de pez cebra durante la epibolia.

5.2.8. La inhibición de la actividad de NADPH disminuye los niveles de especies de oxígeno reactivas y afecta el proceso de epibolia.

En el pez cebra detectamos la presencia de EOR con un patrón característico durante la progresión de la epibolia, que se caracteriza por una migración masiva durante el desarrollo. La presencia de EOR en este momento del desarrollo podría indicar la participación de las EOR en la motilidad celular durante la epibolia. Se ha observado que las EOR derivadas de la actividad de NADPH oxidasa pueden formar gradientes que estimulan la migración celular, como los que se forman durante los ensayos de herida-cicatrización tanto *in vivo* como *in vitro* (Moldovan et al. 2006; Niethammer et al. 2009).

Tomando esta evidencia junto con las observaciones presentadas en las secciones anteriores, se pueden plantear dos hipótesis respecto a los patrones de EOR detectados durante el desarrollo embrionario del pez cebra y en particular al observado durante la

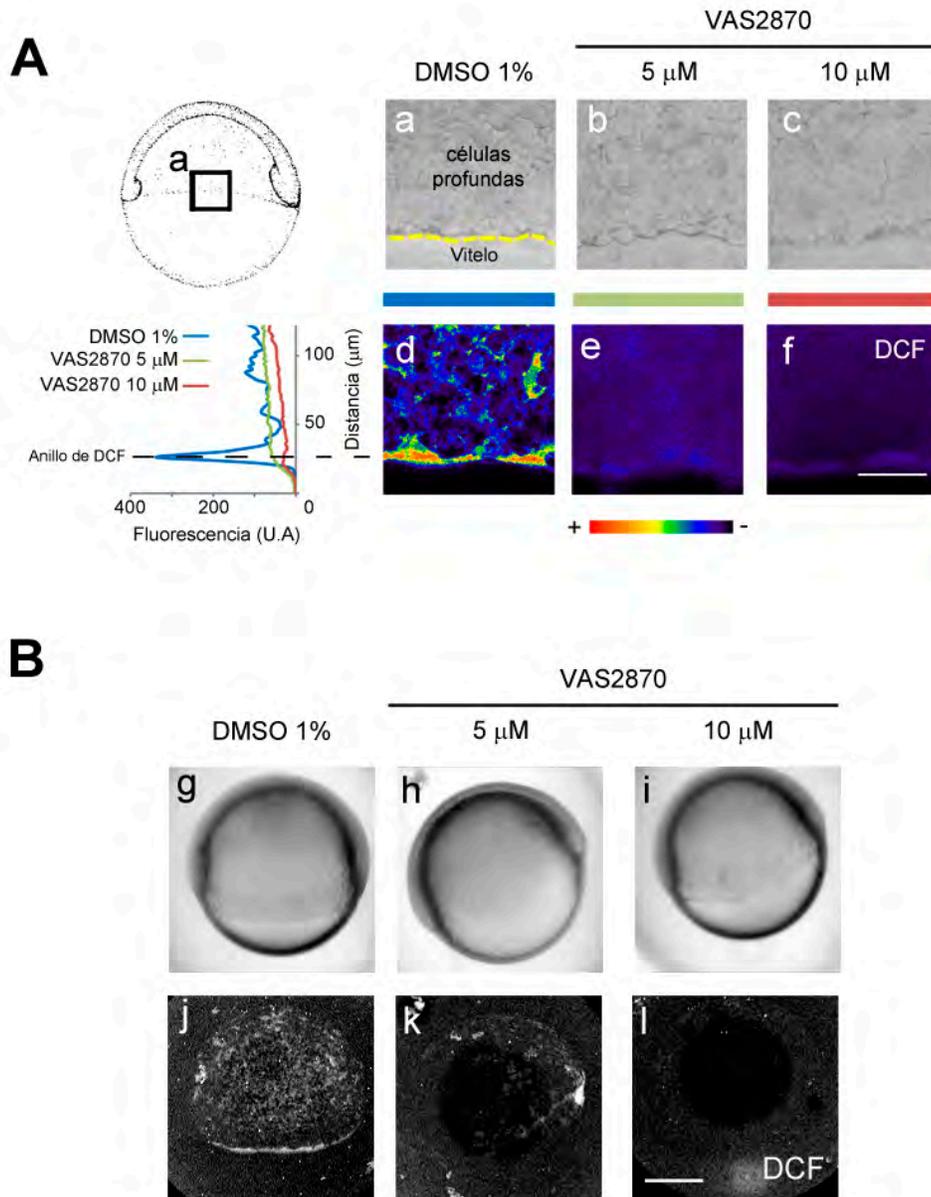


Fig. 23. La inhibición de la actividad de las NADPH oxidasas disminuye la formación de especies de oxígeno reactivas durante la progresión de la epibolia. **(A)** La incubación de embriones sin corión con el inhibidor general de la actividad de NADPH oxidasa VAS2870 disminuye la señal fluorescente de DCF en el espacio intersticial entre las células profundas y en el frente de migración en comparación con los embriones control (vehículo DMSO 1%). El análisis se realizó en proyecciones parciales que incluyen las células profundas, las imágenes se presentan en colores falsos, rojo indica una mayor intensidad de fluorescencia y negro indica menor intensidad de fluorescencia de DCF (d, e y f). Las proyecciones completas de la serie de cortes ópticos muestran la señal positiva de DCF en la capa envolvente en los embriones incubados con VAS2870 probablemente inducida por estrés mecánico (g, h e i). Imágenes de campo claro que representan un solo corte óptico (a, b y c). El gráfico representa la cuantificación en una dimensión de la intensidad de fluorescencia del DCF de las imágenes presentadas en d-f. **(B)** La incubación de los embriones (a los que no se les removió el corión) con el inhibidor VAS2870 disminuye los niveles de la señal del DCF en comparación con los embriones control y presentan una señal de DCF menor o nula en la capa envolvente. Los embriones presentan una señal de DCF difusa que se observa en el corión. Barra de escala: A, 50 μ m; B, 300 μ m.

epibolia: 1) Los patrones de EOR son una consecuencia secundaria del metabolismo celular que no tiene importancia en la fisiología celular o 2) los patrones de EOR tienen una participación específica en la regulación de la fisiología celular y/o de los procesos que ocurren desarrollo embrionario. Para evaluar lo anterior, se analizó el efecto que causa la inhibición de la formación de EOR derivadas de la actividad de NADPH oxidasas en el desarrollo embrionario. Para estos ensayos se analizó el efecto del inhibidor VAS2870 sobre la progresión de la epibolia. Se decidió analizar este proceso debido a la detección de EOR reportada previamente en el presente proyecto.

Se observó que los embriones que se trataron con el VAS2870 en la etapa de esfera presentaron una disminución en la tinción de DCF y un retraso en la progresión de la epibolia (Fig. 24A). La capa de las células profundas es la que se afectó principalmente, ya que se observó un retraso en el movimiento de epibolia en los embriones tratados con el inhibidor en comparación con los controles (Fig. 24A, cabezas de flecha). Hay que señalar que esto correlaciona con la señal de EOR que se observó principalmente en el espacio intersticial entre las células profundas en los embriones sin tratamiento. En cambio, la capa envolvente de los embriones incubados con VAS2870 no mostraron un efecto tan importante en la progresión durante la epibolia (Fig. 24A, flechas). Para confirmar el efecto del VAS2870 sobre la migración por epibolia se analizaron embriones incubados con VAS2870 que se tiñieron para visualizar los núcleos y los filamentos de actina polimerizada. Con la tinción de núcleos se pudo observar que las células profundas de los embriones tratados con el inhibidor están retrasadas en comparación con los controles, lo que provoca una mayor separación entre la capa profunda y la capa envolvente (Fig. 24B, cabezas de flecha; C y D). Además, con la tinción de filamentos de actina se observó que la migración por epibolia de la capa envolvente no se afecta de manera tan notoria (Fig. 24B, flechas, Fig. 24C). Estos datos indican que la inhibición de la formación de EOR derivadas de la actividad de NADPH oxidasas interfiere con la migración por epibolia de las células profundas, que es el linaje celular que contribuye propiamente al embrión.

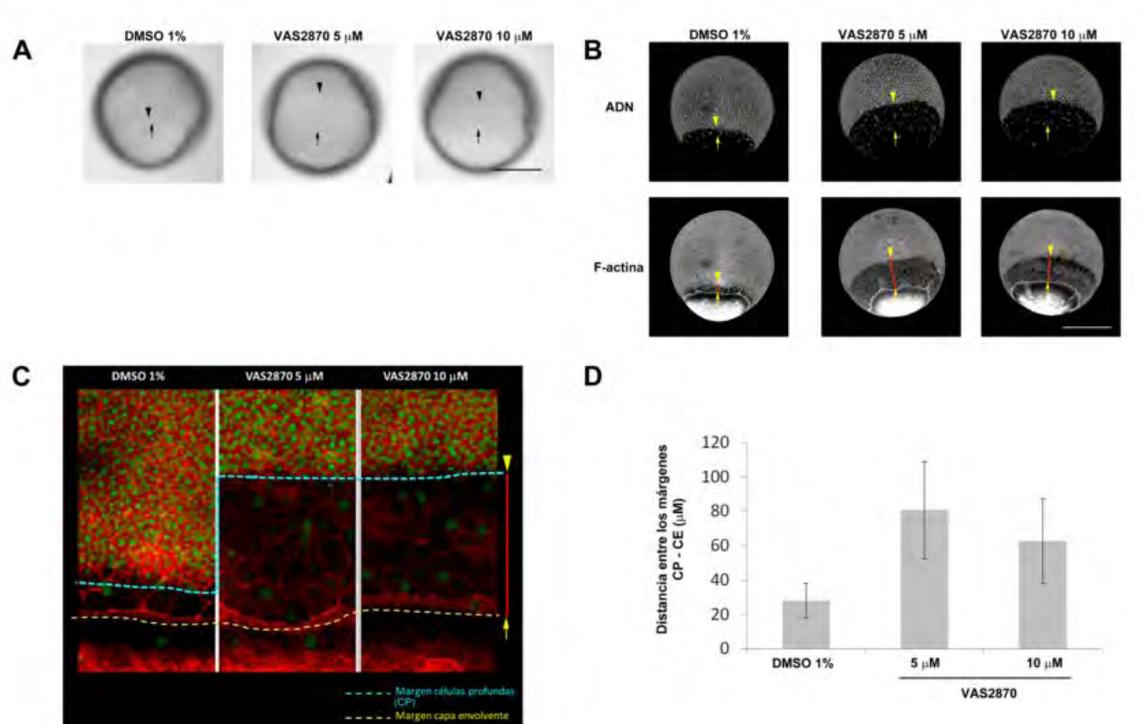


Fig. 24. La inhibición de la actividad de las NADPH oxidasas afecta la progresión de la epibolia de las células profundas. **(A)** Efecto del tratamiento con VAS2870 sobre la migración durante la epibolia en los embriones completos. Imágenes de campo claro de embriones vivos. La capa profunda presenta retraso en la epibolia (cabezas de flecha en A) mientras que la capa envolvente no se ve afectada (flechas en A). **(B)** Efecto del tratamiento con VAS2870 sobre la migración por epibolia de las células profundas. Para confirmar el efecto del inhibición de la actividad de NADPH oxidasas sobre la progresión epibolia, los embriones se tiñieron con Hoechst para visualizar los núcleos (panel superior) y con faloidina Alexa 488 para visualizar los filamentos de actina polimerizada (panel inferior). Se observa un retraso de la posición de la capa de las células profundas (cabezas de flecha en B) en comparación con la capa envolvente (flechas en B) que muestra un avance similar a los embriones control (vehículo, DMSO 1%). **(C)** El retraso de la posición de la capa de las células profundas provoca un aumento en la distancia entre los márgenes de las capas de las células profundas y la capa envolvente (C y líneas roja en B). C, núcleos en verde; filamentos de actina en rojo. **(D)**, cuantificación de la distancia entre las capas de células profundas y envolvente en los embriones tratados con VAS2870 comparados con el control. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. CP, células profundas; CE, capa envolvente. Barra de escala, A y B, 300 μm .

