



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN ULTRAESTRUCTURAL E
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA
REGRESIÓN INTERDIGITAL EN RATAS
WISTAR

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A

ITZEL ALEJANDRA HERNÁNDEZ ROMERO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

2018

Ciudad Universitaria, CDMX





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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1.- Datos del alumno:

Apellido paterno	Hernández Romero
Apellido materno	Romero
Nombre(s)	Itzel Alejandra
Teléfono	56-66-84-74
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	311110205

2.- Datos del tutor

Grado	Dra
Nombre(s)	María Luisa
Apellido paterno	Escobar
Apellido materno	Sánchez

3.- Datos del sinodal 1

Grado	Dra
Nombre(s)	Lourdes Teresa
Apellido paterno	Agredano
Apellido materno	Moreno

4.- Datos del sinodal 2

Grado	Dra
Nombre(s)	Patricia
Apellido paterno	Rivas
Apellido materno	Manzano

5.- Datos del sinodal 3

Grado	Dr
Nombre(s)	David
Apellido paterno	Garciadiego
Apellido materno	Cázares

6.- Datos del sinodal 4

Grado	Dra
Nombre(s)	Rebeca
Apellido paterno	López
Apellido materno	Marure

7. Datos del trabajo escrito

Título	Evaluación ultraestructural e inmunohistoquímica de la regresión interdigital en ratas Wistar
Número de páginas	73 p
Año	2018

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo e iniciarme en el camino de la investigación científica.

Al Dr. Gerardo Vázquez-Nin y la Dra. Olga Echeverría por su guía y recomendaciones encaminadas al fortalecimiento de mi formación profesional.

A la Dra. Luisa Escobar, por su enseñanza técnica, teórica y su compañía durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosario Ortiz, por todos sus consejos y la instrucción técnica que me brindó.

A las maestras Silvia Juárez y Ernestina Ubaldo, por su asesoría en las técnicas de procesamiento y corte de material biológico.

A los Doctores Lourdes Agredano, Patricia Rivas, David Garciadiego y Rebeca López, por enriquecer el trabajo escrito con sus recomendaciones y observaciones.

Al proyecto PAPIIT IN225117

DEDICATORIA

A mis padres Alejandra Romero y David Hernández, que con su amor, guía y apoyo incondicional me enseñaron a alcanzar mis metas.

A mi hermana Naomi Hernández, por ayudarme siempre y motivarme a trabajar en lo que más disfruto.

A toda mi familia, gracias por su amor y gran fe en mí.

A Hernán Romo, por su cariño y apoyo.

A mis amigos, con quienes comparto buenos recuerdos de nuestros estudios de licenciatura.

A todos mis profesores, por ser pieza esencial en mi formación profesional y mostrarme lo maravillosa que es la ciencia.

ABREVIATURAS

AER	<i>Apical ectodermal ridge</i>	Cresta ectodérmica apical
AIF	<i>Apoptosis inducer factor</i>	Factor inductor de la apoptosis
ANZ	<i>Anterior necrotic zone</i>	Zona necrótica anterior
AR	<i>Retinoic acid</i>	Ácido retinóico
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Adenosin trifosfato
Bcl-2	<i>B-Cell lymphoma 2 proteins</i>	Proteínas de células B de linfoma 2
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>	Proteína morfogenética del hueso
Bmpr1a	<i>Bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>	Receptor tipo 1a de las proteínas morfogenética del hueso
CAD	<i>Multifunctional protein CAD</i>	Proteína multifuncional CAD
CICD	<i>Caspase-independent cell death</i>	Muerte celular independiente de caspasas
cIAP1	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein-1</i>	Proteína inhibidora de la apoptosis 1
Cyt-c	<i>Cytochrome c</i>	Citocromo c
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4'6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>	Complejo inductor de la señalización de muerte
αDIG	<i>Antibody against digoxigenin</i>	Anticuerpo contra digoxigenina
dpc	<i>Post-coitus days</i>	Días post-coito
Hand	<i>Neural crest derivatives-expressed protein 2</i>	Proteína expresada en derivados de cresta neural
E	<i>Development stages proposed by Theiler</i>	Estadios de desarrollo propuestos por Theiler
En-1	<i>Homeobox protein Engrailed-1</i>	Proteína de homeodominio engrailed-1
EndoG	<i>Mitochondrial endonuclease G proteins</i>	Proteínas mitocondriales de endonucleasa G
FADD	<i>Fas associated via death domain</i>	Dominio de muerte asociado a Fas
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos
GLI3	<i>Glioma-associated oncogene family zinc finger 3</i>	Familia de oncogenes asociada al glioma dedos de zinc 3
HH	<i>Development stages proposed by Hamburger and Hamilton</i>	Estadios de desarrollo propuestos por Hamburger y Hamilton
HMGB1	<i>High mobility group protein 1</i>	Proteína B1 de alta movilidad
HOX	<i>Homeodomain architectural genes</i>	Genes arquitectónicos de homeodominio
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>	Proteínas inhibidoras de la apoptosis

INZ	<i>Interdigital necrotic zone</i>	Zona necrótica interdigital
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	Proteína cinasa asociada a mitógenos
MMP	<i>Mitochondrial membrane permeabilization</i>	Permeabilización de la membrana mitocondrial
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein</i>	Proteína similar a un dominio de cinasa de linaje mixto
mTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>	Proteína objetivo mecanicista de la rapamicina
NF-KB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>	Factor nuclear Kappa B
NOM	-	Norma Oficial Mexicana
NGS	<i>Normal goat serum</i>	Suero normal de cabra
Lamp2	<i>Lysosome-associated membrane protein 2</i>	Proteína de membrana asociada a lisosomas 2
OP	<i>Opaque patch</i>	Parche opaco
PARP	<i>Poly(ADP-Ribose) Polymerase</i>	La poli [ADP-ribosa] polimerasa
PCD	<i>Programmed Cell Death</i>	Muerte celular programada
PE	<i>Phosphatidylethanolamide</i>	Fosfatidiletanolamida
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>	fosfatidilinositol 3-fosfato
PITX1	<i>Paired Like homeodomain 1</i>	Gen pareado de homeodominio 1
PIK3C3	<i>Phosphoinositide-3-Kinase, Class 3</i>	fosfatidilinositol 3-cinasa clase 3
PNZ	<i>Posterior necrotic zone</i>	Zona necrótica posterior
R-fng	<i>Radical fringe gene</i>	Gen de margen radical
RIP1	<i>Receptor interacting protein 1</i>	Receptor que interactúa con la proteína 1
RIPK3	<i>Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3</i>	Receptor de la serina/treonina cinasa 3
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico
ROCK	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase</i>	Cinasa asociada a la cola en espiral de Rho
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Especies reactivas del oxígeno
SAGARPA	-	Secretaría de Agricultura Gandería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SHH	-	Sonic hedgehog
SOX9	<i>Transcription Factor SOX-9</i>	Factor de transcripción SOX-9
TBX	<i>T-Box Transcription Factor</i>	Factores de transcripción caja-T
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	<i>Toll-like receptor</i>	Receptor tipo Toll
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i>	Factor de necrosis tumoral
TNFR	<i>Tumor necrosis receptor</i>	Receptor de necrosis tumoral
TRADD	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein</i>	Proteína Asociada al Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
TRAF	<i>Death domain associated with TNFR</i>	Dominio de muerte asociado a TNFR

TRAIL-R	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>	Receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>	Etiquetado de extremo dUTP mediado por TdT
Ur/Pb	-	Técnica de contraste Uranilo/Plomo
UVRAG	<i>Labeling UV Radiation Resistance Associated</i>	Resistencia a la radiación UV asociada
WNT	<i>Wingless-INT</i>	-
XIAP	<i>X-Linked Inhibitor Of Apoptosis</i>	Inhibidor de la apoptosis ligado a X
ZP	<i>Progress zone</i>	Zona de Progreso
ZPA	<i>Polarizing activity zone</i>	Zona de actividad polarizante

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
<i>I. Formación de las extremidades de vertebrados</i>	3
Inducción de las extremidades anteriores y posteriores.....	3
Centros organizadores morfogenéticos	4
Crecimiento próximo-distal.....	6
Polaridad dorso-ventral.....	6
Polaridad antero-posterior.....	7
Regiones de muerte celular	8
<i>II. Muerte celular</i>	11
Muerte celular tipo I apoptótica	12
Muerte celular tipo II autofágica.....	15
Necrosis.....	17
<i>III. Regresión de las membranas interdigitales</i>	20
Modelos experimentales.....	20
Regulación de la eliminación celular.....	22
Planteamiento del problema	25
Objetivos	25

Material y Métodos	26
Resultados	33
<i>I. Microscopia óptica</i>	33
<i>II. Microscopia electrónica</i>	42
Discusión	51
Conclusiones	56
Referencias	57

RESUMEN

La regresión interdigital es un ejemplo clásico de la participación de la muerte celular apoptótica en la remoción de tejidos transitorios y la morfogénesis de los órganos en desarrollo. El patrón de distribución de las células en proceso de muerte celular y las moléculas señalizadoras de dicho evento han sido ampliamente examinados en aves y sólo parcialmente en mamíferos. Sin embargo, su estudio a nivel ultraestructural ha sido menos documentado y dirigido a las células del tejido mesenquimal. Asimismo, se conocen los estadios embrionarios en los cuales existe una mayor tasa de eliminación celular de las membranas interdigitales en ratones; en rata sólo se han realizado estimaciones teóricas. Frente a lo anterior surge la necesidad de realizar una investigación para identificar las características estructurales, ultraestructurales e inmunohistoquímicas del proceso de eliminación de las células durante la regresión interdigital en ratas *Wistar*, así como definir el estadio de mayor tasa de eliminación celular. Se utilizaron extremidades anteriores de embriones de rata *Wistar* de 16.5, 17.5 y 18.5 días post-coito (dpc), las cuales se fijaron en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos y se incluyeron en parafina y Lowicryl. Se realizaron cortes y se hizo la tinción general con hematoxilina-eosina. Para identificar apoptosis se realizaron las técnicas inmunohistoquímicas para detectar a la *caspasa-3* activa y la fragmentación del ADN por medio del método de TUNEL. Para la evaluación ultraestructural se realizó la técnica general de procesamiento de material biológico para microscopía electrónica. Dicho material se incluyó en resina epóxica Epón. Las observaciones indican que el proceso de eliminación de las membranas interdigitales tiene mayor actividad a la edad de 17.5 dpc, una etapa equivalente pero más tardía que en ratón (13.5 dpc), en donde tanto las células mesenquimales como las epiteliales sufren una eliminación celular. En el tejido epitelial se observan zonas con células necróticas con desorganización citoplasmática y ausencia de membranas. Las células mesenquimales presentan características morfológicas que corresponden a la apoptosis como núcleos muy picnóticos, contracción celular, conservación de la integridad de la membrana citoplasmática y cuerpos apoptóticos; estos pueden encontrarse suspendidos en el tejido mesenquimal y/o dentro de vesículas fagocíticas pertenecientes a células mesenquimales vecinas y macrófagos. Las técnicas de TUNEL y la inmunodetección de *caspasa-3* activa confirman la presencia de este tipo de muerte.

ABSTRACT

The interdigital regression is a classic example of apoptotic cell death participation in the removal of transient tissues and the morphogenesis of developing organs. The pattern of distribution of cell death and their signaling molecules has been widely examined in birds and only partially in mammals. However, its study at ultrastructural level has been less documented and directed to mesenchymal tissue cells. Also, the embryonic stages in which there is a higher rate of cellular elimination of the interdigital membranes in mice are known; in rat, only theoretical estimates have been made. In view of the above, there is a need to carry out research to identify the structural, ultrastructural and immunohistochemical characteristics of the cell elimination process during interdigital regression in *Wistar* rats, as well as to define the stage of highest cell elimination rate. For that purpose, anterior limbs of *Wistar* rat embryos of 16.5, 17.5 and 18.5 post-coitus days (dpc) were used, which were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer and were included in paraffin and Lowicryl. Cuttings were made and general staining was done with hematoxylin-eosin. To identify apoptosis, immunohistochemical techniques were performed to detect active caspase-3 and DNA fragmentation by means of the TUNEL method. For the ultrastructural evaluation, the general technique of processing biological material for electron microscopy was performed. The material was included in Epon epoxy resin. The observations indicate that the process of elimination of the interdigital membranes has greater activity at the age of 17.5 dpc, an equivalent but later stage than in mice (13.5 dpc), where both the mesenchymal and epithelial cells undergo cell elimination. In the epithelial tissue, there are areas with necrotic cells with cytoplasmic disorganization and absence of membranes. The mesenchymal cells have morphological characteristics that correspond to apoptosis as picnotic nuclei, cellular contraction, preservation of the cytoplasmic membrane integrity and apoptotic bodies; these can be found suspended in the mesenchymal tissue and/or within phagocytic vesicles belonging to neighboring mesenchymal cells and macrophages. The techniques of TUNEL and the immunodetection of caspase-3-active confirm the presence of this type of death.

INTRODUCCIÓN

I. Formación de las extremidades de vertebrados

Las extremidades proveen a los vertebrados los métodos óptimos para llevar a cabo la locomoción. En anfibios, reptiles, aves y mamíferos las extremidades se desarrollan a través de un programa embrionario similar (Slack, 2006). La variación en este patrón de desarrollo durante la evolución de acuerdo al estilo de vida de los organismos, resulta en la gran diversidad de formas de las extremidades que se encuentran entre los vertebrados (Young y Tabin, 2016); por su gran importancia y relevancia evolutiva, han sido un excelente modelo para dilucidar los mecanismos moleculares que controlan la embriogénesis. Su estudio ha contribuido substancialmente a entender los principios y las interacciones celulares que orquestan la organogénesis (Zeller *et al.*, 2009). Los estudios clásicos de la formación de las extremidades de vertebrados se basan en modelos de aves y mamíferos, en los que se ponen a prueba de manera experimental la ganancia o pérdida de expresión y función de diferentes genes y proteínas, agregando sustancias inhibitorias o utilizando organismos genéticamente modificados como modelo. Actualmente se sabe que este proceso es controlado por un sistema que involucra diferentes genes y vías de señalización que se interrelacionan.

Inducción de las extremidades anteriores y posteriores

Las extremidades anteriores y posteriores emergen del mesodermo de la placa lateral que corre a lo largo del costado del embrión, como resultado de una oleada en la expresión de dos miembros de la familia de genes arquitectónicos de Homeodominio (*Hox*), los *clusters* HoxA y HoxD. Estos *clusters* inducen el crecimiento de la extremidad en una posición específica de acuerdo a su localización rostral o caudal (Petit *et al.*, 2017) (*Figura 1*). La identidad y morfología diferencial de las extremidades se determina de forma temprana en el embrión a través de la expresión de dos factores de transcripción de la familia de “Brachyury” llamados T-box (*caja-T*; *Tbx*): TBX5 y TBX4. El desarrollo de las extremidades anteriores, es resultado de la expresión de *Tbx5* en un patrón rostral de *Hox*; mientras que en las extremidades posteriores, el factor de transcripción de Homeodominio

pareado 1 (*Pitx1*) dirige la expresión de *Tbx4* en un patrón caudal de *Hox* (Abarca *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2017). Las extremidades anteriores y posteriores se forman como brotes compuestos de células mesenquimales indiferenciadas cubiertas por una capa de ectodermo. Ambos, *Tbx4* y *Tbx5* disparan la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 10 (*Fgf10*) en el mesénquima, que induce a su vez la expresión de *Fgf8* en el ectodermo a través de un asa de regulación positiva. Esta asa mantiene la proliferación de las células mesenquimales y el crecimiento de la extremidad (Petit *et al.*, 2017).