5.2.9. El tratamiento con peróxido de hidrógeno rescata los efectos causados por la inhibición de la actividad de NADPH oxidasa.

Esta reportado que el peróxido de hidrógeno derivado de la actividad de NADPH oxidasas es una EOR involucrada en el transducción de señales que inducen o controlan la migración celular (Al Ghouleh et al. 2013; ten Freyhaus et al. 2006). En particular en el pez cebra, se ha reportado que al provocar un corte en la aleta caudal de peces de 3 días de desarrollo se induce la formación de un gradiente de peróxido de hidrógeno derivado de la NADPH oxidasa Duox. Este gradiente de peróxido de hidrógeno funciona como un quimioatrayente de neutrófilos y macrófagos al sitio del la herida (Niethammer et al. 2009). Dado que la inhibición con el VAS2870 disminuye las EOR y afecta la progresión del movimiento de migración por epibolia, existe la posibilidad de que una de las EOR que disminuye es el peróxido de hidrógeno.

Para probar ésta hipótesis, se realizaron ensayos de rescate de los efectos asociados a la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas. Estos experimentos se llevaron a cabo incubando a los embriones en la etapa de 50% de epibolia en presencia del inhibidor VAS2870 junto con peróxido de hidrógeno (Fig. 25, A(i)). Para identificar y evaluar la concentración de peróxido de hidrógeno necesaria para rescatar los defectos se decidió evaluar la sobrevivencia de los embriones a las 24 hpf. Lo anterior debido a que se había observado en los tratamientos con VAS2870 que la sobrevivencia de los embriones disminuía a las 24 hpf (Fig. 25, C y c').

Se observó que la incubación con el VAS2870 desde la etapa de 50% de epibolia hasta las 24 hpf (Fig. 25, A(i)) afecta de manera dramática la sobrevivencia, ya que la mayoría de los embriones no sobrevive a las 24 hpf en comparación con los embriones control (Fig. 25, B(i)). Por otro lado en el grupo de embriones incubados simultáneamente con el inhibidor y con 1 mM de peróxido de hidrógeno se incrementa la sobrevivencia de los embriones al 100% (Fig. 25B(i)), además los embriones presentan un fenotipo silvestre similar al de los embriones control. Este rescate tan sorprendente generó cierta sospecha debido a que se puede interpretar de dos maneras diferentes; la primera, es que efectivamente el peróxido de hidrógeno añadido al medio compensa la disminución de EOR endógenas, lo que provoca que aumente la sobrevivencia de los embriones. La segunda posibilidad, es que el VAS2870 interactúe directamente con el peróxido de

hidrógeno, provocando que el VAS2870 se modifique químicamente disminuyendo su actividad, y por esta razón no se afecta la sobrevivencia de los embriones permitiendo que se desarrollen hasta las 24 hpf.

Para evaluar cual de estas interpretaciones explica mejor lo que estaba ocurriendo en los ensayos de rescate, primero los embriones se incubaron con VAS2870 por 1 hora, al finalizar el tratamiento se removió el inhibidor y después los embriones se incubaron con peróxido de hidrógeno hasta las 24 hpf para evitar la interacción directa entre el VAS2870 y el peróxido de hidrógeno (Fig. 25, A(ii)). En estos ensayos se observó que el tratamiento con VAS2870 por una hora fue suficiente para afectar el desarrollo embrionario (Fig. 25, B(ii)). La mayoría de los embriones tratados con el inhibidor no completan la epibolia y mueren al llegar al período de somitogenesis (Fig. 25, C, c' y video 13) y los embriones que sobreviven a las 24 hpf presentan defectos morfológicos importantes, como una talla más corta y no tienen desarrollada la región cefálica (Fig. 25B (ii)). En el caso de los embriones que se incubaron con VAS2870 por una hora y después con 1 mM de peróxido de hidrógeno, se observó que los embriones presentan una sobrevivencia a las 24 hpf similar cuando se comparan con los embriones que sólo fueron tratados con VAS2870 (Fig. 25, B(ii)). Sin embargo, los embriones que sobreviven a las 24 hpf presentan menos defectos morfológicos que los embriones que sólo fueron tratados con VAS2870, y en particular la región cefálica es más parecida a la de los embriones control (Fig. 25, B(ii)).

Lo segundo fue evaluar si el inhibidor VAS2870 se modifica químicamente en presencia del peróxido de hidrógeno. Para esto se realizaron ensayos de resonancia magnética nuclear (RMN) para analizar la estructura química del VAS2870, en colaboración con la Dra. Laura Álvarez Beber y la M. en C. Mayra Antúnez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM. De manera breve, se mezcló 10 μ M de VAS2870 en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno y se incubó la mezcla por 4 horas. Después se recuperó el VAS2870 de la solución y se realizaron los análisis de RMN. En los resultados de RMN se observó una mezcla compuesta por un 76% de VAS2870 intacto más un 24% de VAS2870 oxidado (Fig. 25D). La oxidación del VAS2870 ocurre en el átomo de azufre generándose un sulfóxido. Este resultado indica que aunque el VAS2870 es susceptible a ser oxidado por el peróxido de hidrógeno en solución, la mayor parte del

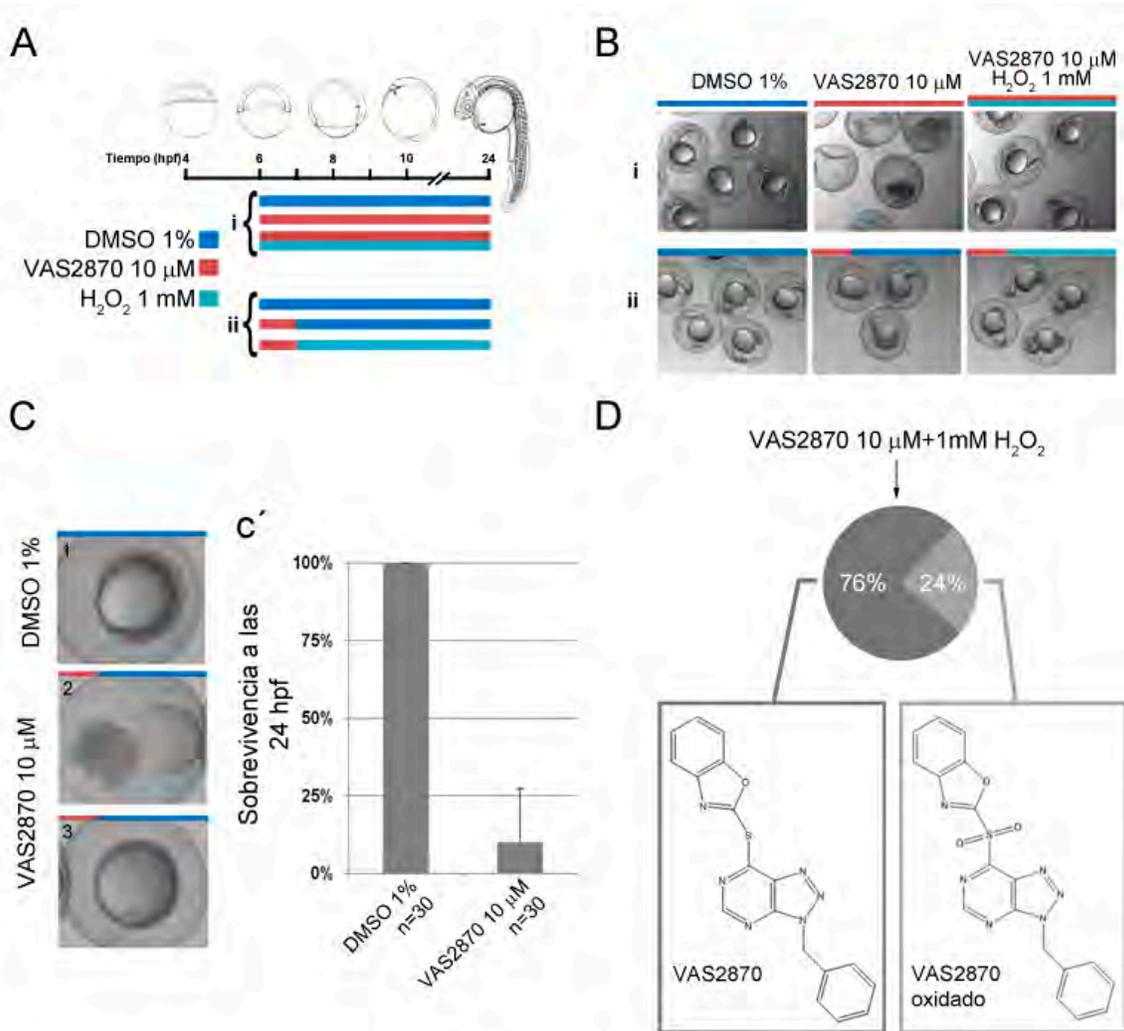


Fig. 25. El tratamiento con peróxido de hidrógeno rescata los efectos causados por la inhibición de la actividad de NADPH oxidasa. **(A)** Esquema de tratamientos en embriones completos, control (vehículo, DMSO 1%), **(i)** La inhibición de la actividad de NADPH oxidasa con VAS2870 fue sostenida a partir del 50% de epibolia y hasta las 24 hpf. En el caso de los experimentos de rescate se realizó una incubación simultánea de VAS2870 junto con peróxido de hidrógeno. Los efectos de este esquema de tratamiento se observan en el panel B(i). La incubación con VAS2870 causa la muerte de los embriones que se revierte con la incubación con peróxido de hidrógeno. **(ii)** Inhibición por una hora de la actividad de NADPH oxidasa con VAS2870 a partir del 50% de epibolia, al finalizar la hora el medio se cambió por medio control. En el caso del experimento de rescate, los embriones se incubaron primero por una hora con VAS2870 y posteriormente con peróxido de hidrógeno. Los efectos de este esquema de tratamiento se observan en el panel B(ii). La incubación con VAS2870 por una hora causa defectos morfológicos en los embriones que se revierten con la incubación con peróxido de hidrógeno. **(B)** Fenotipos de los embriones a las 24 hpf después de ser tratados con el esquema presentado en A. n=10 por tratamiento. N=3. **(C)** Fenotipos de los embriones a las 14 hpf que se trataron por una hora con el inhibidor VAS2870. De arriba a abajo, embrión 1, control (vehículo, DMSO 1%); embriones 2 y 3 fueron tratados con VAS2870 por una hora. La mayoría de los embriones incubados con VAS2870 por una hora no sobrevive a las 24 horas y los embriones que llegan a sobrevivir tienen defectos morfológicos. **(c')** Cuantificación de la sobrevivencia a las 24 horas de los embriones control (vehículo, DMSO 1%) y tratados por una hora con VAS2870. n=10 por tratamiento. N=3 Las barras de error representan la desviación estándar de la media. **(D)** Esquema de las estructuras de los productos de la reacción de VAS2870 10 μ M más 1 mM de peróxido de hidrógeno. N=3.

VAS2870 permanece integro y mantiene su actividad inhibitoria sobre las NADPH oxidasas en solución.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el peróxido de hidrógeno es una de las EOR derivadas de la actividad de NADPH oxidasas y su disminución afecta la progresión de la epibolia y la sobrevivencia de los embriones a las 24 hpf.

6. Discusión.

En la presente tesis se caracterizó la localización tanto de la enzima antioxidante GPx4 como la producción de EOR. Los patrones de localización observados mostraron ser dinámicos y con una distribución característica en cada una de las etapas del desarrollo analizadas. Estos patrones abren la posibilidad del estudio de cómo participan los mecanismos de producción y metabolismo de EOR en la fisiología celular en contexto de un organismo completo.

Por ejemplo, durante la gastrulación encontramos que la alteración de los niveles de EOR afecta un comportamiento celular fundamental, la motilidad celular. Lo anterior podría indicar que los mecanismos involucrados en la formación y metabolismo de EOR son importantes en procesos fundamentales del desarrollo embrionario.

Tomando en cuenta que fue a partir del estudio descriptivo del patrón de EOR observado durante la gastrulación del pez cebra, que se encontró evidencia a favor de que las EOR son requeridas para la motilidad celular durante la progresión de la epibolia. La discusión se enfocará a los resultados relacionados a las EOR y principalmente a la propuesta de las posibles funciones de las EOR durante el desarrollo embrionario a partir de la interpretación de los datos obtenidos de los patrones de EOR y de la enzima antioxidante GPx4.

6.1. Los patrones de tinción del DCF fluorescente indican la presencia de especies de oxígeno reactivas en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) son moléculas derivadas del oxígeno que participan en el control de procesos celulares fundamentales; como la proliferación, la muerte, la migración y la diferenciación celular (Covarrubias et al. 2008a).

El estudio descriptivo de los patrones de la localización de las EOR ha permitido encontrar evidencia de su importancia en procesos del desarrollo. Un ejemplo de esto es el papel descrito de las EOR en el desarrollo de las extremidades en ratón. En los embriones de ratón que fueron teñidos con DCFDA, la señal fluorescente de DCF indica la localización de EOR en el tejido interdigital de las extremidades, en el paladar y el

esternón. A su vez la descripción de los patrones de localización de EOR en estructuras embrionarias como la extremidad del ratón ha permitido estudiar la participación de las EOR en la regulación de la muerte celular durante la morfogénesis de la extremidad de ratón (Salas-Vidal et al., 2001; Schnabel et al. 2006).

Sin embargo, una limitante para analizar la función de las EOR en el desarrollo embrionario utilizando el ratón como modelo es que su desarrollo ocurre dentro del útero materno. Esto es una limitación para el análisis de la localización de las EOR en embriones completos y restringe el análisis a sólo algunas etapas y estructuras embrionarias. Debido a estas limitaciones metodológicas en el modelo de ratón, así como en otros modelos de vertebrados, en el presente trabajo se analizó la localización de las EOR durante el desarrollo utilizando como modelo el pez cebra, aprovechando la transparencia de los embriones y su desarrollo externo.

Para identificar a las EOR en los embriones completos de pez cebra, se utilizó el compuesto CM-H2DCFDA, que al ser oxidado forma DCF. En los embriones incubados con este compuesto se observó que la señal fluorescente de DCF se localiza principalmente en el espacio intersticial a lo largo del desarrollo embrionario (Fig. 13 y Fig. 20).

Aunque el DCFDA y sus análogos como el CM-H2DCFDA han sido ampliamente usados para la detección de EOR, también está documentado que esta metodología es susceptible a generar artefactos que afectan la interpretación de los resultados (Kalyanaraman et al. 2012). Para demostrar que la fluorescencia del DCF es un indicador de la localización de EOR en los embriones, en el presente trabajo se siguieron dos estrategias experimentales.

La primera estrategia fue incubar a los embriones con moléculas oxidantes, como el peróxido de hidrógeno o el tertbutil peróxido. En estos experimentos se observó que el tratamiento con moléculas oxidantes incrementan la fluorescencia del DCF, lo que indica que dentro de los embriones el CM-H2DCFDA es oxidado y modificado al DCF fluorescente (Fig. 22). Sin embargo, hay que mencionar que en las condiciones experimentales del estudio se requirieron concentraciones altas de peróxido de hidrógeno o de tert-butilperóxido (en comparación a las utilizadas para los experimentos de rescate, Fig. 25) para inducir la oxidación del CM-H2DCFDA en los embriones. Sin embargo, la

oxidación del CM-H2DCFDA dentro de los embriones por los agentes oxidantes puede estar limitada por la permeabilidad celular y/o por la actividad antioxidante endógena de los embriones. El blastodermo de los embriones de pez cebra está recubierto por un epitelio extraembrionario conocido como la capa envolvente, este epitelio es una barrera iónica y osmótica que se ha propuesto le permite a los embriones tolerar un rango extremo de condiciones osmóticas (Collazo, Bolker, y Keller 1994). Las características de la capa envolvente podrían disminuir la permeabilidad del peróxido o del tert-butil peróxido, permitiendo la tolerancia de altas concentraciones de oxidante. Además de la permeabilidad de los embriones, otro factor importante son los sistemas antioxidantes presentes en las células del embrión. Por ejemplo, la enzima antioxidante GPx4 se expresa y se localiza en todas las células del embrión de pez cebra a lo largo del desarrollo (Mendieta-Serrano et al. 2015). La presencia de los antioxidantes endógenos al inicio del tratamiento con oxidantes le permitiría a los embriones degradar parte del peróxido que logra permear la capa envolvente, provocando que se requieran concentraciones altas de peróxido o de terbutil peróxido para inducir la oxidación del CM-H2DCFDA en los embriones.

La segunda estrategia que se siguió para demostrar que la fluorescencia del DCF es un indicador de la localización de EOR, fue bloquear la fuente productora de EOR. La hipótesis detrás de estos experimentos fue la siguiente: si las EOR derivadas de una o varias fuentes fisiológicas son responsables de la oxidación del colorante CM-H2DCFDA dentro de los embriones entonces, la inhibición de la fuente productora debe disminuir la formación del DCF fluorescente. En los experimentos se encontró que la inhibición farmacológica de la actividad de NADPH oxidasa por medio del tratamiento con VAS2870, disminuyó la señal fluorescente del DCF en la etapa de epibolia (Fig. 23A). Este hallazgo indica que las EOR detectadas en los embriones completos al teñirlos con el CM-H2DCFDA son derivadas de la actividad de NADPH oxidasas. Por otro lado, nos aporta evidencia a favor de que la señal fluorescente de DCF es una manera indirecta de visualizar la localización de las EOR en los embriones completos vivos.

En conclusión estos experimentos apoyan que se puede utilizar al pez cebra como modelo para el análisis de la función de las EOR durante el desarrollo embrionario en vertebrados.

6.2. Las EOR participan durante las primeras divisiones celulares del embrión.

Las primeras etapas del desarrollo embrionario en animales se caracteriza por una alta tasa de división celular, lo que permite que la primera célula del cigoto se multiplique y aumente la densidad celular requerida para formar los tejidos del organismo.

Durante las primeras divisiones celulares del embrión de erizo de mar se ha propuesto que las EOR participan en la división celular de los blastómeros. La tinción de los embriones de erizo de mar con colorantes fluorescentes mostraron la presencia de EOR en el citoplasma de los blastómeros durante las primeras divisiones celulares. Adicionalmente, se encontró por inmunotinciones en cortes y en embriones completos, que la NADPH oxidasa Udx se localiza en la membrana plasmática de los embriones de erizo de mar durante las primeras divisiones celulares (Wong y Wessel, 2005). Wong y Wesel también mostraron que el tratamiento farmacológico con DPI inhibe la formación de EOR derivadas de la actividad de NADPH oxidasas, lo que causa un bloqueo de las primeras divisiones celulares (Wong y Wessel 2005). Este trabajo aporta evidencia experimental de que las EOR derivadas de la actividad de la NADPH oxidasa Udx localizada en la membrana plasmática son importantes para la división celular de los blastómeros.

En el caso de las plantas esta reportado que las EOR también son importantes para la división celular. Datos experimentales mostraron que la alteración de los niveles de EOR tiene múltiples repercusiones en los mecanismos moleculares que regulan las divisiones celulares, como la polimerización de la tubulina, el ensamblaje del uso mitótico, la dinámica de la membrana nuclear, la separación y el movimiento de los cromosomas (Livanos, Apostolakos, y Galatis 2012). Por lo anterior se puede proponer que la participación de las EOR en la división celular es un proceso conservado en animales y plantas.

En el caso de los embriones de pez cebra, en el presente proyecto se observó durante las primeras divisiones celulares una señal intensa de DCF localizada en los surcos de división, mientras que en los blastómeros se detectó una señal de DCF comparativamente baja (Fig. 13). La similitud en los patrones de tinción de la señal de DCF en los embriones de erizo y de pez cebra podrían indicar que las EOR participan en el control de la

división celular de los blastómeros en los embriones de pez cebra. La división de los blastómeros depende de diferentes mecanismos moleculares involucrados en el control del ciclo celular.

Se puede proponer que las EOR pueden participar en el control de dos procesos que ocurren en la división celular, 1) en el mecanismo molecular por el cual ocurre la citocinesis o 2) en promover el avance del ciclo celular.

1. Las EOR participan en la citocinesis de los blastómeros durante las primeras divisiones celulares del embrión.

En los embriones de pez cebra durante las primeras divisiones, los surcos de división están enriquecidos con miosina y filamentos de actina que participan en la formación de un anillo contráctil que participa en la citocinesis de los blastómeros (Webb et al. 2013). Por otro lado, en diferentes líneas celulares, se ha mostrado que la actividad mitocondrial es importante para la polimerización de actina (Zeller et al. 2013). Lo anterior está relacionado con el hecho de que las mitocondrias son transportadas al surco de división durante la citocinesis (Lawrence, Boucher, y Mandato 2016). Esta observación *in vitro* coincide con el enriquecimiento de mitocondrias en los surcos de división observado *in vivo* en embriones de pez en la etapa 16-células (Mendelsohn y Gitlin 2008). Finalmente en embriones de pez cebra en las etapas de 4- y 8-células, la enzima antioxidante GPx4 se localiza en el citoplasma de los blastómeros, pero en los surcos de división hay una menor acumulación de esta proteína (Fig. 6) (Mendieta-Serrano et al. 2015).

A partir de la evidencia experimental reportada en la literatura se puede proponer que las EOR localizadas en el surco de división aumentan o se acumulan por el reclutamiento de mitocondrias, sumado a una disminución de GPx4 en el surco. La localización de EOR en el surco de división afecta la polimerización de la actina en la banda contráctil requerida para la citocinesis de los blastómeros en las primeras divisiones celulares. En este caso las EOR podrían participar en los mecanismos moleculares encargados de la citocinesis durante las primeras divisiones de los blastómeros.

2. Las EOR promueven el avance del ciclo celular durante el desarrollo.

Diferentes observaciones en células de mamífero han mostrado que las EOR están involucradas en la proliferación celular regulando la transición de diferentes puntos de control del ciclo celular (Burhans y Heintz 2009). En el presente trabajo se observó que la señal de DCF es dinámica durante los ciclos de división celular previos a la transición de la blastula media (Fig. 14). En los embriones desde 64-células se observó que la señal de DCF presenta una dinámica oscilatoria en forma de oleadas que inician en el polo animal y se extienden de manera radial en dirección al polo vegetal (video 3 y 4). Este patrón oscilatorio es similar al de las divisiones celulares en embriones durante estas etapas (Keller et al. 2008; Olivier et al. 2010). Lo anterior podría indicar que durante los primeros 10 ciclos celulares ocurren oscilaciones en los niveles de EOR que pueden estar relacionadas con la progresión de la división celular.