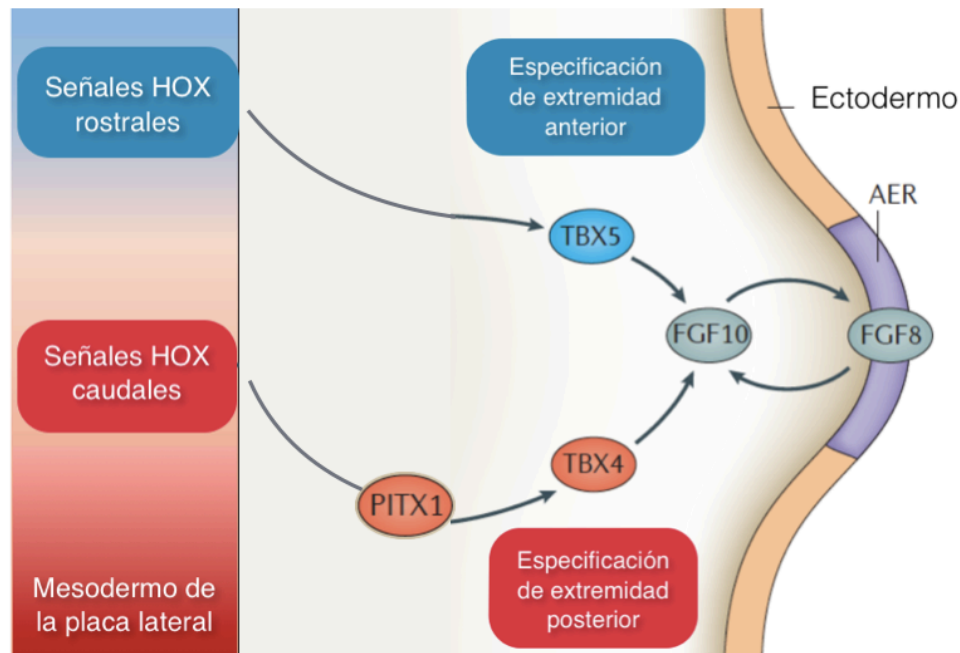


FIGURA 1. Establecimiento de la identidad de las extremidades anteriores y posteriores en mamíferos. En los brotes del mesénquima que darán origen a la extremidad anterior, la expresión de *Tbx5* es inducida por las señales rostrales de HOX. La expresión del factor de transcripción *PITX1* inducida por las señales caudales de HOX, potencia la expresión de *Tbx4* en el mesénquima que dará origen a la extremidad posterior. Las dos señales de *Tbx* disparan la expresión de *Fgf10* en el mesénquima. Después, *FGF10* interactúa con *FGF8* en el ectodermo a través de un asa de retroalimentación positiva que dirige el crecimiento de la extremidad. Imagen tomada y modificada de Petit *et al.*, 2017.

Centros organizadores morfogenéticos de la extremidad

Una vez que se induce la extremidad, continúa desarrollándose a lo largo de tres ejes principales: el eje próximo-distal, el eje antero-posterior y el eje dorso-ventral (*Figura 2*). Estos ejes son controlados por diferentes centros señalizadores que establecen los patrones

espaciales encargados de dirigir la morfogénesis de las extremidades (Abarca *et al.*, 2006). El crecimiento de las extremidades en el eje próximo-distal que corre del hombro a los dígitos, está bajo el control de la Cresta Ectodérmica Apical (AER). El AER mantiene la proliferación y sobrevivencia de las células del mesénquima a través de FGF's (Fernández y Ros, 2008). El eje antero-posterior que corre del dígito 1 al 5, es especificado por la Zona de Actividad Polarizante (ZPA), que es gobernada por el morfógeno Sonic hedgehog (*Shh*). Se cree que el eje dorso-ventral que corre de la parte trasera de la mano a la palma, está regulado por un miembro de la familia WNT (*WNT7A*) que señaliza desde el ectodermo (Petit *et al.*, 2017). Los tres centros organizadores están completamente interrelacionados a través de asas de retroalimentación altamente reguladas.

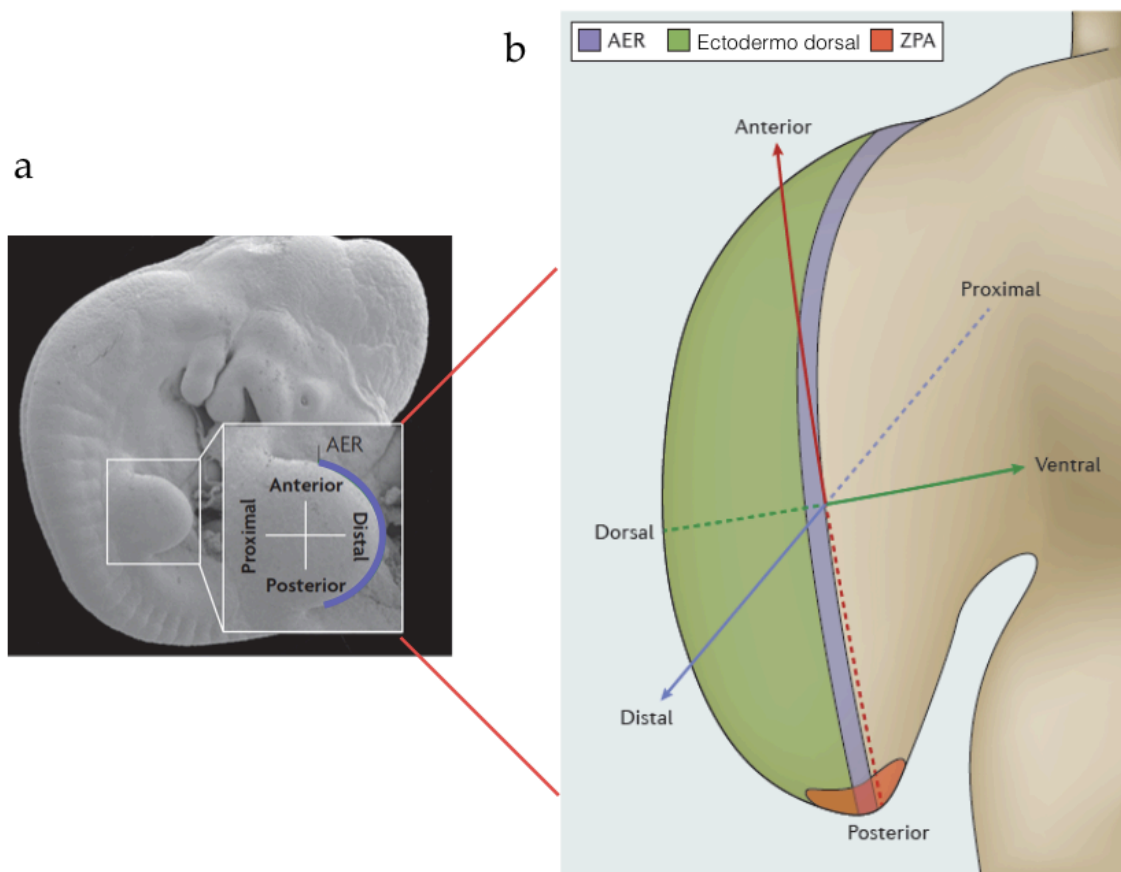


FIGURA 2. Ejes implicados en el desarrollo de las extremidades. **a.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de un embrión de ratón. El AER está situado en la frontera dorso-ventral de la extremidad. **b.** El eje próximo-distal está controlado por la señalización de FGF's en el AER. El eje dorso-ventral está dictado por la señalización de WNT. Mientras que el eje antero-posterior está regulado por la ZPA a través de la señalización de *Shh*. Imagen tomada y modificada del Zeller *et al.*, 2009 y Petit *et al.*, 2017.

Crecimiento próximo-distal de la extremidad

Una vez que la extremidad se establece, prosigue su crecimiento en una dirección próximo-distal a lo largo del eje embrionario (Abarca *et al.*, 2006). La señalización de WNT/ β -catenina induce la expresión de Fgf8 en el ectodermo distal y con ello la formación del epitelio que conforma al AER (Fernández y Ros, 2008). Las células mesodérmicas que migraron desde la placa lateral del mesodermo y se encuentran subyacentes al AER, constituyen un tejido mesenquimático proliferativo que emite señales de sobrevivencia y proliferación, tales como Fgf4 y Fgf8 (Abarca *et al.* 2006; Zeller *et al.* 2009). Durante la progresión de la extremidad, la región posterior del AER dirige el crecimiento de las células mesenquimales mediante la expresión de Fgf4, Fgf9 y Fgf17 (*Figura 3*). Mientras el primordio sigue creciendo, las células de la parte proximal se agregan para formar los elementos de cartílago del futuro esqueleto definitivo y las células de la parte distal, bajo la influencia directa del AER forman un grupo indiferenciado y proliferativo denominado Zona de Progreso (ZP) (Abarca *et al.*, 2006). Este proceso resulta en la muerte de una gran cantidad de células mesenquimales en regiones definidas de la extremidad (Chen y Zhao, 1998) y en la diferenciación celular y orden de aparición de los elementos de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal: estilópodo (húmero/fémur), zeugópodo (radio-ulna/tibia-ulna) y autópedo (carpos/dedos de la mano o tarsos/dedos de los pies) (Abarca *et al.* 2006; Zeller *et al.* 2009).

Polaridad dorso-ventral de la extremidad

El ectodermo dicta la polaridad dorso-ventral de las extremidades. La región dorsal se caracteriza por la expresión del gen *Wnt7a*, mientras que en la región ventral se expresa el gen *Engrailed-1 (En-1)* y el gen el receptor tipo 1a de las BMP's (*Bmpr1a*; proteínas morfogenéticas del hueso) (Abarca *et al.*, 2006). En ausencia de *Wnt7a* ocurre la expresión de *En-1* o *Bmpr1a* en el ectodermo dorsal, de manera que se dirige la formación de las estructuras ventrales. Por el contrario, al eliminar a *En1* o *Bmpr1a* ocurre la expresión ectópica de *Wnt7a* en el ectodermo ventral resultando en extremidades bi-dorsales (Abarca *et al.*, 2006). *En-1* también reprime la expresión ventral del gen "Radical fringe" (*R-fng*), un gen que se expresa normalmente en el ectodermo dorsal y codifica para una enzima

glucosiltransferasa. La expresión del *R-fng* dirige el posicionamiento del AER formando una frontera entre las células que lo expresan y las que no (Fernández *et al.*, 2006).

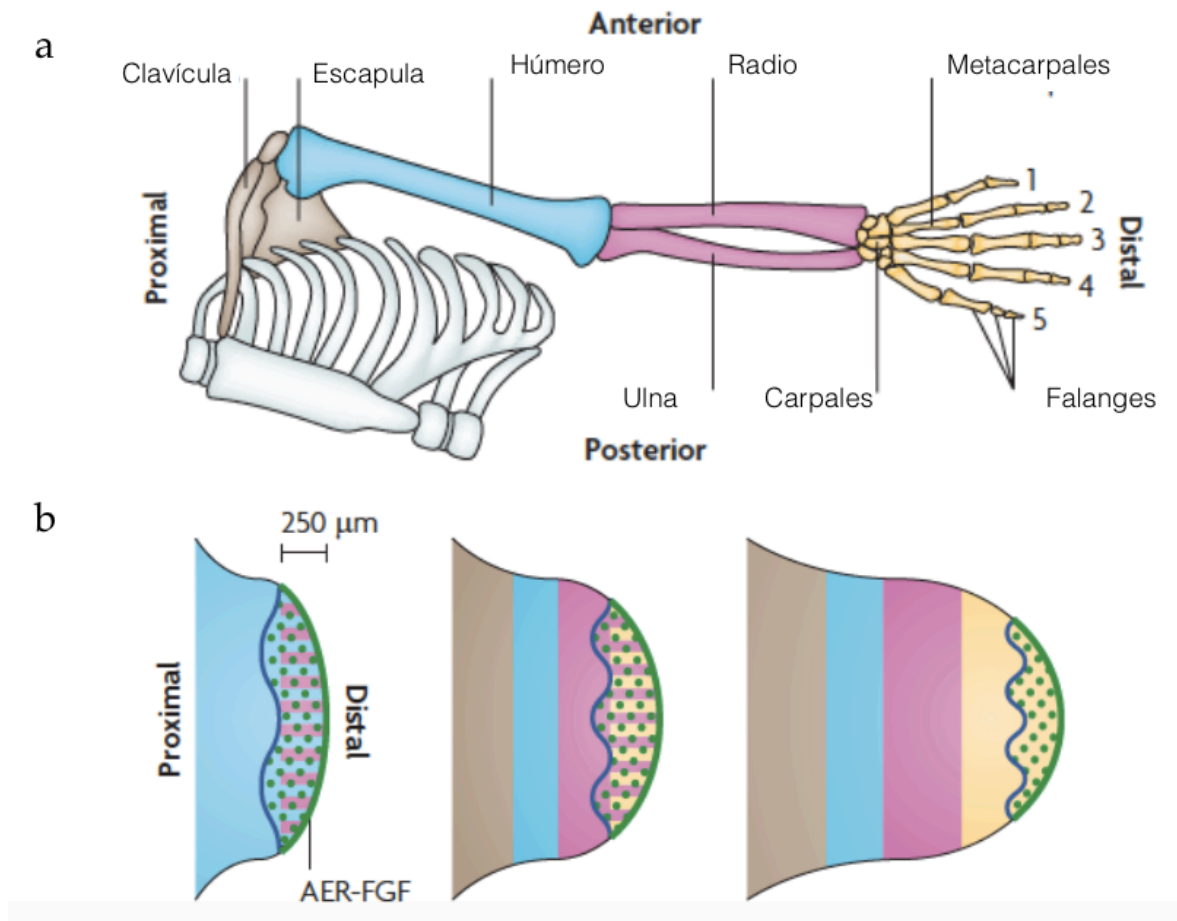


FIGURA 3. Desarrollo del eje próximo-distal y los elementos esqueléticos de una extremidad. **a.** El estilópodo da origen al elemento esquelético más proximal, el húmero (azul). El zeugópodo forma al radio y la ulna (rosa). El autópedo distal forma los huesos de la muñeca (carpales), la palma (metacarpales) y los dígitos (falanges) (amarillo). **b.** El AER dirige el destino del mesénquima indiferenciado de la ZP (región punteada) conforme se aleja de sus señales. Imagen tomada y modificada del Zeller *et al.*, 2009.

Eje antero-posterior de la extremidad

El gradiente antero-posterior da la pauta para el modelado del autópedo, por medio de la regulación de la zona del mesodermo con actividad polarizante (ZPA); una región posterior de las extremidades embrionarias de los vertebrados, capaz de dirigir y establecer la polaridad antero-posterior de la extremidad, a través del gen Sonic hedgehog (*Shh*) y otros

morfógenos que forman gradientes a lo largo de la extremidad (Abarca *et al.* 2006; Zeller *et al.* 2009) (Figura 4).