En este sentido se puede proponer que la dinámica de EOR observada en los embriones de pez durante las primeras divisiones es causada por el reclutamiento de mitocondrias al surco de división que causa incrementos asociados a cada división celular. Sin embargo, otra posibilidad es que durante las divisiones celulares también participen NADPH oxidasas como en el caso de los embriones de erizo de mar (Wong y Wessel 2005). En este sentido, se sabe que el peróxido de hidrógeno facilita la transición a la fase de síntesis del ADN (Chen et al. 2004; Stone y Collins 2002). Lo anterior es relevante porque los ciclos celulares durante las primeras divisiones de los embriones de pez y rana ocurren de manera rápida y sincronizada (Kane y Kimmel 1993; Newport y Kirschner 1982). Los ciclos celulares durante esta etapa embrionaria se caracterizan por la ausencia de las fases “gap”, por lo que el ciclo celular oscila entre las fases de síntesis del ADN y de mitosis (Langley et al. 2014). Experimentos recientes en nuestro laboratorio indican la expresión de por lo menos cuatro NADPH oxidasas durante la gastrulación (Javier Mendez-Cruz, comunicación personal), sin embargo falta corroborar si en las etapas correspondientes a las primeras divisiones hay herencia materna de NADPH oxidasas.

Asumiendo que durante las primeras divisiones está presente una o varias NADPH oxidasas, se puede especular que en los embriones de pez cebra que durante las primeras divisiones celulares puede ocurrir una activación temporal de las NADPH oxidasas que

eleva la concentración de EOR promoviendo el avance a la fase de síntesis. Estos aumentos temporales de la concentración de EOR para la progresión del ciclo celular podrían explicar la dinámica observada en los embriones de pez cebra durante las primeras divisiones celulares (video 3 y 4).

Sin embargo, aún falta analizar si las EOR observadas en estas etapas son derivadas de la actividad de NADPH oxidasas o de la actividad de las mitocondrias que se reclutan en el surco de división.

En resumen, la presencia de EOR en los surcos de división y la dinámica durante las primeras divisiones podrían indicar la participación de EOR durante las primeras divisiones de los blastómeros.

6.3. Localización y dinámica de las EOR en el espacio intersticial durante el desarrollo embrionario.

Las EOR generadas por la actividad de NADPH oxidasas son liberadas al espacio extracelular y posteriormente pueden permear al interior de la célula donde funcionan como mediadores de la señalización intracelular activando blancos moleculares como; factores de transcripción, cinasas, fosfatasas y canales iónicos (Veal, Day, y Morgan 2007). En los embriones de pez cebra encontramos que la señal fluorescente de DCF se localiza principalmente en el espacio intersticial formado entre los blastómeros a partir de la etapa de 64-células y en el espacio intersticial formado entre las células profundas durante la progresión de la epibolia (Fig. 16D) Además, en los embriones se observaron cambios locales en la intensidad de la fluorescencia del DCF que sugieren que la formación de EOR en el espacio intersticial es dinámica (Fig. 14).

Una pregunta que surge en relación a estas observaciones es la siguiente: ¿cuál es la fuente que genera las EOR que se acumulan en el espacio intersticial? Como se mencionó en la introducción, una fuente importante de EOR son las NADPH oxidasas. Se sabe que estos complejos proteicos se localizan en la membrana plasmática y producen EOR de manera regulada que se liberan al espacio extracelular (Bedard y Krause 2007). En los embriones, las EOR se localizan principalmente en el espacio intersticial, lo cual es un indicativo de que estas EOR son derivadas de la actividad de NADPH oxidasas.

Otra observación interesante son los cambios en la intensidad de la fluorescencia del DCF en el espacio intersticial (Fig. 14 y Fig. 15) que se pueden interpretar como cambios en la concentración de EOR. Sin embargo, ésta dinámica en el espacio intersticial puede tener dos interpretaciones: 1) puede ser reflejo de incrementos locales de la actividad enzimática de las NADPH oxidasas que aumentan la concentración de EOR localmente. En este sentido, se asume que en las condiciones experimentales utilizadas solo se podrían detectar incrementos en la concentración de EOR, debido a que el CM-H2DCFDA se oxida de forma no reversible a la forma DCF fluorescente. 2) Los cambios de intensidad del DCF reflejan la dinámica de las EOR en el fluido intersticial. En este caso, se podría pensar que todo el fluido intersticial está cargado con CM-H2DCFDA y en cierto momento un porcentaje del CM-H2DCFDA se oxida y se modifica en DCF por la producción local de EOR derivadas de la NADPH oxidasas. Posteriormente, debido a los movimientos de las células el espacio intersticial formado entre ellas, cambia el volumen y como consecuencia se redistribuye el fluido intersticial provocando que el DCF fluorescente cambie de localización, invadiendo otras regiones del espacio intersticial, lo que en apariencia se detectaría como un cambio de intensidad en otra región. Hasta el momento se desconoce como contribuye la dinámica del espacio intersticial y del fluido contenido en este espacio en procesos de señalización celular en embriones completos.

La señalización celular por medio de EOR a través del espacio intersticial podría ser importante, por ejemplo en larvas de pez cebra de tres días de desarrollo se ha observado que al provocar una herida en la aleta caudal, el daño induce la formación de un gradiente de peróxido de hidrógeno que emana desde la herida, y funciona como un quimiotractor de neutrófilos y macrófagos al sitio de la herida. En esos experimentos, la medición del gradiente se realizó con HyPer intracelular, que es sensor proteico de peróxido de hidrógeno (Niethammer et al. 2009). Hasta el momento se desconoce si en la amplificación de la señal por el gradiente está involucrado el espacio intersticial. En este sentido, las observaciones realizadas en el presente trabajo sugieren que el fluido contenido en el espacio intersticial podría funcionar como una vía para la difusión de las EOR, permitiendo que funcionen como una señal de tipo paracrina.

6.4. Las especies de oxígeno reactivas participan en el control de la progresión de la epibolia.

La epibolia es el primer movimiento morfogenético de la gastrulación en el embrión de pez cebra. Este movimiento se caracteriza por la migración masiva de las células del blastodermo en dirección vegetal. La motilidad de las células depende de diferentes factores como la dinámica del citoesqueleto, la formación de proyecciones celulares y los cambios de adhesividad (Bruce 2015). Durante la progresión de la epibolia, el embrión está formado por tres linajes celulares, la capa envolvente, que es un epitelio extraembrionario que recubre el blastodermo; la capa de células profundas, que son células mesenquiáticas que contribuyen a la formación del embrión; y los núcleos localizados en el vitelo. Estos tres linajes celulares realizan el movimiento de epibolia, la capa envolvente y las células profundas se mueven recubriendo el vitelo, mientras que los núcleos del vitelo presentan patrones de migración que siguen los movimientos de epibolia de las células profundas (D'Amico y Cooper 2001; Bruce 2015).

Durante la progresión de la epibolia se observó que las EOR se localizan de la siguiente manera:

La señal de DCF se detectó en el espacio intersticial formado entre las células profundas (Fig. 17 y Fig. 20), que disminuye con el tratamiento farmacológico (Fig. 24). A partir de estos resultados se puede proponer que las EOR formadas en el fluido intersticial que baña a las células profundas promueve su migración por epibolia. Una pregunta que surge a partir de esta hipótesis es la siguiente ¿cómo contribuyen las EOR a la migración por epibolia de las células profundas?

Se pueden proponer dos modelos que podrían responder a esta pregunta.

1) El modelo de gradiente de EOR, donde estas funcionan como un quimioattractor que estimula el movimiento por epibolia de las células profundas.

Como se mencionó, las EOR y en particular el peróxido de hidrógeno, puede funcionar como una señal paracrina en larvas de tres días (Niethammer et al. 2009). En el caso de los embriones, este mecanismo tendría que depender de la formación de un gradiente de EOR de mayor concentración en el polo vegetal que va decreciendo hacia el

polo animal. Este gradiente de EOR se podría establecer por alguna de las siguientes maneras a) Por la activación localizada de la fuente productora de EOR y la formación del gradiente por la difusión de EOR desde la fuente, b) Por una producción de EOR generalizada en todas las células en donde el gradiente se forma por la actividad de los antioxidantes endógenos que restringe la acumulación de las EOR, o c) por la formación de patrones complementarios de formación/degradación de EOR.

En el caso de los embriones de pez cebra se observó que la señal fluorescente del DCF está en todo el espacio intersticial y es más intensa en la cavidad marginal localizada en el frente de migración que lidera la progresión de la epibolia. Este patrón de las EOR da la apariencia de que podría existir un gradiente que difunde desde la cavidad marginal en el frente de migración (Fig. 20). De esta manera el gradiente sería interpretado por las células para moverse en dirección a la cavidad marginal. Otro elemento que podría contribuir a la formación del gradiente es el hecho de que se observó que la GPx4 se localiza en las células del blastodermo, pero no se detectó en el frente de migración de las células profundas (Fig. 9) que es donde se observa la mayor intensidad de fluorescencia del DCF en la cavidad marginal. Otra posibilidad es que las EOR se liberan al espacio intersticial formado entre las células profundas del embrión, y es la actividad de las enzimas antioxidantes como la GPx4 las que generan el gradiente, al permitir la acumulación en el frente de migración de la epibolia.

2) Las EOR participan en la motilidad de las células profundas.

La otra posibilidad es que las EOR regulen la motilidad de las células del blastodermo, en particular de las células profundas. Por ejemplo, estudios en embriones de mosca mostraron que el peróxido de hidrógeno regula las uniones adherentes que son importantes para la migración normal de las células germinales durante la gastrulación. En el caso de los embriones de pez cebra, cuando se inhibió farmacológicamente la actividad de las NADPH oxidasas, se observó que la capa profunda disminuye su migración por epibolia, mientras que la capa envolvente y los núcleos del vitelo continúan su movimiento de epibolia de manera similar a los embriones control (Fig. 24). En este sentido se ha propuesto que los mecanismos que controlan la migración de las células de la capa envolvente son independientes de la migración de las células de la capa profunda y de los

núcleos del vitelo (Bruce 2015). Tomando en cuenta lo anterior, el fenotipo que presentan los embriones con disminución de EOR se puede explicar por una afectación de la capacidad de la motilidad de las células profundas. Se sabe que la migración de las células profundas depende de la capacidad de estas células para modular su adhesividad entre ellas. La forma en como se modula la adhesividad es incrementando o disminuyendo los niveles de E-cadherina que forma parte de las uniones adherentes (Song et al. 2013). En los embriones con pérdida de función parcial o total para la E-cadherina se afecta en diferentes grados el movimiento de epibolia de las células profundas, mientras que los movimientos de epibolia de la capa envolvente y los núcleos del vitelo no se ven afectados (Lachnit, Kur, y Driever 2008; Song et al. 2013). A partir de estas observaciones, se ha propuesto que los defectos de la migración de las células profundas asociados a la disminución de E-cadherina se debe a defectos en la adhesividad de las células profundas más externas que deberían estar en contacto con la superficie basal de la capa envolvente (Bruce 2015).

Otro gen que al alterarse su expresión causa un fenotipo en los embriones de pez cebra similar a los asociados con la disminución de E-cadherina, es el gen *pou5f3*. La mutación de este gen causa que los mutantes materno - cigóticos (*spiel-ohne-grenzen*, *MZspg*) presenten defectos en la epibolia de las células profundas. En estos mutantes las células de la capa profunda tienen defectos en el tráfico por endocitosis de la E-cadherina, lo que evita el recambio de E-cadherina en la membrana plasmática, y como consecuencia se afecta la dinámica de la adhesión celular necesaria para la migración normal de las células profundas durante la epibolia (Song et al. 2013).

Por la similitud entre los fenotipos mutantes en E-cadherina y en *MZspg* con el fenotipo que presentan los embriones donde se inhibió la actividad de NADPH oxidasa, se puede pensar que las EOR en el espacio intersticial participan en la regulación de la adhesión entre las células profundas.

Para el caso de los embriones de pez cebra se puede proponer que la formación dinámica de EOR derivadas de la actividad de las NADPH oxidasas afecta la estabilidad de las uniones adherentes dependientes de E-cadherina, lo cual permite regular la dinámica de adhesión de las células profundas durante su migración en la epibolia. Por otro lado, es posible que cuando se inhibe la actividad de NADPH oxidasas se disminuye los niveles de

EOR derivadas de la actividad catalítica de estas enzimas. Esta disminución de EOR podría afectar la dinámica de la adherencia de las células profundas, permitiendo la estabilización de la E-caderina presente en las uniones adherentes de las células profundas, teniendo como consecuencia una disminución en su migración. Aún quedaría evaluar por inmunofluorescencia si la localización de E-caderina se ve afectada en los embriones con disminución de EOR, o evaluar si los niveles de E-caderina cambian por medio de ensayos de westernblot.

6.5. Los patrones de localización de EOR y de la GPx4 son complementarios durante el desarrollo.

El desarrollo de los dígitos en la extremidad embrionaria de ratón, es un ejemplo claro de cómo los patrones de formación de EOR y de la localización de enzimas antioxidantes son complementarios y están involucrados en el control de comportamientos celulares como la muerte celular (Schnabel et al. 2006).

En el caso del pez cebra se observó que los patrones de distribución de la enzima antioxidante GPx4 y de las EOR tienen una localización complementaria. La relación complementaria de los patrones de localización de la GPx4 y de las EOR se observó en tres períodos del desarrollo embrionario.

1) Durante las primeras divisiones, se observó que las EOR se encuentran enriquecidas en los surcos de división. De manera contraria, la localización de GPx4 está enriquecida en los blastómeros, mientras que en los surcos de división se encuentra ausente. Como se discutió, este patrón sugiere que las EOR podrían participar en la citocinesis de los blastómeros durante las primeras etapas del desarrollo.

2) Más adelante en el desarrollo, a partir de la etapa de 64-células se forma un espacio intersticial entre los blastómeros, en el cual se encuentran enriquecidas las EOR. De manera contraria, la GPx4 se localiza en los blastómeros y se encuentra ausente en el espacio intersticial. Estos patrones sugieren que las EOR derivadas de la actividad de NADPH oxidasas pueden difundir a través del espacio intersticial afectando blancos sensibles a la oxidación tanto extracelulares como intracelulares.

3) Por último, en embriones a las 24 horas de desarrollo, la GPx4 se localiza en los miótomos (Fig. 12) (Mendieta-Serrano et al. 2015). Estas estructuras embrionarias derivan del mesodermo y la mayor parte de ellas se diferencian a músculo (Stickney, Barresi, y Devoto 2000). En el presente trabajo se encontró que la GPx4 reportada previamente en los miotomos se ubica en las fibras musculares rápidas (Mendieta-Serrano et al. 2015). De manera contraria, en los mioseptos, que son los límites entre cada miotomo, no se detectó la presencia de GPx4. En el caso de las EOR, reportamos que las EOR están enriquecidas en los mioseptos mientras que en los miotomos los niveles de EOR son bajos (Mendieta-Serrano 2011). Estos patrones complementarios en los mitomos puede sugerir que los niveles bajos de EOR podrían participar en la diferenciación de tejidos, como sería el caso de la diferenciación de los mioblastos a células musculares que ocurre en los miotomos. Esta idea se apoya en la evidencia experimental *in vivo* e *in vitro* que muestra que las condiciones intracelulares oxidantes afectan la diferenciación de los mioblastos, mientras que la expresión de antioxidantes mantiene condiciones reductoras que favorecen la miogénesis (L'honoré et al. 2014; Hansen et al. 2007).

7. Conclusiones.

En el presente trabajo se encontró evidencia a favor de que una enzima antioxidante involucrada en el metabolismo de EOR como la GPx4, tiene patrones de localización muy característicos en diferentes etapas del desarrollo embrionario, lo que sugiere su participación en diversos procesos del desarrollo embrionario.

Por otro lado, se encontró evidencia de la presencia de EOR a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra. Durante la progresión de la epibolia las EOR detectadas en el embrión son generadas por la actividad de NADPH oxidasas y se liberan al espacio intersticial formado entre las células profundas que contribuyen al embrión. La presencia de EOR en el espacio intersticial promueve la migración por epibolia de las células profundas en el blastodermo durante la gastrulación del pez cebra.

La formación de patrones complementarios entre enzimas antioxidantes como la GPx4 y las EOR podrían indicar que durante el desarrollo embrionario existe una regulación espacio temporal compleja de los mecanismos encargados de mantener la homeostasis redox durante el desarrollo embrionario. Esto abre la puerta al análisis de cómo contribuye la señalización redox en el control de los diferentes comportamientos celulares, como la migración celular, indispensables para la formación de un organismo multicelular.

8. Perspectivas.

La evidencia presentada en esta tesis apoya la idea de que los mecanismos involucrados en la formación y metabolismo de EOR son importantes para la regulación de procesos del desarrollo embrionario como la gastrulación de vertebrados. En este sentido, el presente trabajo abre perspectivas muy interesantes.

En primer lugar aún se desconoce si los patrones que presentan las enzimas antioxidantes como la GPx4 en momentos particulares del desarrollo tienen un papel biológico durante el desarrollo embrionario. En este sentido, se vuelve interesante analizar el efecto de alterar los patrones de localización de enzimas antioxidantes como la GPx4. Esto se podría realizar experimentalmente al inducir la expresión ectópica o por la pérdida de función de esta enzima antioxidante en los embriones. En relación a los ensayos de pérdida de función, en el presente trabajo se mostró de manera preliminar que la pérdida de función parcial de GPx4b arresta el desarrollo embrionario durante la gastrulación. Esta observación sugiere que la expresión de enzimas antioxidantes como la GPx4 es importante durante el desarrollo embrionario.

En segundo lugar, en el presente trabajo se encontró que las EOR participan en la regulación de la migración celular durante la epibolia, sin embargo, no fue el único proceso donde se detectó la presencia de EOR en el desarrollo embrionario. En este sentido se vuelve interesante analizar si los patrones de EOR detectados a lo largo del desarrollo tienen una participación en la regulación de diferentes procesos a nivel celular o del embrión completo o en el caso contrario, si la presencia de las EOR es una consecuencia del metabolismo celular. Por otro lado se vuelve importante analizar si las EOR presentes en el embrión se generan exclusivamente a partir de la actividad de las NADPH oxidasas, o si hay otras fuentes relevantes de generación de EOR como las mitocondrias. De igual manera que en el caso de las enzimas antioxidantes, sería interesante analizar que es lo que determina los patrones de localización de EOR, por un lado, si es la localización particular de las fuentes productoras de EOR o si las EOR se forman de manera ubicua y son los patrones de actividad antioxidante los que determinan donde y como se localizan las EOR para que actúen como mediadores de la señalización intra o extracelular.

9. Bibliografía.

- Abràmoff, Michael D., Paulo J. Magalhães, y Sunanda J. Ram. 2004. «Image processing with imageJ». *Biophotonics International*. doi:10.1117/1.3589100.
- Aguirre, Jesús, y J David Lambeth. 2010. «Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals.» *Free radical biology & medicine* 49 (9): 1342-53. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027.
- Al Ghouleh, Imad, Andrés Rodríguez, Patrick J Pagano, y Gábor Csányi. 2013. «Proteomic analysis identifies an NADPH oxidase 1 (Nox1)-mediated role for actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (ARPC2) in promoting smooth muscle cell migration.» *International journal of molecular sciences* 14 (10): 20220-35. doi:10.3390/ijms141020220.
- Baker, C J, K Deahl, J Domek, y E W Orlandi. 1998. «Oxygen metabolism in plant/bacteria interactions: effect of DPI on the pseudo-NAD(P)H oxidase activity of peroxidase.» *Biochemical and biophysical research communications* 252 (2): 461-64. doi:10.1006/bbrc.1998.9665.
- Bedard, Karen, y Karl-Heinz Krause. 2007. «The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.» *Physiological reviews* 87 (1): 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
- Berridge, Michael V, Patries M Herst, y An S Tan. 2005. «Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.» *Biotechnology annual review* 11 (enero): 127-52. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7.
- Brigelius-Flohé, Regina, y Matilde Maiorino. 2013. «Glutathione peroxidases.» *Biochimica et biophysica acta* 1830 (5): 3289-3303. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- Bruce, Ashley E.E. 2015. «Zebrafish epiboly: Spreading thin over the yolk». *Developmental Dynamics* 243 (7): n/a-n/a. doi:10.1002/dvdy.24353.
- Burhans, William C., y Nicholas H. Heintz. 2009. «The cell cycle is a redox cycle: Linking

- phase-specific targets to cell fate». *Free Radical Biology and Medicine* 47 (9). Elsevier Inc.: 1282-93. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026.
- Cárdenas, Luis, Adán Martínez, Federico Sánchez, y Carmen Quinto. 2008. «Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs)». *The Plant Journal* 56 (5): 802-13. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03644.x.
- Chen, K C, Y Zhou, K Xing, K Krysan, y M F Lou. 2004. «Platelet derived growth factor (PDGF)-induced reactive oxygen species in the lens epithelial cells: the redox signaling». *Exp Eye Res* 78 (6): 1057-67. doi:10.1016/j.exer.2004.02.004.
- Collazo, Andres, Jessica A Bolker, y Ray Keller. 1994. «A Phylogenetic Perspective on Teleost Gastrulation». JOUR. *The American Naturalist* 144 (1). [University of Chicago Press, American Society of Naturalists]: 133-52. <http://www.jstor.org/stable/2462805>.
- Cooper, Mark S, Daniel P Szeto, Greg Sommers-Herivel, Jacek Topczewski, Lila Solnica-Krezel, Hee-Chol Kang, Iain Johnson, y David Kimelman. 2005. «Visualizing morphogenesis in transgenic zebrafish embryos using BODIPY TR methyl ester dye as a vital counterstain for GFP.» *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 232 (2): 359-68. doi:10.1002/dvdy.20252.
- Cooper, M S, L a D'Amico, y C a Henry. 1999. «Analyzing morphogenetic cell behaviors in vitally stained zebrafish embryos.» *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 122 (enero): 185-204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10231793>.
- Covarrubias, Luis, David Hernández-García, Denhí Schnabel, Enrique Salas-Vidal, y Susana Castro-Obregón. 2008a. «Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?» *Developmental Biology* 320 (1): 1-11. doi:10.1016/j.ydbio.2008.04.041.
- . 2008b. «Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?» *Developmental Biology* 320 (1): 1-11. doi:10.1016/j.ydbio.2008.04.041.
- D'Amico, Leonard A., y Mark S Cooper. 2001. «Morphogenetic domains in the yolk

- syncytial layer of axiating zebrafish embryos». *Developmental Dynamics* 222 (4): 611-24. doi:10.1002/dvdy.1216.
- Dalton, Timothy P, Howard G Shertzer, y Alvaro Puga. 1999. «Regulation of gene expression by reactive oxygen». *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 67-101.
- Davies, KelvinJ.A. 1988. «A Secondary Antioxidant Defense Role for Proteolytic Systems». CHAP. En *Oxygen Radicals in Biology and Medicine SE - 90*, editado por MichaelG. Simic, KarenA. Taylor, JohnF. Ward, y Clemens von Sonntag, 49:575-85. Basic Life Sciences. Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-5568-7_90.
- Egan, Martin J, Zheng-Yi Wang, Mark A Jones, Nicholas Smirnov, y Nicholas J Talbot. 2007. «Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (28): 11772-77. doi:10.1073/pnas.0700574104.
- Etienne-Manneville, Sandrine, y Alan Hall. 2002. «Rho GTPases in cell biology.» *Nature* 420 (6916): 629-35. doi:10.1038/nature01148.
- Finkel, Toren. 2011. «Signal transduction by reactive oxygen species» 194 (1). doi:10.1083/jcb.201102095.
- Fisher, Steven a. 2007. «The developing embryonic cardiac outflow tract is highly sensitive to oxidant stress.» *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236 (12): 3496-3502. doi:10.1002/dvdy.21373.
- Foreman, Julia, Vadim Demidchik, John H F Bothwell, Panagiota Mylona, Henk Miedema, Miguel Angel Torres, Paul Linstead, et al. 2003. «Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth.» *Nature* 422 (6930). Nature Publishing Group: 442-46. doi:10.1038/nature01485.
- Fuentes, Ricardo, y Juan Fernández. 2010. «Ooplasmic segregation in the zebrafish zygote and early embryo: Pattern of ooplasmic movements and transport pathways». *Developmental Dynamics* 239 (8): 2172-89. doi:10.1002/dvdy.22349.
- Gapper, Catherine. 2006. «Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species». *PLANT PHYSIOLOGY* 141 (2): 341-45. doi:10.1104/pp.106.079079.