El ácido retinóico (AR) induce el establecimiento de la ZPA, la expresión de *Hoxb8* y del factor de transcripción de la proteína expresada en derivados (*dHand*), que resulta en la aparición de Shh en la parte posterior del primordio (Abarca *et al.*, 2006). El gen *Shh* induce la expresión de la proteína BMP2 en las células adyacentes, promoviendo la expresión de los genes homeóticos *Hoxd11* y *Hoxd13* en el mesénquima. En su forma represora, una proteína de la familia de factores transcripcionales Gli, llamada GLI3 inhibe la expresión de *dHand* en la zona anterior, restringiéndola a la zona posterior. *Gli3* codifica para un factor de transcripción involucrado en la señalización de SHH. En ausencia de la señalización inducida por SHH, GLI3 es procesada proteolíticamente y se genera la forma represora (GLI3R) que inhibe la expresión de aquellos genes promovidos por SHH. Por el contrario, si la señalización de SHH se activa, GLI3 no se procesa y entonces actúa como una forma activadora (GLI3A). Al estar SHH presente en la zona posterior se genera un gradiente proteico que genera un balance de GLI3 en sus formas represora y activadora, donde GLI3R predomina en la zona anterior y GLI3A en la posterior (Abarca *et al.*, 2006). La proteína GLI3R inhibe la expresión de dos proteínas: 5'-HOXD y HAND2, las que favorecen el establecimiento de la ZPA, al igual que la señal FGF8 del AER y TBX5 (Zeller *et al.*, 2009). Las células que contribuyen a la formación de los dígitos 2 y 3 son especificadas por la señalización constante de SHH, mientras que los dígitos posteriores 3 y 5 derivan de las células mesenquimales que expresaron previamente *Shh* como parte de la ZPA. El dígito 1 que se encuentra más anterior, no requiere la señalización de SHH, sino de reguladores transcripcionales de TBX5 y HOX (Zeller *et al.*, 2009).

Regiones de muerte celular

Las células que formarán el autópodo reciben dos tipos de señales; cuyo balance dicta la escultura morfológica de la extremidad, la forma de los músculos, los tendones y el establecimiento de las zonas de unión (Abarca *et al.* 2006; Montero y Hurlé, 2010). La primera señal promueve la diferenciación del cartílago con la consiguiente formación de los dígitos y la segunda señal, promueve la inhibición de la proliferación y la muerte

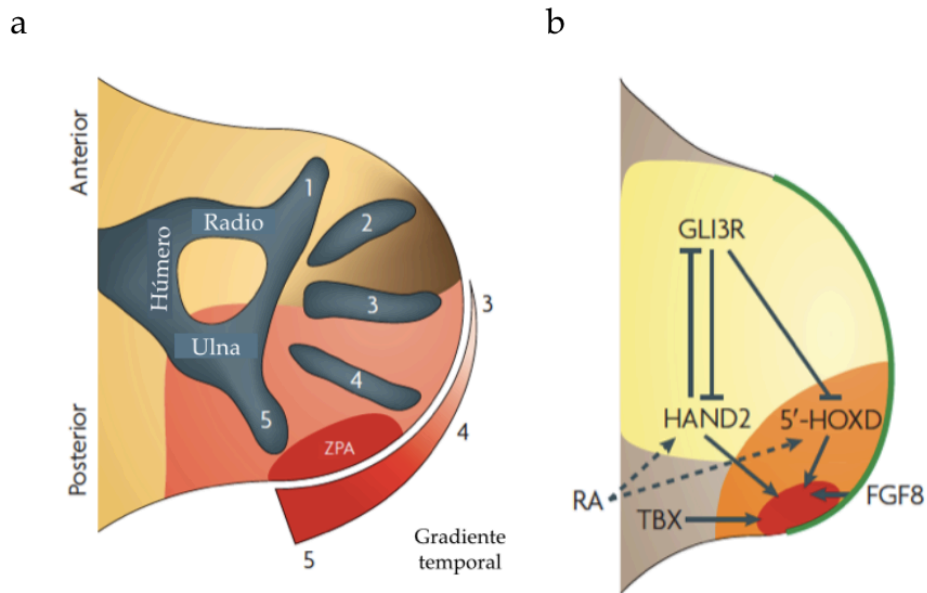


FIGURA 4. Especificación de la identidad antero-posterior mediante un gradiente espacial y temporal de Shh. **a.** Cuando las células dejan de expresar Shh dejan la ZPA (rojo). La expansión de estas células (rosa) desplaza a la región anterior a las células que reciben la señal SHH de manera paracrina (café) y a las que no la reciben (amarillo). De acuerdo a este gradiente de señalización se establece la identidad de los dígitos. **b.** Señalización genética que restringe la activación y mantenimiento de la expresión de Shh a la zona posterior de la extremidad. Imagen tomada y modificada del Zeller *et al.*, 2009.

celular en el tejido mesodérmico que se encuentra entre ellos, también llamado membrana interdigital (Abarca *et al.* 2006; Lorda *et al.*, 2015). Estas áreas de regresión y abundante muerte celular fueron denominadas Zonas Necróticas Interdigitales (INZ); porque fueron descritas antes de la introducción del término apoptosis (Fernández *et al.*, 2006). Posteriormente se encontraron las Zonas Necróticas Anteriores y Posteriores (ANZ y PNZ) en los márgenes periféricos de la extremidad en desarrollo y el Parche Opaco (OP) entre los cartílagos zeugopodiales (Montero y Hurlé, 2010) (Figura 5). Estas áreas de muerte celular exhiben un patrón temporal y distribución espacial específico, que se relaciona con el establecimiento de los elementos esqueléticos de la extremidad (Hurle *et al.*, 1996). Se ha visto que la regulación de la muerte celular en estas zonas juega un papel importante en la determinación del número de dígitos, ya que sus células conservan un potencial condrogénico (Fernández *et al.*, 2006; Baehrecke, 2002; Hernández y Covarrubias, 2011).

La muerte celular se acompaña de la degeneración de los componentes del tejido remanente, como los vasos sanguíneos y la matriz extracelular (Lorda *et al.*, 2015) y suele avanzar de la región más distal, a la región más proximal del autópodo conforme avanza el desarrollo (Salas *et al.*, 2001).

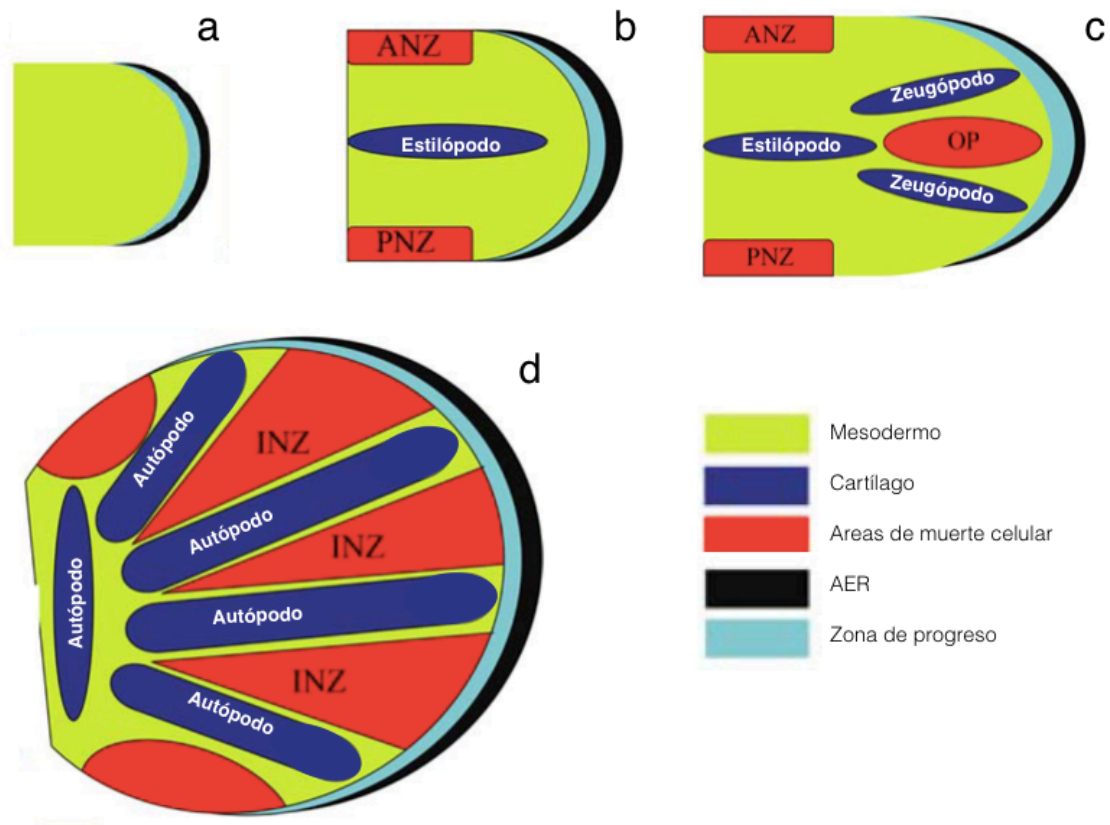


FIGURA 5. Areas de muerte celular durante el desarrollo de la extremidad. **a.** Primordio de la extremidad. **b.** Diferenciación del estilópodo y aparición de la PNZ y la ANZ. **c.** Diferenciación de los zeugópodos y aparición del OP. **d.** Diferenciación de los elementos esqueléticos del autópodo y aparición de la INZ. Imagen tomada y modificada de Montero y Hurlé, 2010.

II. Muerte celular

La regresión interdigital es un ejemplo clásico de la participación de la muerte celular en la remoción de tejidos transitorios y la morfogénesis de los órganos en desarrollo (Montero y Hurlé, 2010); la muerte celular mantiene la integridad y la homeostasis de los tejidos mediante la eliminación y el control de la proliferación celular durante toda la vida (Escobar *et al.*, 2015). Existen diferentes procesos que conducen a la muerte de las células, en los cuales intervienen diferentes factores intrínsecos y extrínsecos.

Los procesos de muerte celular poseen características funcionales, inmunológicas, bioquímicas y morfológicas particulares. Con respecto a su funcionalidad, la muerte celular puede ser programada o accidental (Galluzzi *et al.*, 2007). El término muerte celular programada (PCD) hace referencia a la capacidad de predecir, que dicho proceso ocurrirá de manera normal bajo ciertas condiciones, como en etapas específicas del ciclo celular o el desarrollo (Lockshin y Zakeri, 2004). La muerte celular accidental, es un proceso causado por un estímulo anormal, como la presencia de patógenos o condiciones fisiológicas desfavorables. También, se tiene presente que la muerte celular puede desencadenar respuestas inmunológicas. Cuando las células que mueren liberan su contenido citoplasmático al espacio extracelular o alguna molécula que promueve una respuesta inflamatoria se considera que la muerte celular es inmunogénica. La respuesta inmunogénica no ocurre si las células que mueren son rápidamente engullidas y degradadas por células vecinas o especializadas (Galluzzi *et al.*, 2007). Los criterios bioquímicos y morfológicos, han sido los más socorridos para identificar experimentalmente y clasificar a los diferentes procesos de muerte celular. Estos hacen referencia a la presencia de enzimas específicas y los sustratos necesarios para que estas lleven a cabo sus reacciones. Los criterios morfológicos recaban la descripción estructural y ultraestructural de las células que mueren, para evidenciar la forma, el tamaño y la disposición de los organelos, entre otras cosas. Al conjuntar la información de todos los criterios se han definido diversos procesos de muerte celular, de los cuales destacan tres tipos principales: tipo I apoptosis, tipo II autofagia y necrosis (Hernández y Covarrubias, 2011). Cada programa de muerte involucra una vía de señalización con elementos

activadores y efectores particulares, que interactúan de manera secuencial y dan origen a distintas respuestas celulares (Escobar *et al.*, 2015).

Muerte celular tipo I apoptótica

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que elimina células innecesarias o potencialmente perjudiciales durante el desarrollo y como parte de la homeostasis normal de los tejidos (Ravichandran y Lorenz, 2007). Entre sus características morfológicas destacan la reducción del volumen celular y nuclear (picnosis), la retracción de pseudópodos, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la contracción del citoplasma, que está acompañada de la formación de protuberancias o ampollas en la membrana plasmática llamadas *blebs*, las cuales se separan eventualmente y forman cuerpos membranosos conocidos como cuerpos apoptóticos (Chimal *et al.*, 2011; García *et al.*, 1993). Al interior de estos cuerpos apoptóticos, podemos encontrar organelos citoplasmáticos intactos y/o fragmentos del núcleo (Galluzzi *et al.*, 2007). Los cuerpos apoptóticos son removidos por células fagocíticas especializadas (células dendríticas y macrófagos) o células vecinas (Baehrecke, 2002; Escobar *et al.*, 2015). Las células apoptóticas liberan factores que facilitan el reclutamiento de macrófagos, como la lipofosfatidilcolina y señales en sus superficies que favorecen la fagocitosis, como la fosfatidilserina (Ravichandran y Lorenz, 2007).

La apoptosis cuenta con dos vías de activación: la vía intrínseca y la vía extrínseca (*Figura 6*). En la vía intrínseca una señal de muerte o estrés intracelular como el daño del material genético o un estímulo citotóxico, actúan sobre la mitocondria. La familia de las proteínas de las células B de linfoma 2 (Bcl-2) incluye proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl2A-1, Bcl-B y Mcl-1), proteínas pro-apoptóticas multi-dominio (Bak, Bax y Bok) y proteínas con el dominio BH3 (Bid, Bim, Bik, Noxa Hrk, Bad, Noxa, Bmf y Puma) (Swart *et al.*, 2016; Taylor *et al.*, 2008). En condiciones de homeostasis, los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 mantienen la integridad de la mitocondria y la previenen del daño ocasionado por los miembros pro-apoptóticos. En condiciones de estrés celular, las proteínas BH3 de la misma familia son activadas y antagonizan a los miembros anti-apoptóticos (Duprez *et al.*, 2009). La proteína Bad, por ejemplo, al asociarse con las

proteínas Bax y Bak, dirige su oligomerización y la formación de un canal por el cual proteínas apoptóticas como el citocromo-C (Cyt-c), Smac/Diablo y Omi, son liberadas hacia el citosol; a este proceso se le conoce como permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) (Duprez *et al.*, 2009; Swart *et al.*, 2016). La proteína Smac/Diablo, es capaz de antagonizar la acción de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), tales como la proteína inhibidora de la apoptosis 1 (cIAP1) y la proteína inhibidora de la apoptosis ligada a X (XIAP). Por su parte, la liberación del Cyt-c hace que esta se asocie con con Apaf-1 y adenosin trifosfato (ATP) y juntas formen una plataforma de reclutamiento y activación de caspasas conocida como el apoptosoma. Las caspasas son proteasas altamente específicas que están presentes en todas las células como zimógenos (precursores inactivos de enzimas) (Taylor *et al.*, 2008). La escisión de la *pro-caspasa-9* que realiza el apoptosoma, conlleva a su activación en forma de *caspasa-9 activa* y esta a su vez escinde y activa a la cascada de caspasas ejecutoras 3, 6 y 7; que son cruciales para la muerte celular apoptótica (Duprez *et al.*, 2009). La *caspasa-3* activa actúa como a la proteína multifuncional CAD (CAD) que fragmentan el ADN y a cinasas como la asociada a la cola en espiral de Rho (ROCK), que afectan el arreglo del citoesqueleto y causan la contracción celular (Escobar *et al.*, 2015).

En la vía intrínseca también existe una vertiente independiente de caspasas, donde la proteína mitocondrial endonucleasa G (endoG) y el factor inductor de la apoptosis (AIF) son liberados y translocados al núcleo para promover la condensación de la cromatina. (Chimal *et al.*, 2011).

La vía extrínseca es inducida por la estimulación de un receptor de muerte perteneciente a la familia del TNFR, como el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1), Fas o TRAIL-R. La agregación de TNFR1 dirige la formación secuencial de dos complejos: el complejo I que se forma en la membrana plasmática y consiste de TNFR1, el dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD), el receptor del TNF asociado al factor 2 (TRAF2), el receptor que interactúa con la proteína 1 (RIP1) y cIAP1. En condiciones normales, la proteína cIAP1 interactúa con TRAF2, para dirigir el reclutamiento del TNFR1. También, lleva a cabo la ubiquitinación de RIP1, que tiene como resultado la activación del factor nuclear Kappa B (NF- κ B) y la expresión de genes anti-apoptóticos (Duprez *et al.*, 2009).

En presencia del factor de necrosis tumoral (TNF), el TNFR1 se endocita y se forma el complejo II, también llamado complejo inductor de la señalización de muerte (DISC), que incluye a TRADD y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD). Este último recluta a las caspasas iniciadoras 8 y/o 10, capaces de activar a las caspasas ejecutoras. Por otro lado, la caspasa 8 en su forma activa puede escindir a Bid para amplificar el programa de muerte celular por medio de la vía intrínseca (Duprez *et al.*, 2009).

La apoptosis ha sido caracterizada bioquímicamente por la presencia de: a) fragmentación del ADN (200 pb) debida a la activación de endonucleasas. Esto puede ser identificado experimentalmente por medio de una electroforesis o de la unión a sus extremos terminales *in situ* (Lockshin y Zakeri, 2004); b) externalización de la fosfatidilserina, vista por medio de su unión a Anexina V y c) activación de caspasas involucradas en el proceso, como la *caspasa-3* (García *et al.*, 1993).

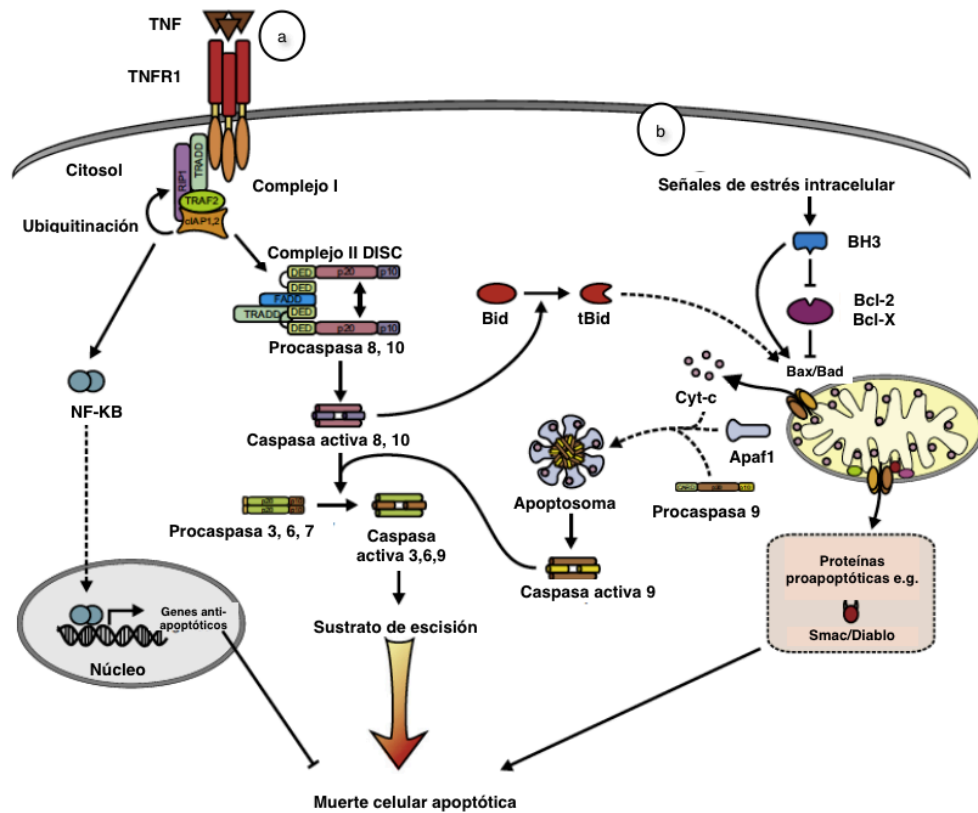


FIGURA 6. Representación esquemática de la muerte celular apoptótica. **a.** Vía extrínseca. **b.** Vía intrínseca. Imagen tomada y modificada de Duprez *et al.*, 2009.

Muerte celular tipo II autofágica

La autofagia es un proceso fisiológico normal que permanece activo en la homeostasis, la atrofia, en el desarrollo de algunos organismos como parte del proceso de remodelación durante la metamorfosis, incluso ha sido relacionado a la longevidad y la respuesta inmune (Lockshin y Zakeri, 2004; Duprez *et al.*, 2009). Es un fenómeno que permite reciclar componentes celulares en condiciones limitantes de nutrientes para contribuir a la sobrevivencia de la célula.

Se han descrito tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (*Figura 7*). La macroautofagia requiere la formación de vacuolas con doble membrana llamadas autofagosomas, que al fusionar su contenido con los lisosomas forman autofagolisosomas (Aburto *et al.*, 2012); cuya función es secuestrar y digerir proteínas y organelos a través de enzimas proteolíticas como las catepsinas (Baehrecke, 2002). En la microautofagia las partículas se engullen por medio de la invaginación de la membrana lisosomal. En la autofagia mediada por chaperonas los sustratos se entregan directamente a los lisosomas a través de receptores como Lamp-2A (Aburto *et al.*, 2012).

Un gran incremento en el número de vacuolas autofágicas que digieren material citoplasmático de las células es considerado como un mecanismo de muerte autofágica (Duprez *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2007). Este tipo de muerte celular se caracteriza por la captura de organelos y partículas, el colapso retardado del núcleo y la amplia expansión del compartimiento lisosomal, incluyendo lisosomas primarios, secundarios y vacuolas autofágicas (Lockshin y Zakeri, 2004).

La vía clásica de la señalización autofágica actúa a través de la proteína objetivo mecanicista de la rapamicina (mTOR), una cinasa que cuando se encuentra inhibida, permite la activación del complejo ULK-Atg13-FIP200, que induce la formación del autofagosoma (*Figura 8*). Para poder sintetizar vacuolas autofágicas, otro complejo formado por proteínas cinasas llamado PI3KC3 inicia la nucleación de vesículas. En este complejo la proteína Beclina-1 sirve de plataforma para la unión de PI3KC3, la proteína

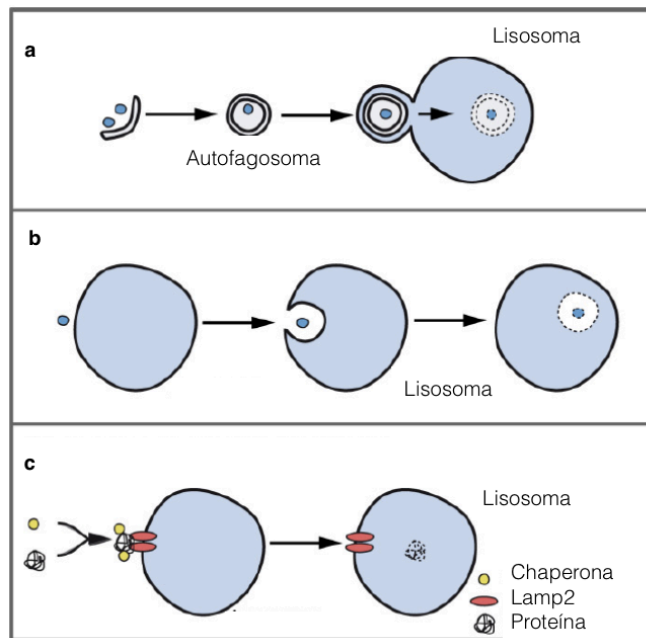


FIGURA 7. Tipos de autofagia. **a.** Macroautofagia. **b.** Microautofagia. **c.** Autofagia mediada por chaperonas. Imagen tomada y modificada de Aburto *et al.*, 2012.

asociada a la resistencia a la radiación UV (UVRAG), y las proteínas Bif y Ambra. En condiciones normales Bcl-2 reprime la autofagia uniéndose a Beclina-1; sin embargo, durante periodos de privación de nutrientes Bcl-2 es fosforilada y libera a Beclina-1. La activación de PI3KC3 resulta en la generación de fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) y el reclutamiento de proteínas Atg que median la elongación de las membranas. Los pasos siguientes involucran dos sistemas de conjugación con ubiquitina. En el primero el complejo Atg 12, Atg 5 y Atg 6 curvan las vesículas. En el segundo sistema, Atg8 también llamada LC3 en el caso de mamíferos, se une a fosfatidiletanolamida; su conjugación se conoce como LC3-II, la que se une a las membranas autofágicas (Duprez *et al.*, 2009; Swart *et al.*, 2016). Finalmente, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma liberando su contenido dentro del lumen lisosomal para que sea degradado por hidrolasas (Duprez *et al.*, 2009).

La autofagia ha sido caracterizada bioquímicamente para fines experimentales por la presencia de: a) componentes de la maquinaria autofágica, como LC3-I, LC3-II; y b) la observación de autofagosomas por diferentes técnicas de microscopía (Mizushima *et al.*, 2010; Klionsky *et al.*, 2008).

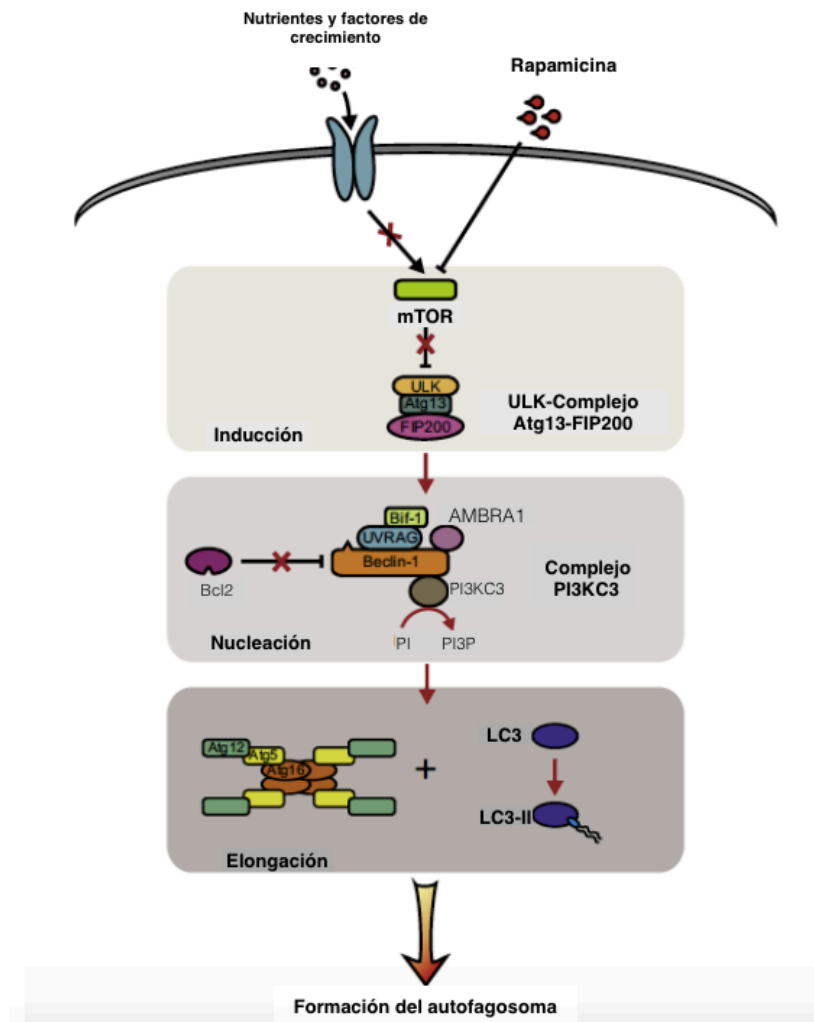


FIGURA 8. Representación esquemática de la vía autofágica. Imagen tomada y modificada de Duprez *et al.*, 2009.

Necrosis

La necrosis se describe tradicionalmente como un tipo de muerte celular accidental y aparentemente descontrolado que suele resultar de un daño tóxico, patológico, hipóxico, radiactivo o estresante (Ravichandran y Lorenz, 2007; Galluzzi *et al.*, 2007). Entre sus características morfológicas destacan la condensación moderada de la cromatina, el hinchamiento citoplasmático y de los organelos, la pérdida de integridad de las membranas y la desintegración del citoplasma seguida de la lisis celular, que permiten la fuga del contenido celular al espacio extracelular y la precipitación de proteínas, provocando una

respuesta inflamatoria y daño a las células vecinas (Baehrecke, 2002; Duprez *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2007). Las moléculas que son liberadas, se conocen como alarminas y estimulan receptores de reconocimiento para macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (Taylor *et al.*, 2008).

Actualmente se sabe que la necrosis puede ser resultado de una serie de eventos regulados iniciados por un diverso rango de estímulos (*Figura 9*). Se han visto procesos necróticos mediados por receptores como TNFR1 que dirigen la activación de RIP1, una proteína indispensable para la activación de vías de supervivencia como la vía NF- κ B y la vía de proteínas cinasas asociadas a mitógenos (MAPKs); que además activa otros mediadores necróticos como son las especies reactivas del oxígeno (ROS), el calcio, las calpainas, catepsinas, fosfolipasas, entre otros (Duprez *et al.*, 2009). Los mediadores necróticos pueden ser activados también por infección a través de diversos receptores celulares y su acoplamiento a proteínas patógenas, como es el caso de los receptores tipo Toll (TLR) o TNFR. Estos receptores son capaces de dirigir la oligomerización y fosforilación de la cinasa MLKL, que resulta en la producción de ROS por la mitocondria y la lisis celular (Tait *et al.*, 2014). Por su parte, el incremento en los niveles de ROS y calcio intracelular alteran la permeabilidad de la membrana plasmática, la capacidad de generar ATP y la función normal de muchas moléculas susceptibles a oxidación o degradación proteolítica. El calcio activa a diferentes proteasas como las calpainas que disrumen la membrana lisosomal y liberan a las catepsinas, quienes desestabilizan finalmente las membranas celulares. El daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) que se genera, causa la hiperactivación de la polimerasa de reparación PARP-1, la cual requiere un alto suministro de energía. La depleción del ATP conduce a las células a un fallo energético irreversible y a la necrosis (Duprez *et al.*, 2009).

No existe un marcador bioquímico específico para la identificación experimental de la necrosis. Sin embargo, su presencia puede detectarse por: a) sus características morfológicas por microscopía electrónica (Galluzzi *et al.*, 2007) y b) la presencia de alarminas que no se encuentran normalmente en el espacio intracelular, como ácido úrico, proteína B1 de alta movilidad (HMGB1), ciertas proteínas de choque térmico, ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple y ADN genómico (Taylor *et al.*, 2008).