- Gromer, S., J. K. Eubel, B. L. Lee, y J. Jacob. 2005. «Human selenoproteins at a glance». *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-005-5143-y.
- Halliwell, Barry, y Carroll E Cross. 1994. «Oxygen-derived Species : Their Relation to Human Disease and Environmental Stress», n.º 2: 5-12.
- Hansen, Jason M., Markus Klass, Craig Harris, y Marie Csete. 2007. «A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: Implications for regeneration in aged muscle». *Cell Biology International* 31 (6): 546-53. doi:10.1016/j.cellbi.2006.11.027.
- Hattori, Hidenori, Kulandayan K Subramanian, Jiro Sakai, y Hongbo R Luo. 2010. «Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis.» *Communicative & integrative biology* 3 (3): 278-81. doi:10.1073/pnas.0914351107.eutrophil.
- Herbette, Stéphane, Patricia Roeckel-Drevet, y Joël R Drevet. 2007. «Seleno-Independent Glutathione Peroxidases. More than Simple Antioxidant Scavengers.» *The FEBS Journal* 274 (9). Blackwell Publishing Ltd: 2163-80. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x.
- Hernández-García, David, Christopher D. Wood, Susana Castro-Obregón, y Luis Covarrubias. 2010. «Reactive oxygen species: A radical role in development?» *Free Radical Biology and Medicine* 49 (2). Elsevier Inc.: 130-43. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.020.
- Holmström, Kira M., y Toren Finkel. 2014. «Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (6). Nature Publishing Group: 411-21. doi:10.1038/nrm3801.
- Huang, Zhi, Jun Li, Sichun Zhang, y Xinrong Zhang. 2009. «Inorganic arsenic modulates the expression of selenoproteins in mouse embryonic stem cell» 187: 69-76. doi:10.1016/j.toxlet.2009.01.024.
- Hurd, Thomas Ryan, Matthew DeGennaro, y Ruth Lehmann. 2012. «Redox regulation of cell migration and adhesion». *Trends in Cell Biology* 22 (2). Elsevier Ltd: 107-15. doi:10.1016/j.tcb.2011.11.002.

- Kalyanaraman, Balaraman, Victor Darley-USmar, Kelvin J.A. Davies, Phyllis A. Dennery, Henry Jay Forman, Matthew B. Grisham, Giovanni E. Mann, Kevin Moore, L. Jackson Roberts, y Harry Ischiropoulos. 2012. «Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations». *Free Radical Biology and Medicine* 52 (1). Elsevier Inc.: 1-6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.
- Kane, D A, y C B Kimmel. 1993. «The zebrafish midblastula transition.» *Development (Cambridge, England)* 119 (2): 447-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8287796>.
- Keller, Philipp J, Annette D Schmidt, Joachim Wittbrodt, y Ernst H K Stelzer. 2008. «Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy.» *Science (New York, N.Y.)* 322 (5904): 1065-69. doi:10.1126/science.1162493.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, y Thomas F. Schilling. 1995. «Stages of embryonic development of the zebrafish». *Developmental Dynamics* 203 (3): 253-310. doi:10.1002/aja.1002030302.
- L'honoré, Aurore, Pierre-Henri Commère, Jean-François Ouimette, Didier Montarras, Jacques Drouin, y Margaret Buckingham. 2014. «Redox Regulation by Pitx2 and Pitx3 Is Critical for Fetal Myogenesis». *Developmental Cell* 29 (4): 392-405. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.006.
- Lachnit, Martina, Esther Kur, y Wolfgang Driever. 2008. «Alterations of the cytoskeleton in all three embryonic lineages contribute to the epiboly defect of Pou5f1 / Oct4 deficient MZ spg zebrafish embryos». *Developmental Biology* 315 (1). Elsevier Inc.: 1-17. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.008.
- Langley, Alexander R, James C Smith, Derek L Stemple, y Steven a Harvey. 2014. «New insights into the maternal to zygotic transition.» *Development* 141: 3834-41. doi:10.1242/dev.102368.
- Lara-Ortíz, Teresa, Héctor Riveros-Rosas, y Jesús Aguirre. 2003. «Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in

- Aspergillus nidulans». *Molecular Microbiology* 50 (4): 1241-55. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03800.x.
- Lawrence, E J, E Boucher, y C A Mandato. 2016. «Mitochondria-cytoskeleton associations in mammalian cytokinesis.» *Cell division* 11 (1). BioMed Central: 3. doi:10.1186/s13008-016-0015-4.
- Lejeune, Danielle, Mohammad Hasanuzzaman, Amanda Pitcock, Joseph Francis, y Inder Sehgal. 2006. «The superoxide scavenger TEMPOL induces urokinase receptor (uPAR) expression in human prostate cancer cells.» *Molecular cancer* 5: 21. doi:10.1186/1476-4598-5-21.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y Park, y Jun-Lin Guan. 2007. «In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro». *Nature Protocols* 2 (2): 329-33. doi:10.1038/nprot.2007.30.
- Lin, Jhih-rong, y Jianjun Hu. 2013. «SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring.» *PloS one* 8 (10): e76864. doi:10.1371/journal.pone.0076864.
- Link, Vinzenz, Lara Carvalho, Irinka Castanon, Petra Stockinger, Andrej Shevchenko, y Carl-philipp Heisenberg. 2006. «Identification of regulators of germ layer morphogenesis using proteomics in zebrafish» 2. doi:10.1242/jcs.02928.
- Livanos, Pantelis, Panagiotis Apostolakos, y Basil Galatis. 2012. «Plant cell division». *Plant Signaling & Behavior* 7 (7): 771-78. doi:10.4161/psb.20530.
- Love, Nick R., Yaoyao Chen, Shoko Ishibashi, Paraskevi Kritsiligkou, Robert Lea, Yvette Koh, Jennifer L. Gallop, Karel Dorey, y Enrique Amaya. 2013a. «Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful Xenopus tadpole tail regeneration». *Nature Cell Biology* 15 (2): 222-28. doi:10.1038/ncb2659.
- Love, Nick R, Yaoyao Chen, Shoko Ishibashi, Paraskevi Kritsiligkou, Robert Lea, Yvette Koh, Jennifer L Gallop, Karel Dorey, y Enrique Amaya. 2013b. «Amputation-Induced Reactive Oxygen Species Are Required for Successful Xenopus Tadpole Tail Regeneration.» *Nature Cell Biology* 15 (2). Nature Publishing Group: 222-28.

doi:10.1038/ncb2659.

Maiorino, Fursini M., R. Brigelius-Flohé, K.D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, y L. Flohé. 1995. *Biothiols Part B: Glutathione and Thioredoxin: Thiols in Signal Transduction and Gene Regulation. Methods in Enzymology*. Vol. 252. Methods in Enzymology. Elsevier. doi:10.1016/0076-6879(95)52007-4.

McCurley, Amy T, y Gloria V Callard. 2008. «Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment.» *BMC molecular biology* 9 (enero): 102. doi:10.1186/1471-2199-9-102.

Mendelsohn, Bryce A, y Jonathan D Gitlin. 2008. «Coordination of development and metabolism in the pre-midblastula transition zebrafish embryo.» *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (7): 1789-98. doi:10.1002/dvdy.21584.

Mendieta-Serrano, Mario A. 2011. «Análisis del efecto de la pérdida de función de la Rho GTPasa Rac1 en la expresión de selenoproteínas durante el desarrollo embrionario del pez cebra». Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. doi:javascript:open_window("http://oreon.dgbiblio.unam.mx:80/F/KP2MX7K6BHVNEFKF54ASKP5B24M3YRKD8P3RETFYYSQTFNML1-50488?func=service&doc_library=TES01&doc_number=000672245&line_number=0001&func_code=WEB-FULL&service_type=MEDIA%22);

Mendieta-Serrano, Mario A, Denhi Schnabel, Hilda Lomelí, y Enrique Salas-Vidal. 2013. «Cell proliferation patterns in early zebrafish development.» *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 296 (5): 759-73. doi:10.1002/ar.22692.

Mendieta-Serrano, Mario A, Denhi Schnabel, Hilda Lomelí, y Enrique Salas-Vidal. 2015. «Spatial and temporal expression of zebrafish glutathione peroxidase 4 a and b genes during early embryo development.» *Gene expression patterns : GEP* 19 (1-2): 98-107. doi:10.1016/j.gep.2015.08.003.

Mills, Gordon C. 1957. «HEMOGLOBIN CATABOLISM. I. GLUTATHIONE PEROXIDASE, AN ERYTHROCYTE ENZYME WHICH PROTECTS

HEMOGLOBIN FROM OXIDATIVE BREAKDOWN». *J. Biol. Chem.* 229 (1): 189-97. <http://www.jbc.org/cgi/content/long/229/1/189>.

Mojica, Mayra Antúnez, Alejandra León, Andrés M. Rojas-Sepúlveda, Silvia Marquina, Mario A. Mendieta-Serrano, Enrique Salas-Vidal, María Luisa Villarreal, y Laura Alvarez. 2016. «Aryldihydronaphthalene-type lignans from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* and their antimitotic mechanism of action». *RSC Adv.* 6 (6): 4950-59. doi:10.1039/C5RA23516B.

Moldovan, Leni, Karthikeyan Mythreya, Pascal J. Goldschmidt-Clermont, y Lisa L. Satterwhite. 2006. «Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1». *Cardiovascular Research* 71 (2): 236-46. doi:10.1016/j.cardiores.2006.05.003.

Moller, Ian M. 2001. «PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species.» *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52 (1): 561-91. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.561.

Montero, Juan-Antonio, Lara Carvalho, Michaela Wilsch-Bräuninger, Beate Kilian, Chigdem Mustafa, y Carl-Philipp Heisenberg. 2005. «Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation.» *Development (Cambridge, England)* 132 (6): 1187-98.

Montiel, Jesús, Noreide Nava, Luis Cárdenas, Rosana Sánchez-López, Manoj-Kumar Arthikala, Olivia Santana, Federico Sánchez, y Carmen Quinto. 2012. «A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by *Rhizobia*.» *Plant & cell physiology* 53 (10): 1751-67. doi:10.1093/pcp/pcs120.

Newport, John, y Marc Kirschner. 1982. «A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage». *Cell* 30 (3): 675-86. doi:10.1016/0092-8674(82)90272-0.

Niethammer, Philipp, Clemens Grabher, A Thomas Look, y Timothy J Mitchison. 2009. «A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish». *Nature* 459 (7249): 996-99. doi:10.1038/nature08119.