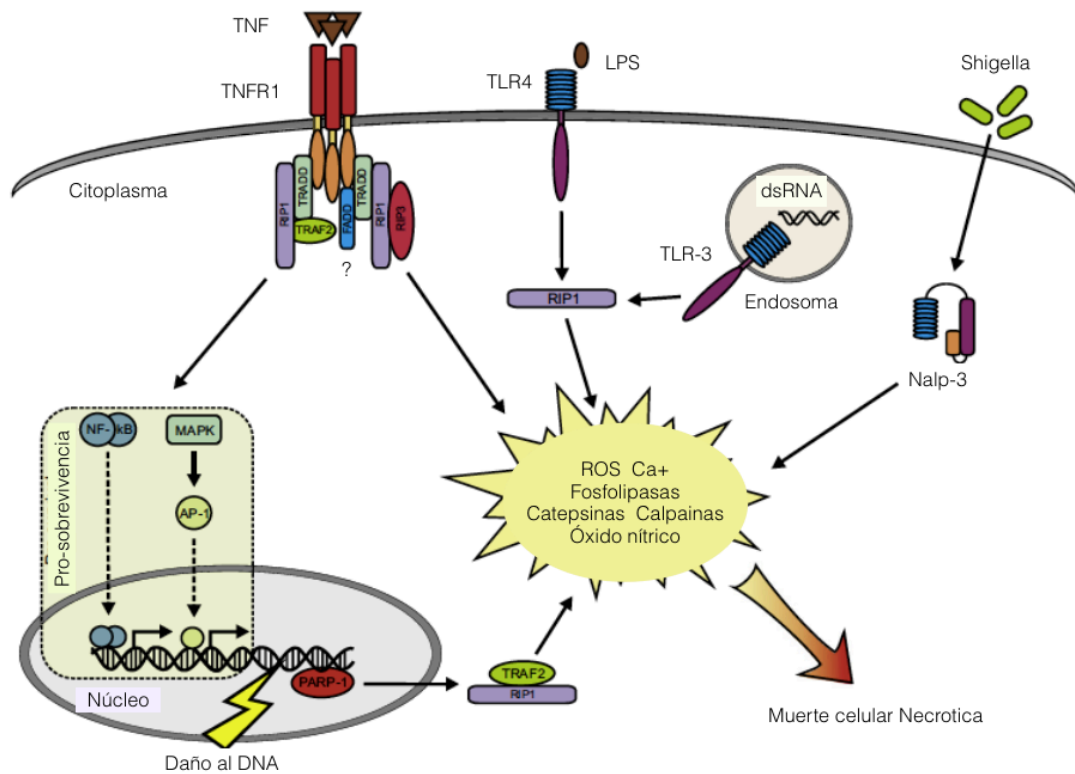


FIGURA 9. Representación esquemática de la vía necrótica. Imagen tomada y modificada de Duprez *et al.*, 2009.

III. Regresión de las membranas interdigitales

La muerte celular ha sido ampliamente estudiada durante el desarrollo embrionario de diferentes organismos, ya que ilustra la regulación temporal y espacial de las células (Fernández *et al.*, 2006). La regresión de las membranas interdigitales, también conocida como muerte celular interdigital, es el modelo más antiguo y mejor estudiado de muerte celular programada en vertebrados (Chen y Zhao, 1998), por su importancia médica y evolutiva al definir la morfología de las extremidades y sus dígitos.

Modelos experimentales

Mucha de la investigación se ha realizado en extremidades de aves, debido al fácil acceso quirúrgico y manipulación de los huevos. Con base en los estadios de desarrollo propuestos por Hamburger y Hamilton para los pollos (HH; Hamburger y Hamilton, 1951), se ha visto que, a los 3 días (estadio 18HH) el AER aparece en el ectodermo como un epitelio columnar. El resto del ectodermo se estructura como un epitelio cuboidal estratificado que recubre a la extremidad del embrión (Fernández y Ros, 2008). Después, entre los 3 y 3.5 días (estadio 20HH) el AER adopta una estructura de epitelio pseudoestratificado con la capacidad de focalizar la producción de factores de crecimiento (*Figura 10a*). Los procesos de proliferación ocurren de manera similar en todo el ectodermo; sin embargo, la muerte celular se presenta únicamente en células del AER (Fernández *et al.*, 2006). Tanto en aves como en ratones, se ha visto que las células del AER mueren por apoptosis a lo largo de su vida útil y que llegado el momento el AER atraviesa por un proceso de regresión en el que decrece progresivamente (Fernández y Ros, 2008; Fernández *et al.*, 2006). En aves, lo anterior ocurre a partir de los 4 y 4.5 días (estadio 23-24HH) (Fernández y Ros, 2008; Todt y Fallon, 1984). La muerte celular por la que atraviesa el AER, tiene repercusión en su extensión y en la cantidad de células mesenquimales que se encuentran subyacentes a él (Fallon *et al.*, 1994). La muerte interdigital aparece primero en el mesénquima de la ANZ a los 3.5 días (estadio 21HH), después en el mesénquima del OP entre los 3.5 y 4 días (estadio 22HH), en la PNZ a los 4 días (estadio 23HH) y finalmente, en el mesénquima del INZ entre los 6 y 7 días (estadio 29-30HH) (Fernández *et al.*, 2006).

La apoptosis es el mecanismo de muerte más evidenciado durante la regresión interdigital a través de criterios morfológicos y la identificación de elementos activos pertenecientes a las rutas apoptóticas extrínseca e intrínseca (Zuzarte *et al.*, 2006); aunque se sospecha la participación de procesos de muerte autofágicos y necróticos. Se han encontrado células positivas a marcadores autofágicos como LC3B (Montero *et al.*, 2010) y se ha visto que en los últimos estadios de degeneración, existen células con características comparables a la necrosis, como la vacuolización de organelos y la ruptura de la membrana citoplasmática (Hurle *et al.*, 1996; Montero y Hurlé, 2010).

El proceso de regresión interdigital también se ha investigado en mamíferos y el organismo modelo por excelencia es el ratón. De acuerdo con los estadios de desarrollo propuestos por Theiler (E) (Theiler, 1989), en las extremidades de ratón, se ha observado que a los 9.5 días (estadio 14) el ectodermo ventral, que contiene al AER, es más grueso que el dorsal (Bell *et al.*, 1998; Loomis *et al.*, 1998). Luego, a los 10 días (estadio 15) el AER se confina al margen ventro-distal de la extremidad y se distingue como un epitelio poliestratificado entre los 10.5 y los 11 días (estadio 17-19) (Meyer *et al.* 1997; Bell *et al.* 1998) (*Figura 10b*). A partir de los 11 días (estadio E19) el AER empieza su regresión (Fernández y Ros, 2008). La muerte celular ha sido detectada en diversas regiones del mesénquima: en el OP a los 10.5 días (estadio 17), en la ANZ a los 12.5 días (estadio 20), en la PNZ a los 13 días (estadio E13) y en la INZ entre los 13 y los 13.5 días (estadio E21-21.5), teniendo su mayor actividad a los 14.5 días (estadio E22.5) (Fernández *et al.*, 2006). El mecanismo de muerte celular más observado es la apoptosis, como indican los estudios morfológicos, la actividad de las caspasas, la expresión de receptores de muerte y sus ligandos y de los factores pro y anti-apoptóticos involucrados en la permeabilización de la membrana mitocondrial (Nakanishi *et al.*, 2001; Svandova *et al.*, 2017). Aunque, en estudios de organismos mutantes se ha visto que la regresión interdigital puede progresar también por mecanismos necróticos e independientes de caspasas (Chautan *et al.*, 1999; Nakanishi *et al.*, 2001). Algunos autores apuntan la existencia de un proceso autofágico, ya que en los estadios que preceden al establecimiento de las áreas de muerte, se observan células con pequeñas vesículas fagocíticas y actividad incrementada de la fosfatasa ácida (Hurle *et al.*, 1996).

En extremidades de rata se han realizado una cantidad considerablemente menor de estudios. Se sabe que, el AER es distinguible y contiene células muertas entre los 14.5-15 días, que empieza a reducirse en grosor a los 16 días y que a los 17 días se vuelve indistinguible del resto del ectodermo. La muerte interdigital se ve en las células del mesénquima cercanas al ectodermo entre los 15.5 y 16 días y hasta los 18 días (Lee *et al.*, 1993; Ballard, 1968). El único mecanismo de muerte celular reportado es la apoptosis, por medio de criterios morfológicos.

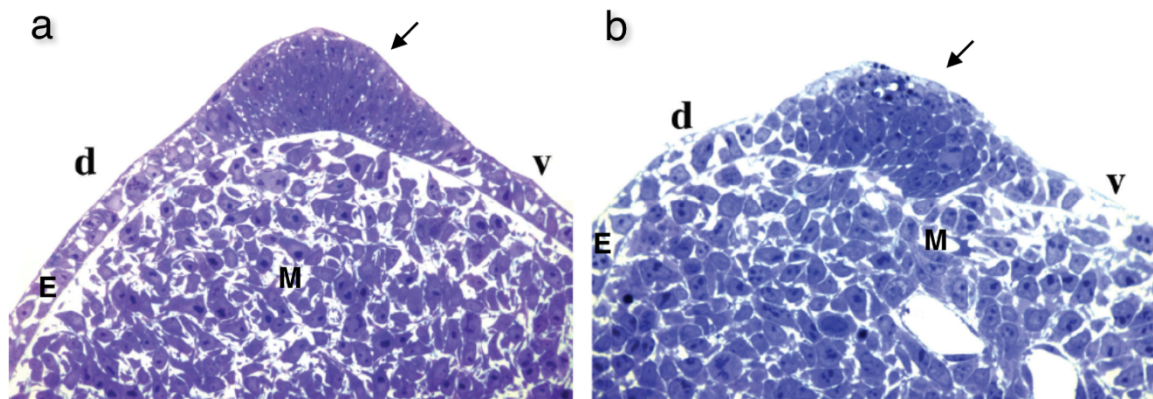


FIGURA 10. Morfología de la Cresta Ectodérmica Apical (AER). **a.** Corte semifino de la región distal de una extremidad de ave entre 3 y 3.5 días de incubación. **b.** Corte semifino de la región distal de una extremidad de ratón de 10.5 dpc. Se encuentra señalado el AER (flecha), el epitelio (E), el msénquima (M), la región ventral (v) y dorsal (d) de las extremidades. Imagen tomada y modificada de Fernández y Ros, 2008.

Regulación de la eliminación celular

La regresión interdigital es un proceso regulado por una variedad de factores que actúan bajo la influencia e intercomunicación de diferentes vías de señalización que dirigen el crecimiento de las extremidades y la diferenciación de las células. La comunicación del tejido epitelial y el mesenquimal es clave en el destino de las células de la región interdigital. Uno de los principales centros señaladores durante el desarrollo de las extremidades, es el AER (Fernández y Ros, 2008). En el AER se reciben, se regulan y se producen una variedad de moléculas señaladoras relacionadas con la morfogénesis de la extremidad. Es por esto que la remoción del AER o el descontrol en las señales de eliminación de sus células puede conducir al desarrollo de malformaciones y sindactilias;

es decir, a la permanencia de la membrana interdigital después del nacimiento (Chimal *et al.*, 2011).

Se conocen sólo algunas de las señales que inducen la cascada molecular que culmina con la muerte celular en los interdígitos. En el AER se sintetizan algunos miembros de la familia FGF, que actúan como factores de proliferación y supervivencia para las células mesenquimales (Martin, 1998; Tickle y Münsterberg, 2001). Estas señales son antagonizadas y/o moduladas por miembros de la familia BMP que son sintetizados por el AER o el mesénquima y se consideran señales pro-apoptóticas (Lorda *et al.*, 2015; Maatouk *et al.*, 2009). Los genes *Msx* son otra señal pro-apoptótica que puede activar la muerte celular por mecanismos mediados por BMPs (Hernández y Covarrubias, 2011; Chen y Zhao, 1998). El AR antagoniza las señales de FGF, tiene una influencia positiva en los BMPs (Hernández *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 1999) y es capaz de regular negativamente a los factores anti-apoptóticos y activar proteinasas de matriz asociadas con la remodelación de los tejidos (Dupé *et al.*, 1999). A su vez, la acción de las BMP en el ectodermo puede ser antagonizada por la señalización de Wnt/B-catenina y de esta manera regular positivamente la expresión de FGF's en el AER (Lorda *et al.*, 2015).

En el control de la muerte interdigital, también influyen la composición y el estado de la matriz extracelular. La pérdida de adhesión celular y la degradación de la matriz extracelular por acción de proteasas (Zuzarte-Luis *et al.*, 2006; Diaz *et al.*, 2013) son dos fenómenos que pueden influenciar la muerte celular por medio de modificación en la disponibilidad de factores de crecimiento y por la pérdida de soporte (Fernández y Ros, 2008). Incluso, algunas sindactilias presentan mutaciones en moléculas de adhesión celular que desorganizan el tejido ectodermal (Brancati *et al.*, 2010).

Además, se sabe que los vasos sanguíneos presentes en la matriz extracelular regulan positivamente la muerte celular a través de los niveles de oxígeno y ROS (Abarca, 2006; Eshkar *et al.*, 2015). Muchos autores creen que la exposición temprana a ROS durante el establecimiento de las áreas de muerte, daña el ADN y favorece que las células inicien procesos de muerte celular o senescencia (Montero *et al.*, 2016). Aunado a esto, se ha visto

que las regiones en regresión expresan una menor cantidad de enzimas antioxidantes (Schnabel *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2005).

A pesar de los esfuerzos realizados a través de diferentes acercamientos metodológicos, la regresión interdental es un proceso complejo cuya base molecular y características estructurales siguen aún sin dilucidarse en su totalidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La regresión interdigital ha sido muy estudiada en aves y sólo de forma parcial en mamíferos, los análisis citológicos, citoquímicos y moleculares se han dirigido a conocer el patrón de distribución de las células en proceso de muerte celular y a las moléculas señalizadoras de dicho proceso; sin embargo, su estudio a nivel ultraestructural ha sido menos documentado y enfocado a las células del tejido mesenquimal. Asimismo, se conocen los estadios embrionarios a los cuales existe una mayor tasa de eliminación celular de las membranas interdigitales en ratones; en rata sólo se han realizado estimaciones teóricas. Frente a lo anterior surge la necesidad de realizar una investigación para identificar las características estructurales, inmunohistoquímicas y ultraestructurales del proceso de eliminación de las células durante la regresión interdigital en ratas Wistar, así como definir el estadio de mayor tasa de eliminación celular.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar las características estructurales, inmunohistoquímicas y ultraestructurales del proceso de eliminación celular durante la regresión interdigital en embriones de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir las características morfológicas del proceso de regresión de las membranas interdigitales en embriones de 16.5, 17.5 y 18.5 dpc.
- Identificar las características ultraestructurales de las células epiteliales y mesenquimales de las membranas interdigitales de extremidades anteriores de embriones de rata de 17.5 dpc.
- Evaluar la presencia de la muerte tipo apoptótica a nivel inmunohistoquímico en las células mesenquimales de las membranas interdigitales de extremidades anteriores de embriones de rata de 17.5 dpc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la evaluación ultraestructural se realizó la técnica general de procesamiento de material biológico para microscopía electrónica. Se hizo una inclusión en resina epóxica Epón y en resina acrílica Lowicryl. De igual forma, se procesó material incluido en parafina para realizar las técnicas inmunohistoquímicas.

I. Obtención de extremidades de embrión de rata.

Se utilizaron embriones de rata Wistar hembra de 16.5, 17.5 y 18.5 días post-coito (dpc). Se utilizaron seis ratas adultas preñadas y 30 embriones de rata. La manipulación de los animales siguió los lineamientos éticos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (SAGARPA, 2015).

a) Proceso

1. Anestesia de la rata en una cámara con gases de éter.
2. Colocación en una bandeja de disección y sujeción de las cuatro extremidades.
3. Incisión en la parte baja del abdomen y descubrimiento de la cavidad abdominal.
4. Extracción de los cuernos uterinos con los sacos embrionarios.
5. Remoción de las extremidades anteriores.

II. Procedimientos para estudios de microscopia óptica

a) Inclusión en parafina

1. Fijación con paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2, durante 1.5 horas.
2. Lavado con amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2. 3 lavados de 30 minutos cada uno.
3. Deshidratación:
 - Etanol 30% durante 30 minutos.
 - Etanol 50% durante 30 minutos.
 - Etanol 60% durante 30 minutos.
 - Etanol 70% durante 30 minutos.
 - Etanol 80% durante 30 minutos.

Etanol 90% durante 30 minutos.

Etanol 96% durante 30 minutos.

Etanol absoluto 2 cambios de 30 minutos cada uno.

Etanol absoluto-xilol 30 minutos.

Xilol 15 minutos.

4. Pre-inclusión:

Parafina-Xilol 1:1 durante 30 minutos.

Parafina 1 durante 1 hora.

Parafina 2 durante 1 hora.

5. Incluir en moldes de plástico.

b) Corte en el microtomo

Se realizaron cortes de 4-5 μm del material incluido en parafina con ayuda de un micrótopo de rotación Leica modelo RM3125. Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos cubiertos con solución Poli-L-lisina (Sigma Chemical Company, USA).

c) Tinción Hematoxilina-Eosina

1. Desparafinación e hidratación.

Calentado a 60°C durante 10 minutos.

Xilol durante 10 minutos.

Etanol absoluto durante 10 minutos.

Etanol 90% durante 10 minutos.

Etanol 70% durante 10 minutos.

Etanol 50% durante 10 minutos.

Etanol 30% durante 10 minutos.

Hidratación con agua destilada durante 10 minutos.

3. Amortiguador de fosfatos durante 10 minutos.

4. Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.

5. Agua corriente 10 minutos.

6. Agua destilada

7. Etanol ácido

8. Agua amoniacal

9. Etanol 50%
10. Eosina alcohólica 5 minutos.
11. Etanol 80%
12. Etanol 90%
13. Etanol absoluto
14. Etanol-xilol
15. Xilol
16. Montar preparación con resina sintética.

d) TUNEL

1. Desparafinación e hidratación.

Calentado a 60°C durante 3 minutos.

Xilol durante 10 minutos.

Etanol absoluto durante 10 minutos.

Etanol 90% durante 10 minutos.

Etanol 70% durante 10 minutos.

Etanol 50% durante 10 minutos.

Etanol 30% durante 10 minutos.

Hidratación con agua destilada durante 10 minutos.

3. Amortiguador de fosfatos durante 10 minutos.
4. Proteinasa K (20 μ L/1 mL en amortiguador de fosfatos) durante 15 minutos a temperatura ambiente (Sigma Chemical Company, USA).
5. Enjuague con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno.
6. Buffer de equilibrio durante 10 minutos (Millipore Corporation, USA).
7. Buffer de reacción (33 μ L de desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)/77 μ L de buffer de reacción) (Millipore Corporation, USA).
8. Incubación durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda
9. Buffer de paro (1 mL de buffer de paro/34 mL de agua) durante 10 minutos a temperatura ambiente (Millipore Corporation, USA).
10. Enjuague con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 1 minuto cada uno.
11. Incubación con anti-digoxigenina (∞ DIG) (62 μ L ∞ DIG/68 μ L buffer de bloqueo) durante 45 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente y protegido de la luz

(Millipore Corporation, USA).

12. Lavado con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno.
13. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) durante 1 minuto (Roche, Alemania).
14. Lavado con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno.
15. Montar con 20 μ L de medio para conservar la fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, USA)

e) Captura y procesamiento de imágenes

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Nikon Eclipse E600. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Nikon DXM1200F y procesadas con el programa Microsoft PhotoDraw versión 2.

III. Procedimientos para estudios de microscopía electrónica.

a) Inclusión en Epón. Material sin post-fijación.

1. Fijación con glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7, durante 1 hora.
2. Lavado con amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. 3 cambios de 10 minutos cada uno.
3. Deshidratación:
 - Etanol 60% durante 10 minutos.
 - Etanol 70% durante 10 minutos.
 - Etanol 80% durante 10 minutos.
 - Etanol 96% durante 10 minutos.
 - Etanol absoluto 2 cambios de 20 minutos cada uno.
4. Óxido de propileno 2 cambios de 15 minutos cada uno.
5. Pre-inclusión:
 - Mezcla de óxido de propileno y Epón 812 en proporción 1:1 durante 24 horas (Electron Microscopy Sciences, USA).
 - Mezcla de óxido de propileno y Epón 812 en proporción 1:2 durante 24 horas.
6. Inclusión en moldes de plástico. Polimerización a 60°C durante 48 horas.

b) Inclusión en Epón. Material con post-fijación.

1. Fijación con glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2, durante 1 hora.
2. Lavado con amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2, 3 cambios de 10 minutos cada uno
3. Postfijación con tetraóxido de osmio 1% en amortiguador de fosfatos 0.16 M pH 7.2, durante 90 minutos.
3. Deshidratación:
 - Etanol 60% durante 10 minutos.
 - Etanol 70% durante 10 minutos.
 - Etanol 80% durante 10 minutos.
 - Etanol 96% durante 10 minutos.
 - Etanol absoluto 2 cambios de 20 minutos cada uno.
4. Óxido de propileno 2 cambios de 15 minutos cada uno.
5. Pre-inclusión:
 - Óxido de propileno y Epón 812 en proporción 1:1 durante 24 horas (Electron Microscopy Sciences, USA).
 - Óxido de propileno y Epón 812 en proporción 1:2 durante 24 horas.
6. Incluir en moldes de plástico. Polimerizar a 60°C durante 48 horas.

c) Inclusión en Lowicryl K4M

1. Fijación con paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7. durante 1 hora a 4°C.
2. Lavado en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. 3 cambios de 10 minutos cada uno.
3. Deshidratación a -20°C:
 - Metanol 30% durante 10 minutos.
 - Metanol 50% durante 10 minutos.
 - Metanol 60% durante 10 minutos.
 - Metanol 70% durante 10 minutos.
 - Metanol 80% durante 10 minutos.
 - Metanol 90% durante 30 minutos.
4. Pre-inclusión:
 - Mezcla de solución Metanol-Lowicryl 1:1 durante 60 min a -20°C (Polysciences Inc.,

Inglaterra).

Mezcla de solución Metanol-Lowicryl 2:1 durante 60 min a -20°C.

Lowicryl durante 60 min a -20°C.

Lowicryl durante toda la noche a -20°C.

5. Inclusión en cápsulas de gelatina.

6. Polimerización en cámara de luz ultravioleta a -20°C durante 48 horas y a temperatura ambiente durante 48 horas.

d) Corte en el ultramicrotomo

Se realizaron cortes semifinos de 500 nm del material incluido en Epón y Lowicryl con ayuda de un ultramicrotomo Leica Ultracut R y se colocaron en portaobjetos. Del material incluido en Epón explorado previamente con la tinción de azul de toluidina, se obtuvieron cortes ultrafinos de 90 nm que fueron colocados en rejillas de cobre para microscopía electrónica.

e) Tinción con Azul de Toluidina

1. Solución de Azul de Toluidina.

2. Secado a 60°C durante 3 minutos.

3. Enjuague con agua destilada.

4. Secado a 60°C durante 3 minutos.

f) Contraste general Uranilo - Plomo

1. Acetato de uranilo 4% protegido de la luz y en cámara húmeda durante 20 minutos.

2. Enjuague con agua Mili-Q y secado con papel filtro.

3. Citrato de plomo 3% 10 minutos en cámara con hidróxido de sodio.

4. Enjuague con agua Mili-Q y secado con papel filtro.

g) Inmunolocalización de la *caspasa-3* activa en cortes de material incluido en Lowicryl

1. Amortiguador de fosfatos durante 3 minutos.

2. Peróxido de hidrógeno al 10% (34 µL de peróxido de hidrógeno/1 mL amortiguador de fosfatos) durante 30 minutos.

3. Enjuague con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno.

4. Suero normal de cabra (NGS) (1 μ L NGS/100 μ L amortiguador de fosfatos) durante 2 horas a temperatura ambiente (Sigma Chemical Company, USA).
5. Incubación con anticuerpo *anti-caspasa-3* activa (1/100 μ L amortiguador de fosfatos) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda (Lab Vision Corporation, USA)
6. Enjuague con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno.
7. Incubación con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (1/100 μ L amortiguador de fosfatos) durante 2 horas a temperatura ambiente (Thermo Fisher Scientific, USA).
8. Enjuague con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno.
9. DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) durante 1 minuto (Roche, Alemania).
10. Enjuague con amortiguador de fosfatos, 3 lavados de 3 minutos cada uno
11. Montar preparación con 20 μ L de medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, USA).

h) Captura y procesamiento de imágenes

Las inmunolocalizaciones fueron observadas en un microscopio Nikon Eclipse E600 y capturadas con una cámara digital Nikon DXM1200F. Las rejillas de cobre se observaron con un microscopio electrónico de transmisión modelo Jeol 1010. Las imágenes fueron capturadas con el programa Scion Image y una cámara digital (CCD-300-RC, M T1). Todas las imágenes fueron procesadas con el programa Microsoft PhotoDraw versión 2.

RESULTADOS

I. Microscopia óptica

El empleo de la tinción con azul de toluidina en cortes semifinos de material incluido en resinas plásticas, permitió observar el panorama tisular a nivel de microscopia óptica, así como la identificación de la edad con la mayor tasa de eliminación celular durante la regresión de las membranas interdigitales en embriones de ratas Wistar.

En cortes transversales del autópodo, vemos que la región interdigital está constituida por dos tejidos el epitelial y el mesenquimal. En el tejido mesenquimal de los embriones de 16.5 dpc se observan algunas células en proceso de muerte, las cuales son identificables por los núcleos altamente teñidos, evidenciando la compactación de la cromatina (Imagen 1a). A la edad de 17.5 dpc las células en proceso de muerte son más evidentes en la zona de regresión interdigital (Imagen 1b), mientras que a los 18.5 dpc son menos notables (Imagen 1c). De acuerdo a lo anterior, a los 17.5 dpc es la edad del desarrollo embriológico en la que el interdígito presenta más células mesenquimales con características apoptóticas, siendo el estadio adecuado para realizar los estudios posteriores del presente trabajo.

En cortes longitudinales de la región interdigital se aprecian mejor ambos tejidos (Imagen 2a). El tejido mesenquimal presenta vasos sanguíneos, células mesenquimales sanas y algunas en proceso de eliminación. Las células mesenquimales sanas se encuentran dispersas en la matriz extracelular, tienen una morfología estrellada, un núcleo grande con cromatina laxa, un nucléolo prominente y varias proyecciones citoplasmáticas. Las células mesenquimales en proceso de muerte se encuentran cercanas al epitelio y se caracterizan por sus núcleos con cromatina compacta. El tejido epitelial se compone de células planas estratificadas que descansan sobre una membrana basal (Imagen 2b). Las células mesenquimales en proceso de muerte pueden encontrarse aisladas o dentro de células fagocíticas y las células epiteliales presentan contracciones (Imagen 2c). Con un mayor aumento se ve con claridad que algunas células en proceso de muerte cercanas a los vasos sanguíneos presentan abundantes vesículas (Imagen 3a y b).

La tinción con Hematoxilina-Eosina permitió la observación de los cortes del material incluido en parafina. En este tipo de cortes es posible observar la mayor parte del autópodo y la manera en que las células mesenquimales empiezan a agruparse para formar cartilago y tendones (Imagen 4a). La región epitelial asociada a las zonas de regresión muestra dilataciones citoplasmáticas, indicando cierto grado de alteración en este tipo celular (Imagen 4b). Algunas células mesenquimales cercanas al epitelio también muestran núcleos con cromatina compacta y grandes vesículas (Imagen 4c).

Hasta aquí, las evidencias morfológicas obtenidas con las observaciones realizadas en cortes histológicos, permitieron definir que existen células alteradas en las regiones interdigitales en proceso de regresión con características que podrían corresponder a la apoptosis, como son: contracción celular, compactación de la cromatina, fragmentación nuclear.

Para definir si el proceso apoptótico es el responsable de la eliminación celular de las células del mesénquima en las membranas interdigitales, se realizaron pruebas inmunohistoquímicas para evidenciar la participación de la *caspasa-3* en su forma activa, así como la detección del ADN fragmentado por medio de la técnica de TUNEL (del inglés *TdT-mediated dUTP nick end labeling*).

La identificación de la presencia de la *caspasa-3* activa se realizó sobre cortes de material incluido en resina plástica Lowicryl K4M, lo que permitió una mejor caracterización de las células positivas a la técnica. También se utilizó la tinción nuclear DAPI, para localizar a los núcleos celulares, así como la disposición de la cromatina. En regiones cercanas al epitelio, se evidenciaron fragmentos nucleares pequeños, mostrando cuerpos apoptóticos (Imagen 5a). La inmunodetección de la *caspasa-3* en la zona previamente descrita, mostró que se localiza en el citoplasma de las células con núcleo fuertemente compactado (Imagen 5b).

La técnica de TUNEL se realizó en cortes del material incluido en parafina, para evaluar la presencia de ADN fragmentado, un rasgo propio de la apoptosis. Utilizando iluminación con contraste de fases, se identificó la zona correspondiente a la región interdigital (Imagen

6a). La observación de las señales fluorescentes correspondientes a TUNEL (rojo) y al 4, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI; azul), permitieron identificar que la señal positiva a la técnica de TUNEL, se encuentra a lo largo del eje próximo-distal de la región interdigital (Imagen 6b). Por otro lado, la sobreposición de las dos tinciones fluorescentes, evidenció que la marca roja corresponde a los núcleos de células mesenquimales.

Lo anterior, permite establecer que las células mesenquimales de las membranas interdigitales que están muriendo presentan características morfológicas y bioquímicas correspondientes a la apoptosis.