- Olivier, Nicolas, Israël Veilleux, Xavier Solinas, Delphine Débarre, Paul Bourguine, y Andrés Santos. 2010. «Cell Lineage Reconstruction of Early». *Science* 967. doi:10.1126/science.1189428.
- Oteíza, Pablo, Mathias Köppen, Miguel L Concha, y Carl-Philipp Heisenberg. 2008. «Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish.» *Development (Cambridge, England)* 135 (16): 2807-13. doi:10.1242/dev.022228.
- Panieri, Emiliano, y Massimo M. Santoro. 2015. «ROS signaling and redox biology in endothelial cells». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (17): 3281-3303. doi:10.1007/s00018-015-1928-9.
- Popgeorgiev, Nikolay, Benjamin Bonneau, Karine F. Ferri, Julien Prudent, Julien Thibaut, y Germain Gillet. 2011. «The Apoptotic Regulator Nr2 Controls Cytoskeletal Dynamics via the Regulation of Ca²⁺ Trafficking in the Zebrafish Blastula». *Developmental Cell* 20 (5). Elsevier Inc.: 663-76. doi:10.1016/j.devcel.2011.03.016.
- Ramel, Fanny, Cécile Sulmon, Matthieu Bogard, Ivan Couée, y Gwenola Gouesbet. 2009. «Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets». *BMC Plant Biology* 9 (1): 28. doi:10.1186/1471-2229-9-28.
- Roberts, Thomas H., Kenneth M. Fredlund, y Ian M. Møller. 1995. «Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria». *FEBS Letters* 373 (3): 307-9. doi:10.1016/0014-5793(95)01059-N.
- Salas-vidal, E, H Lomelí, S Castro-obregón, R Cuervo, D Escalante-alcalde, y L Covarrubias. 1998. «Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death». *Exp. Cell Res.* 238: 136-47.
- Salas-Vidal, Enrique, Hilda Lomelí, Susana Castro-Obregón, Rodrigo Cuervo, Diana Escalante-Alcalde, y Luis Covarrubias. 1998. «Reactive Oxygen Species Participate in the Control of Mouse Embryonic Cell Death». *Experimental Cell Research* 238 (1): 136-47. doi:10.1006/excr.1997.3828.

- Salas-Vidal, Enrique, Concepción Valencia, y Luis Covarrubias. 2001. «Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis». *Developmental Dynamics* 220 (4): 295-306. doi:10.1002/dvdy.1108.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. «Fiji: an open source platform for biological image analysis.» *Nature Methods* 9 (7): 676-82. doi:10.1038/nmeth.2019.Fiji.
- Schnabel, Denhí, Enrique Salas-Vidal, Verónica Narváez, María Del Rayo Sánchez-Carbente, David Hernández-García, Rodrigo Cuervo, y Luis Covarrubias. 2006. «Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death.» *Developmental biology* 291 (2): 291-99. doi:10.1016/j.ydbio.2005.12.023.
- Schoenmakers, Erik, Maura Agostini, Catherine Mitchell, Nadia Schoenmakers, Laura Papp, Odelia Rajanayagam, Raja Padidela, et al. 2010. «Mutations in the selenocysteine insertion sequence – binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans» 120 (12). doi:10.1172/JCI43653.4220.
- Solnica-Krezel, Lila, y Diane S. Sepich. 2012. «Gastrulation: Making and Shaping Germ Layers». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28 (1): 687-717. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154043.
- Solnica-krezel, Lilianna, Derek L Stemple, Eliza Mountcastle-shah, Zehava Rangini, Stephan C F Neuhauss, Jarema Malicki, Alexander F Schier, et al. 1996. «Mutations affecting cell fates and cellular rearrangements during gastrulation in zebrafish», 67-80.
- Song, Sungmin, Stephanie Eckerle, Daria Onichtchouk, James a. Marrs, Roland Nitschke, y Wolfgang Driever. 2013. «Pou5f1-Dependent EGF Expression Controls E-Cadherin Endocytosis, Cell Adhesion, and Zebrafish Epiboly Movements». *Developmental Cell* 24 (5). Elsevier Inc.: 486-507. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.016.
- Stickney, Heather L, Michael J F Barresi, y Stephen H Devoto. 2000. «A PEER REVIEWED FORUM Somite Development in Zebrafish». *Developmental Dynamics*

303 (July): 287-303.

Stone, J R, y T Collins. 2002. «The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses». *Endothelium* 9 (4): 231-38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12572854.

ten Freyhaus, Henrik, Michael Huntgeburth, Kirstin Wingler, Jessika Schnitker, Anselm T. Bäumer, Marius Vantler, Mohamed M. Bekhite, Maria Wartenberg, Heinrich Sauer, y Stephan Rosenkranz. 2006. «Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation». *Cardiovascular Research* 71: 331-41. doi:10.1016/j.cardiores.2006.01.022.

Thisse, Christine, Agnès Degrave, Gregory V. Kryukov, Vadim N. Gladyshev, Sophie Obrecht-Pflumio, Alain Krol, Bernard Thisse, y Alain Lescure. 2003. «Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish». *Gene Expression Patterns* 3 (4): 525-32. doi:10.1016/S1567-133X(03)00054-1.

Veal, Elizabeth a, Alison M Day, y Brian a Morgan. 2007. «Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling». *Molecular Cell* 26 (1): 1-14. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.016.

Wan, Yong, Hideo Otsuna, Chi-Bin Chien, y Charles Hansen. 2012. «FluoRender: An Application of 2D Image Space Methods for 3D and 4D Confocal Microscopy Data Visualization in Neurobiology Research.» *IEEE Pacific Visualization Symposium: [proceedings]*. *IEEE Pacific Visualisation Symposium*, 201-8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3622106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Warga, R M, y C B Kimmel. 1990. «Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish.» *Development (Cambridge, England)* 108 (4): 569-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387236>.

Webb, Sarah E, Cécile Goulet, Ching Man Chan, Michael Y F Yuen, y Andrew L Miller. 2013. «Biphasic assembly of the contractile apparatus during the first two cell division cycles in zebrafish embryos» 22 (March): 218-28. doi:10.1017/S0967199413000051.

- Westerfield, M. 2007. «The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), 5th Edition». *University of Oregon Press, Eugene (Book)*.
- Winterbourn, Christine C. 2008. «Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species». *Nature Chemical Biology* 4 (5): 278-86. doi:10.1038/nchembio.85.
- Wong, Julian L, y Gary M Wessel. 2005. «Reactive oxygen species and Udx1 during early sea urchin development.» *Developmental biology* 288 (2): 317-33. doi:10.1016/j.ydbio.2005.07.004.
- Yant, Levi J., Qitao Ran, Lin Rao, Holly Van Remmen, Toru Shibatani, Jason G. Belter, Lucia Motta, Arlan Richardson, y Tomas A. Prolla. 2003. «The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults». *Free Radical Biology and Medicine* 34 (4): 496-502. doi:10.1016/S0891-5849(02)01360-6.
- Yi, Kexi, Jay R Unruh, Manqi Deng, Brian D Slaughter, Boris Rubinstein, y Rong Li. 2011. «Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes.» *Nature cell biology* 13 (10): 1252-58. doi:10.1038/ncb2320.
- Yoo, Sa Kan, Taylor W Starnes, Qing Deng, y Anna Huttenlocher. 2011. «Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo.» *Nature* 480 (7375): 109-12. doi:10.1038/nature10632.
- Yu, B P. 1994. «Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.» *Physiological reviews* 74 (1): 139-62.
- Zeller, Kathrin S, Anjum Riaz, Hamid Sarve, Jia Li, Anders Tengholm, y Staffan Johansson. 2013. «The Role of Mechanical Force and ROS in Integrin- Dependent Signals» 8 (5). doi:10.1371/journal.pone.0064897.

Apéndice A. Inmunolocalización en embriones completos.

Durante la presente tesis se establecieron las metodologías para la inmunolocalización de proteínas en embriones completos, como la histona H3 fosforilada y la proteína antioxidante GPx4.

En particular el trabajo “Cell proliferation patterns in early zebrafish development” (Mendieta-Serrano et al. 2015,) (anexo 3, artículo 2) publicado durante la realización de la presente tesis, fue crucial para establecer y estandarizar las metodologías de inmunolocalización, tinciones fluorescentes para visualizar núcleos y actina, y las condiciones de montaje para la inmovilización de los embriones durante las sesiones de adquisiciones por microscopía confocal y de fluorescencia. Estas metodologías ayudaron a la optimización de los tiempos y condiciones de la adquisición que mejoraron significativamente la calidad de las imágenes así como el aprovechamiento de los tiempos netos de utilización de los microscopios. Las metodologías establecidas fueron muy importantes para la presentación de los datos publicados en el trabajo “Spatial and temporal expression of zebrafish glutathione peroxidase 4 a and b genes during early embryo development” (Mendieta-Serrano et al. 2015) (anexo 3, artículo 3).

Además, la inmunolocalización de la histona H3 fosforilada fue utilizada como marcador del ciclo celular y en conjunto con la cuantificación de la circularidad (anexo 1), ambos criterios se utilizaron en un proyecto en colaboración con la Dra. Laura Alvarez enfocado en la identificación y caracterización de moléculas nuevas con potencial antitumoral obtenidas de fuentes naturales (Mojica et al. 2016) (anexo 3, artículos 1 y 4).

Apéndice B. Publicaciones generadas.

1. Rojas-Sepulveda,A.M. **Mendieta-Serrano,M.** Mojica,M.Y. Salas-Vidal,E. Marquina,S. Villarreal,M.L. Puebla,A.M. Delgado,J.I. Alvarez,L. 2012. Cytotoxic Podophyllotoxin Type-Lignans from the Steam Bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* *Molecules*, 17, 9506-9519.
2. **Mendieta-Serrano,M.A.** Schnabel,D. Lomeli,H. Salas-Vidal,E. 2013. Cell proliferation patterns in early zebrafish development *Anatomical Record*, 296, 759-773.
3. **Mendieta-Serrano,M.A.** Schnabel-Peraza,D. Lomeli,H. Salas-Vidal,E. 2015. Spatial and temporal expression of zebrafish glutathione peroxidase 4 a and b genes during early embryo development *Gene Expression Patterns*, 19, 98-107.
4. Mojica,M.A. Leon,A. Rojas-Sepulveda,A.M. Marquina,S. **Mendieta-Serrano,M.A.** Salas-Vidal,E. Villarreal,M.L. Alvarez,L. 2016. Aryldihydronaphthalene-type lignans from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* and their antimitotic mechanism of action *RSC Advances*, 6, 4950-4959.

Article

Cytotoxic Podophyllotoxin Type-Lignans from the Steam Bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*

Andrés M. Rojas-Sepúlveda ¹, Mario Mendieta-Serrano ², Mayra Y. Antúnez Mojica ¹, Enrique Salas-Vidal ², Silvia Marquina ¹, María Luisa Villarreal ³, Ana María Puebla ⁴, Jorge I. Delgado ⁴ and Laura Alvarez ^{1,*}

¹ Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico; E-Mails: amrojas@uaem.mx (A.M.R.-S.); antunezmayra@gmail.com (M.Y.A.-M.); smarquina21@hotmail.com (S.M.)

² Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico; E-Mails: msma@ibt.unam.mx (M.M.-S.); esalas@ibt.unam.mx (E.S.-V.)

³ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico; E-Mail: luisav@uaem.mx

⁴ Departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco 44430, Mexico; E-Mails: ampuebla@cencar.udg.mx (A.M.P.); ivanovith@yahoo.com (J.I.D.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: lalvarez@ciq.uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7997; Fax: +52-777-329-7998.