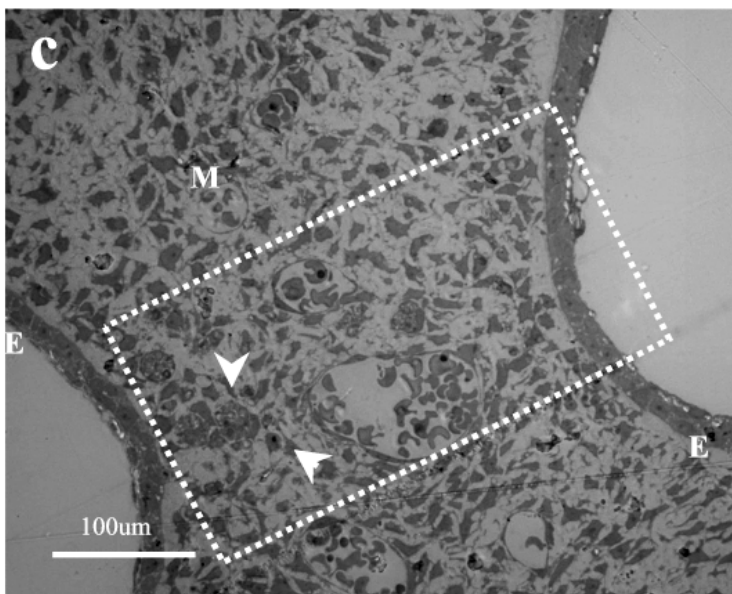
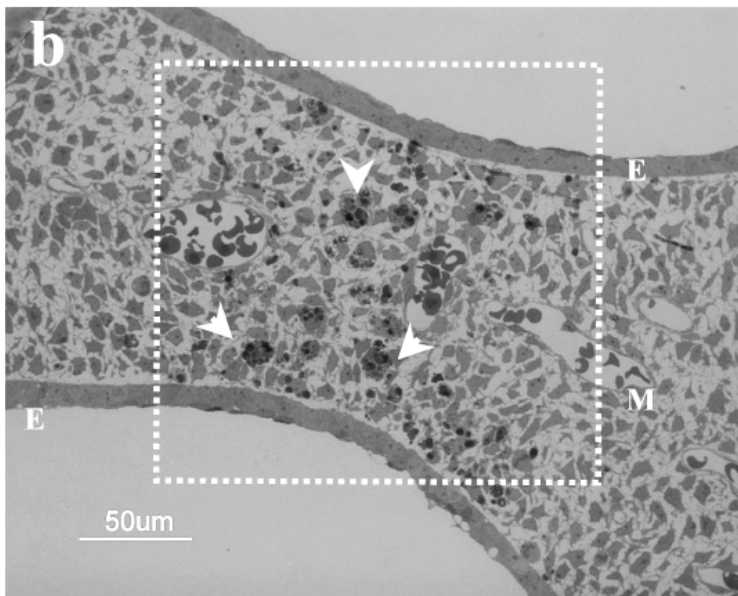
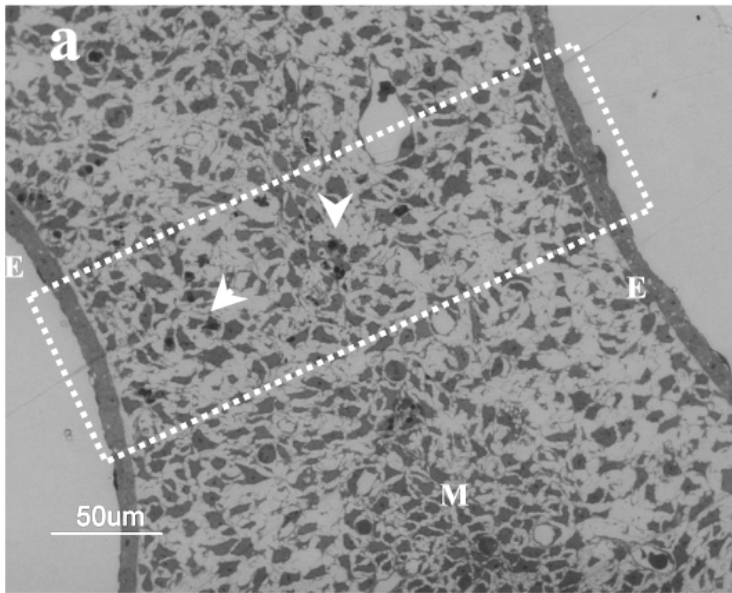


IMAGEN 1.
 Cortes transversales de la región interdigital de las extremidades anteriores de embriones de ratas de diferentes edades. Los cortes teñidos con azul de toluidina permiten observar la morfología general. **a.** Interdígito de 16.5 dpc. **b.** Interdígito de 17.5 dpc. **c.** Interdígito de 18.5 dpc. Tejido epitelial (E), tejido mesenquimal (M), zonas de regresión (cuadros punteados) y células en proceso de muerte (cabezas de flecha).

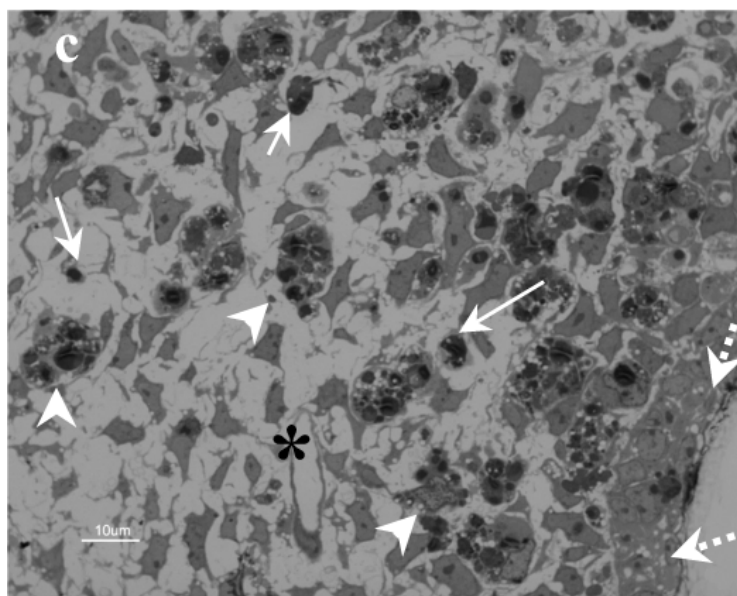
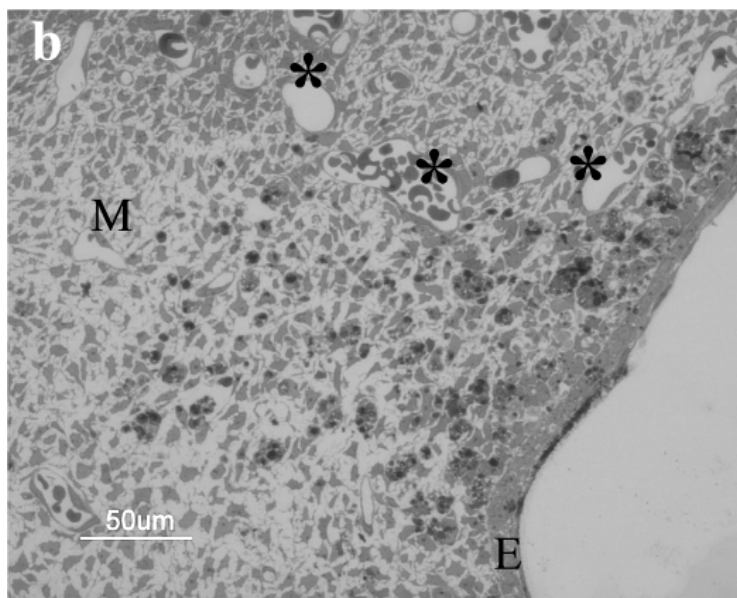
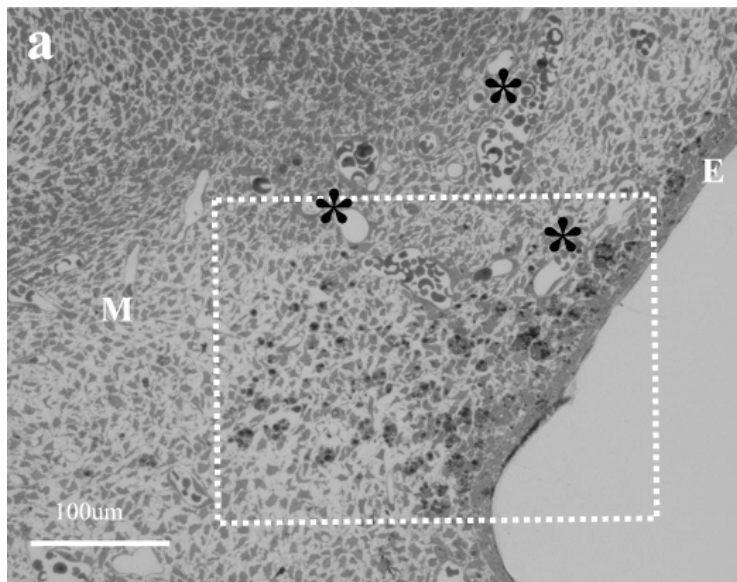


IMAGEN 2.

Corte longitudinal de la región interdigital de 17.5 dpc teñido con azul de toluidina. **a.** Vista panorámica de la membrana interdigital donde se señalan los vasos sanguíneos (asteriscos). **b.** Aumento de la región limitada por el cuadro punteado en *a*, que muestra el tejido epitelial (E), tejido mesenquimal (M) y algunas células alteradas que pueden observarse con mayor detalle en *c*. **c.** Células mesenquimales en proceso de eliminación (flechas) y células fagocíticas (cabezas de flecha). En la región epitelial se observan contracciones celulares (flechas punteadas).

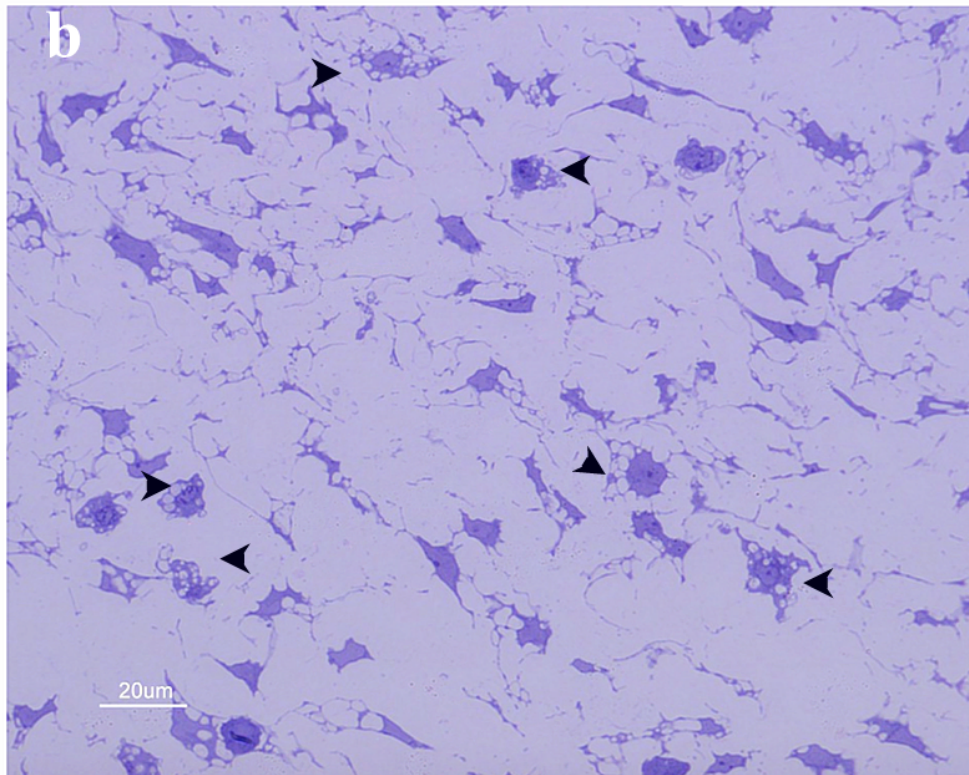
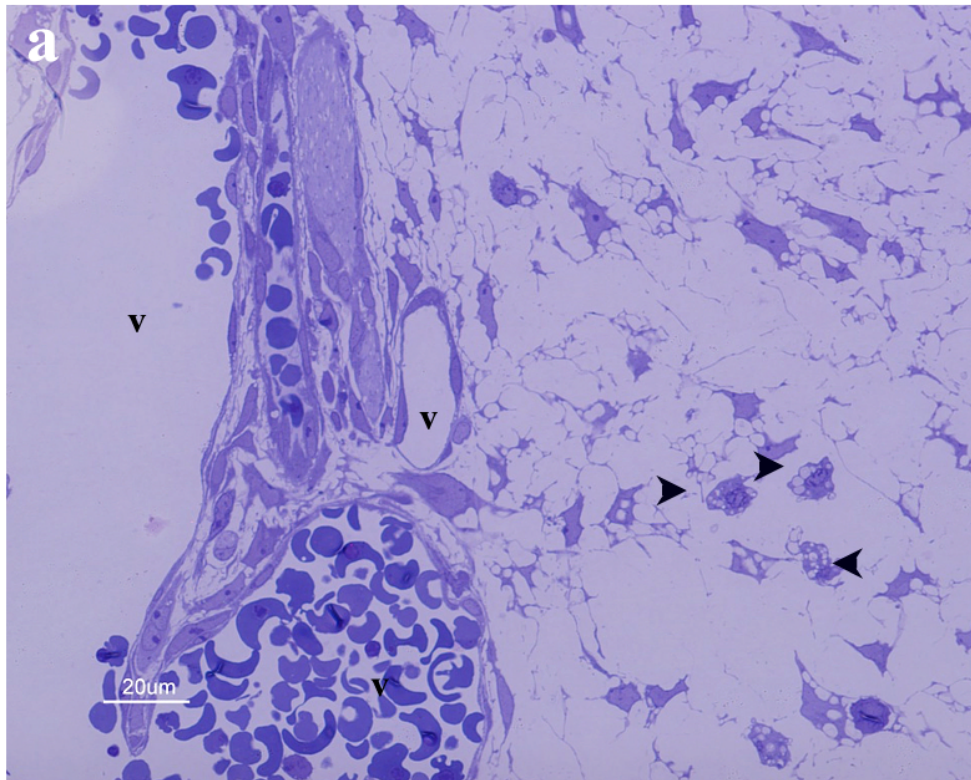


IMAGEN 3. Corte longitudinal de la región interdigital de 17.5 dpc teñido con azul de toluidina. **a** y **b**. Las células mesenquimales cercanas a los vasos sanguíneos (V) presentan vesículas (cabezas de flecha).

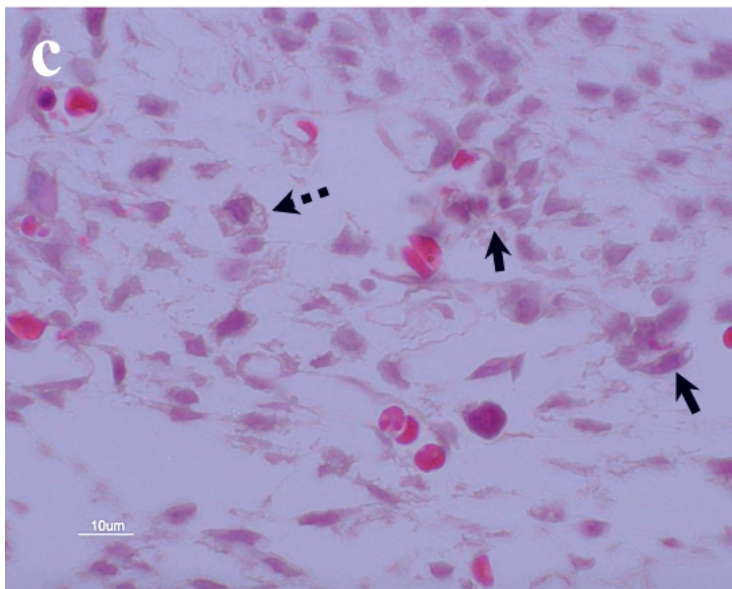
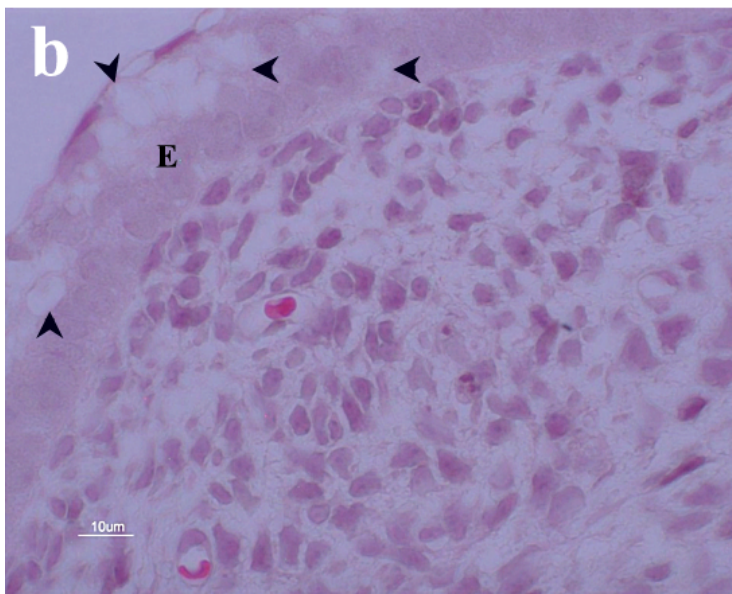
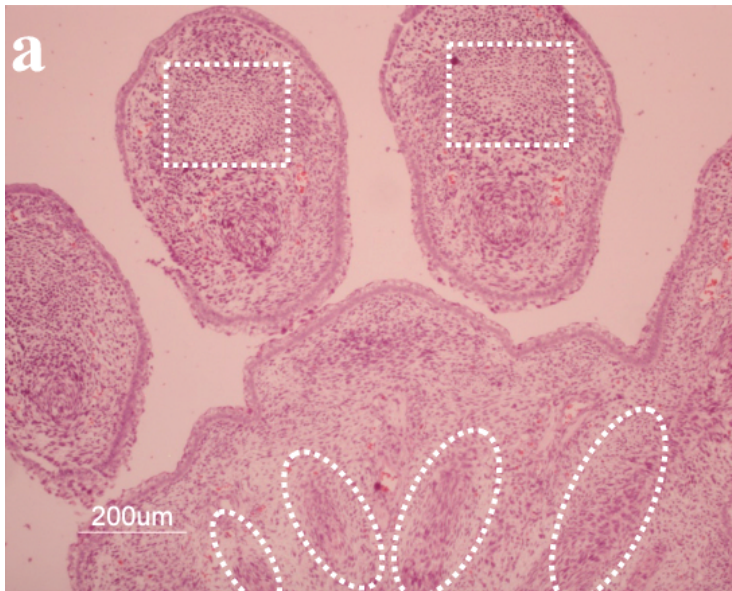