Received: 28 June 2012; in revised form: 3 August 2012 / Accepted: 3 August 2012 /

Published: 9 August 2012

Abstract: The hydroalcoholic extract of the steam bark of *B. fagaroides* var. *fagaroides* displayed potent cytotoxic activity against four cancer cell lines, namely KB ($ED_{50} = 9.6 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$), PC-3 ($ED_{50} = 2.5 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$), MCF-7 ($ED_{50} = 6.6 \mu\text{g/mL}$), and HF-6 ($ED_{50} = 7.1 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$). This extract also showed anti-tumour activity when assayed on mice inoculated with L5178Y lymphoma cells. Bioactivity-directed isolation of this extract, afforded seven podophyllotoxin-type lignans identified as podophyllotoxin (**1**), β -peltatin-A-methylether (**2**), 5'-desmethoxy- β -peltatin-A-methylether (**3**), desmethoxy-yatein (**4**), desoxypodophyllotoxin (**5**), burseranin (**6**), and acetyl podophyllotoxin (**7**) by 1D and 2DNMR and FAB-MS analyses, and comparison with reported values. All the isolated compounds showed potent cytotoxic activity in the cell lines tested, especially compound **3**, which exhibited greater activity than camptothecin and podophyllotoxin against

Cell Proliferation Patterns in Early Zebrafish Development

MARIO A. MENDIETA-SERRANO, DENHI SCHNABEL, HILDA LOMELÍ, AND ENRIQUE SALAS-VIDAL*

Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P., 62210, México

ABSTRACT

Although cell proliferation is an essential cell behavior for animal development, a detailed analysis of spatial and temporal patterns of proliferation in whole embryos are still lacking for most model organisms. Zebrafish embryos are particularly suitable for this type of analysis due to their transparency and size. Therefore, the main objective of the present work was to analyze the spatial and temporal patterns of proliferation during the first day of zebrafish embryo development by indirect immunofluorescence against phosphorylated histone H3, a commonly used mitotic marker. Several interesting findings were established. First, we found that mitosis metachrony among blastomeres could begin at the 2- to 4-cell stage embryos. Second, mitosis synchrony was lost before the mid-blastula transition (MBT). Third, we observed a novel pattern of mitotic clusters that coincided in time with the mitotic pseudo “waves” described to occur before the MBT. Altogether, our findings indicate that early development is less synchronic than anticipated and that synchrony is not a requirement for proper development in zebrafish. *Anat Rec*, 296:759–773, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: proliferation; asynchrony; *Danio rerio*; phosphorylated histone H3; patterns; mitotic clusters

Embryonic development requires the coordination of fundamental cellular behaviors such as proliferation, death, migration, and differentiation to achieve embryonic patterning and morphogenesis. The understanding of the molecular mechanisms that control these behaviors during development has rapidly advanced in recent years. By contrast, we still lack detailed descriptions of the spatial and temporal patterns of different cell dynamics such as proliferation or cell death. The identification of these patterns is required for a comprehensive

analysis of normal and pathological development, as well as for comparative studies throughout evolution.

Cell proliferation is triggered at the onset of development and is required to generate sufficient cell numbers for proper embryogenesis. Cell proliferation patterns have been described in diverse animal models in different degrees of detail. For example, in the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, embryonic cell lineages are highly invariant and can be traced from the zygote to the hatched larva because of the small number of

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: IXTLI-UNAM; Grant number: IX201110; Grant sponsor: DGAPA-UNAM; Grant numbers: IN219309-3; IN205612; IN204712.

*Correspondence to: Enrique Salas-Vidal, Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de

Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad #2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, México. E-mail: esalas@ibt.unam.mx

Received 30 July 2012; Accepted 20 February 2013.

DOI 10.1002/ar.22692

Published online 1 April 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).



Spatial and temporal expression of zebrafish glutathione peroxidase 4 a and b genes during early embryo development



Mario A. Mendieta-Serrano, Denhí Schnabel, Hilda Lomelí, Enrique Salas-Vidal*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad #2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos C.P. 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2014

Received in revised form

9 July 2015

Accepted 18 August 2015

Available online 24 August 2015

Keywords:

GPx4

gpx4a

gpx4b

Danio rerio

Cleavage furrow

Nuclear localization

Epiboly

Muscle

Periderm

ABSTRACT

Antioxidant cellular mechanisms are essential for cell redox homeostasis during animal development and in adult life. Previous *in situ* hybridization analyses of antioxidant enzymes in zebrafish have indicated that they are ubiquitously expressed. However, spatial information about the protein distribution of these enzymes is not available. Zebrafish embryos are particularly suitable for this type of analysis due to their small size, transparency and fast development. The main objective of the present work was to analyze the spatial and temporal gene expression pattern of the two reported zebrafish glutathione peroxidase 4 (GPx4) genes during the first day of zebrafish embryo development. We found that the *gpx4b* gene shows maternal and zygotic gene expression in the embryo proper compared to *gpx4a* that showed zygotic gene expression in the periderm covering the yolk cell only. Following, we performed a GPx4 protein immunolocalization analysis during the first 24-h of development. The detection of this protein suggests that the antibody recognizes GPx4b in the embryo proper during the first 24 h of development and GPx4a at the periderm covering the yolk cell after 14-somite stage. Throughout early cleavages, GPx4 was located in blastomeres and was less abundant at the cleavage furrow. Later, from the 128-cell to 512-cell stages, GPx4 remained in the cytoplasm but gradually increased in the nuclei, beginning in marginal blastomeres and extending the nuclear localization to all blastomeres. During epiboly progression, GPx4b was found in blastoderm cells and was excluded from the yolk cell. After 24 h of development, GPx4b was present in the myotomes particularly in the slow muscle fibers, and was excluded from the myosepta. These results highlight the dynamics of the GPx4 localization pattern and suggest its potential participation in fundamental developmental processes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are natural oxygen byproducts of aerobic metabolism (Halliwell and Cross, 1994). Extensive evidence indicates that ROS act as second messengers in the control of major cellular behaviors, such as cellular proliferation, death, migration, differentiation and aging (Burdon and Rice-Evans, 1989; Harman, 1956; Sohal and Allen, 1990; Bouzyk et al., 1991; Rattan et al., 1997; Covarrubias et al., 2008); however when produced in excess, ROS have been implicated in different pathologies, including cancer, diabetes and cardiovascular and degenerative diseases (Halliwell and Whiteman, 2004). To metabolize and modulate ROS effects, organisms use a variety of non-enzymatic and enzymatic

antioxidant defenses, including superoxide dismutases (Sod1, 2 and 3), catalases and glutathione peroxidases (GPx1, 2, 3 and 4). In mice, the targeted disruption of some of these enzymes, such as catalase (Ho et al., 2004), Sod1, 2 and 3 (Lebovitz et al., 1996; Elchuri et al., 2005; Carlsson et al., 1995) and GPx1, 2 and 3 (Esworthy et al., 2001; Ho et al., 1997; Olson et al., 2010), does not produce any visible developmental phenotypes. In contrast, glutathione peroxidase 4 (GPx4) knock-out mice present mid-gestation lethality between days 7.5 and 8.5 (Yant et al., 2003; Imai et al., 2003), highlighting the relevance of this particular antioxidant enzyme during development. Glutathione peroxidases (GPxs) 1 to 4 are a group of antioxidant proteins with selenium in their active sites that catalyze the reduction of hydroperoxides to water or their corresponding alcohols (Halliwell and Cross, 1994). GPx4 is the only glutathione peroxidase that functions as a monomeric protein, compared with the other GPxs that act as tetramer proteins (Ursini et al., 1985). GPx4 is capable of reducing small peroxides such as

* Corresponding author.

E-mail address: esalas@ibt.unam.mx (E. Salas-Vidal).

CrossMark
click for updatesCite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 4950

Aryldihydronaphthalene-type lignans from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* and their antimitotic mechanism of action†

Mayra Antúnez Mojica,^a Alejandra León,^a Andrés M. Rojas-Sepúlveda,^b Silvia Marquina,^a Mario A. Mendieta-Serrano,^c Enrique Salas-Vidal,^{*c} María Luisa Villarreal^d and Laura Alvarez^{*a}

Three new aryldihydronaphthalene-type lignans, namely, 7',8'-dehydropodophyllotoxin (1); 7',8'-dehydro acetylpodophyllotoxin (2); and 7',8'-dehydro *trans-p*-cumaroylpodophyllotoxin (3), were isolated from the stem bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* (Burseraceae), together with six known lignans, podophyllotoxin (4), acetylpodophyllotoxin (5), 5'-desmethoxy- β -peltatin A methylether (6), acetylpicropodophyllotoxin (7), burseranin (8), and hinokinin (9). The coumarin scopoletin (10) was also isolated from this bark. The chemical structure of all these compounds was determined by spectroscopic analyses including 2D NMR. We demonstrated that compounds 1–3 show different degrees of cytotoxic activity against human nasopharyngeal (KB), colon (HF-6), breast (MCF-7) and prostate (PC-3) cancer cell lines, with IC₅₀ values ranging from 1.49 to 1.0×10^{-5} μ M. *In vivo* studies of the effect of these natural lignans on the cell cycle, cell migration and microtubule cytoskeleton of developing zebrafish embryos, demonstrated their antimitotic molecular activity by disturbing tubulin. This is the first report on the occurrence of aryldihydronaphthalene lignans in the genus *Bursera* of the Burseraceae family, as well as on the determination of their cytotoxic activity and mechanism of action.

Received 8th November 2015
Accepted 23rd December 2015

DOI: 10.1039/c5ra23516b

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Bursera fagaroides (Kunth) Engl, which is a small tree belonging to the genus *Bursera* of the Burseraceae family *B. fagaroides*, is distributed from the United States to south Mexico, and is locally known as “aceitillo”, “copal” and “sarzafrás”.¹ Its stem bark and exudates are both used in folk medicine to treat cuts and tumors. Previous studies have demonstrated its effects on mouse and human spermatozoa immobilization,² as well as activities as an amoebicide,³ immunomodulator and antitumoral medication.^{4,5} Previous phytochemical studies showed the presence of podophyllotoxin related lignans in its bark.^{5,6} Recently, a bioassay-guided phytochemical investigation revealed the presence of seven aryltetralin-type lignans as the

cytotoxic components of the hydroalcoholic extract obtained from the stem bark of this plant.⁷ In addition, their antimitotic activity by disturbing tubulin was demonstrated using the zebrafish embryo model.⁸

In view of the biological importance of compounds obtained from *Bursera*, and in continuation of our search for plant cytotoxic natural compounds,^{9–11} we conducted a detailed investigation of the dichloromethane extract from the stem bark of *B. fagaroides*. Herein, we describe the isolation, and structure elucidation of nine podophyllotoxin-type lignans (1–9), together with the coumarin scopoletin (10). Compounds 1–3 are new natural products with an aryldihydronaphthalene skeleton, which are reported for the first time in the genus *Bursera*. The isolated pure compounds (1–3) were assayed for their cytotoxic activity, and their effect on the cell cycle using the *in vivo* model of zebrafish embryos was determined. The obtained results suggest the necessity of further investigations with these compounds, to develop moieties of therapeutic use.

2. Results and discussion

In a previous study, the CH₂Cl₂ extract from the stem bark of *Bursera fagaroides* revealed significant cytotoxic activity against a panel of four cancer cell lines with IC₅₀ values ranging from 0.96 to 3.71 μ g mL⁻¹.¹² In this study, repeated column chromatography resulted in the isolation of three new

^aCentro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico. E-mail: lalvarez@uaem.mx; Tel: +52 777 3297997; +52 777 3079200

^bFacultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño, Armenia, Quindío, Colombia

^cDepartamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico. E-mail: esalas@ibt.unam.mx; Fax: +52 777 3172388; Tel: +52 7773291663

^dCentro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra23516b