IMAGEN 4.
 Corte longitudinal de una extremidad de rata de 17.5 dpc teñido con Hematoxilina-Eosina. **a.** En la vista panorámica vemos como empiezan a distinguirse los tendones (óvalos punteados) y cartílagos en formación (cuadros punteados). **b.** En la zona de regresión interdigital las células epiteliales muestran dilataciones citoplasmáticas (puntas de flecha). **c:** Algunas células mesenquimales muestran vesículas (flecha punteada) y otras un núcleo con cromatina compacta (flechas).

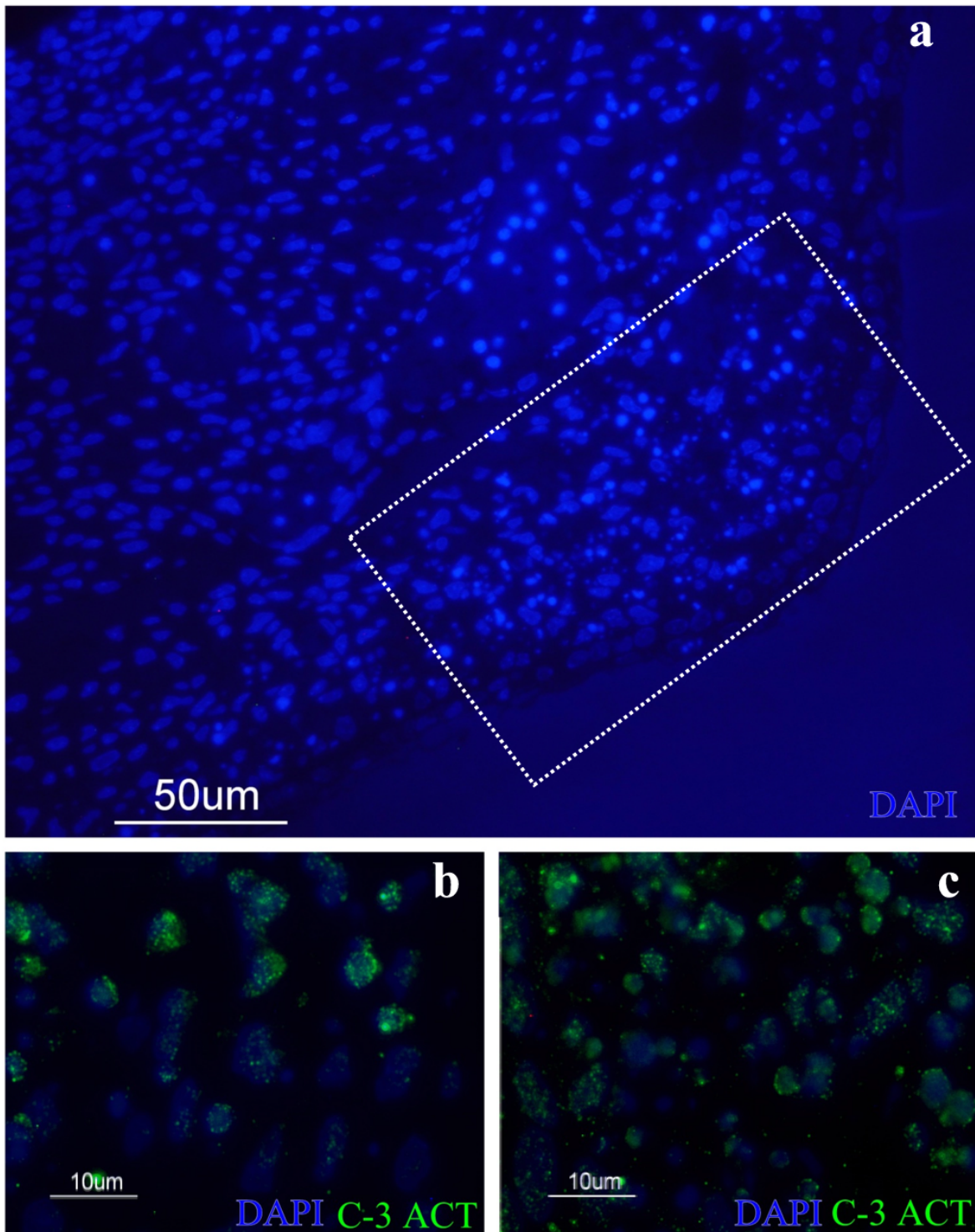


IMAGEN 5. Inmunodetección de la *caspasa-3* activa en corte longitudinal de extremidad de rata de 17.5 dpc con sobreposición de DAPI. **a.** El cuadro punteado muestra la región evaluada. La señal de DAPI (azul) muestra el materia genético de las células y los cuerpos apoptóticos. **b y c:** Señal positiva a la inmunodetección de *caspasa-3* activa (verde).

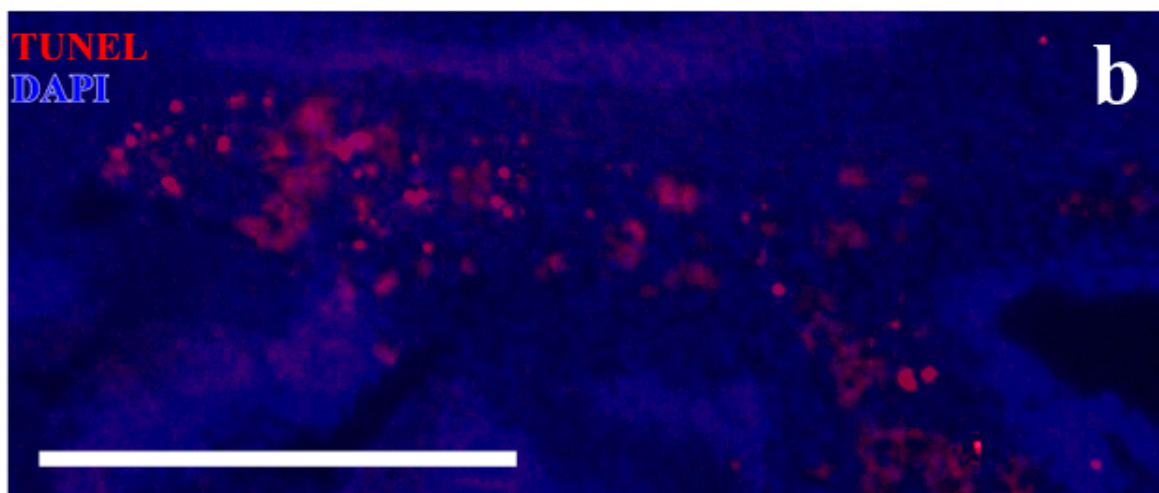
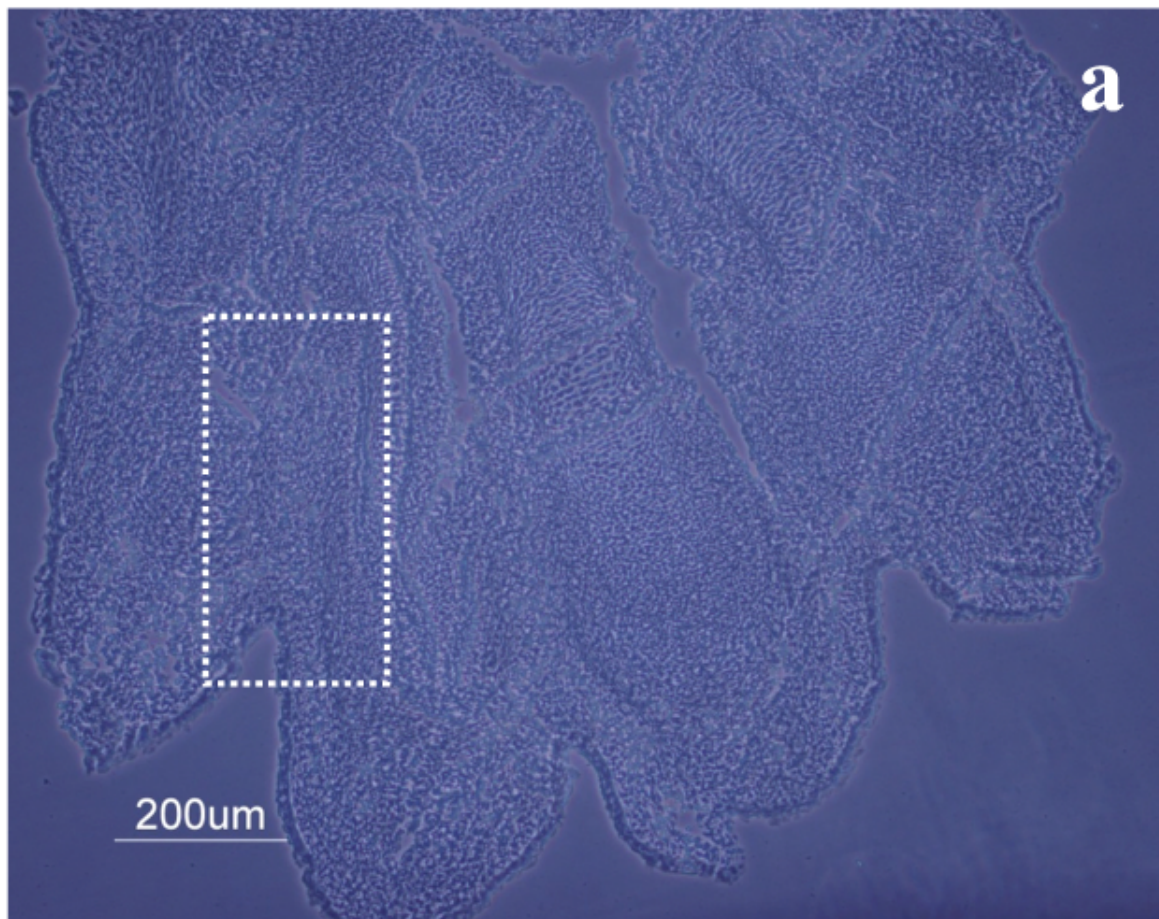


IMAGEN 6. Técnica de TUNEL en extremidad anterior de rata de 17.5 dpc con sobreposición de DAPI (azul). **a.** Corte longitudinal en contraste de fases. El cuadro punteado muestra la región evaluada. **b.** La región interdigital presenta una señal positiva al ensayo de TUNEL que muestra ADN fragmentado (rojo).

II. Microscopía Electrónica

Posterior a la identificación a nivel de microscopía óptica de las características del tejido en proceso de regresión, se hizo una caracterización ultraestructural de las membranas interdigitales de embriones de 17.5 dpc. En cortes ultrafinos de regiones del autópodo que se encuentran alejadas de los interdígitos, vemos que las células mesenquimales muestran características de células sanas y metabólicamente activas: citoplasma homogéneo, integridad de las membranas celulares y prolongaciones citoplasmáticas. En el espacio nuclear se observa la presencia de cromatina laxa (Imagen 7a). Un mayor aumento permite apreciar organelos como el retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias, ambos con morfología normal (Imagen 7b). Mientras tanto, en la región interdigital en regresión, se lleva a cabo el proceso de eliminación de células mesenquimales. Podemos distinguir cuerpos apoptóticos suspendidos en el tejido mesenquimal y/o dentro de vesículas fagocíticas pertenecientes a células mesenquimales vecinas y a macrófagos (Imagen 8a). Algunas regiones del tejido epitelial presentan alteraciones; sus células muestran dilataciones citoplásmicas (Imagen 8a).

Los macrófagos se encuentran únicamente en el tejido mesenquimal; son células de gran tamaño, con un aspecto citoplasmático denso dado por el número de vesículas y cuerpos apoptóticos en su interior (Imagen 8b y 9a). En su citoplasma pueden observarse autofagosomas y restos membranosos dentro de fagosomas (Imagen 9b). Las células mesenquimales con capacidad fagocítica, al igual que los macrófagos, contienen en su citoplasma vesículas con cuerpos apoptóticos y productos de degradación (Imagen 10a y b). Es importante mencionar que además del proceso de muerte celular, las células del tejido interdigital llevan a cabo diferentes procesos biológicos de manera simultánea, como la proliferación. Es relativamente común ver figuras mitóticas tanto en células mesenquimales como en epiteliales (Imagen 10a).

En el tejido mesenquimal se presentan algunos grupos de células con alteraciones que no corresponden a la morfología de la apoptosis. Las células cuentan con vesículas fagocíticas y en algunos casos la membrana celular pierde su integridad (Imagen 11a). Con un gran aumento, vemos que una de esas células ha vertido su contenido citoplasmático al espacio

extracelular (Imagen 11b).

Las alteraciones del tejido epitelial tampoco tienen características propias de la apoptosis. La dilatación del citoplasma se presenta sólo en unos grupos de células y podría ser indicio de un proceso de muerte necrótico. En las imágenes, se pueden observar células vecinas a las zonas alteradas; tales células poseen una ultraestructura normal, lo anterior evidencia que las alteraciones no son un artefacto de la técnica. Vemos que la estratificación del tejido y la membrana basal se conservan (Imagen 12a); sin embargo, el orden citoplasmático y la membrana de las células epiteliales se pierden (Imagen 12b y 12c).

Los resultados ultraestructurales evidencian mayor detalle del proceso de regresión de las membranas interdigitales, ya que se pueden observar células mesenquimales con características propias de la apoptosis y macrófagos con una gran cantidad de restos celulares dentro de su citoplasma. Por otro lado, también fue posible evidenciar que algunas células alteradas presentaban una morfología que no corresponde a la apoptosis, lo que podría indicar que pueden estar involucrados otros procesos de eliminación celular.

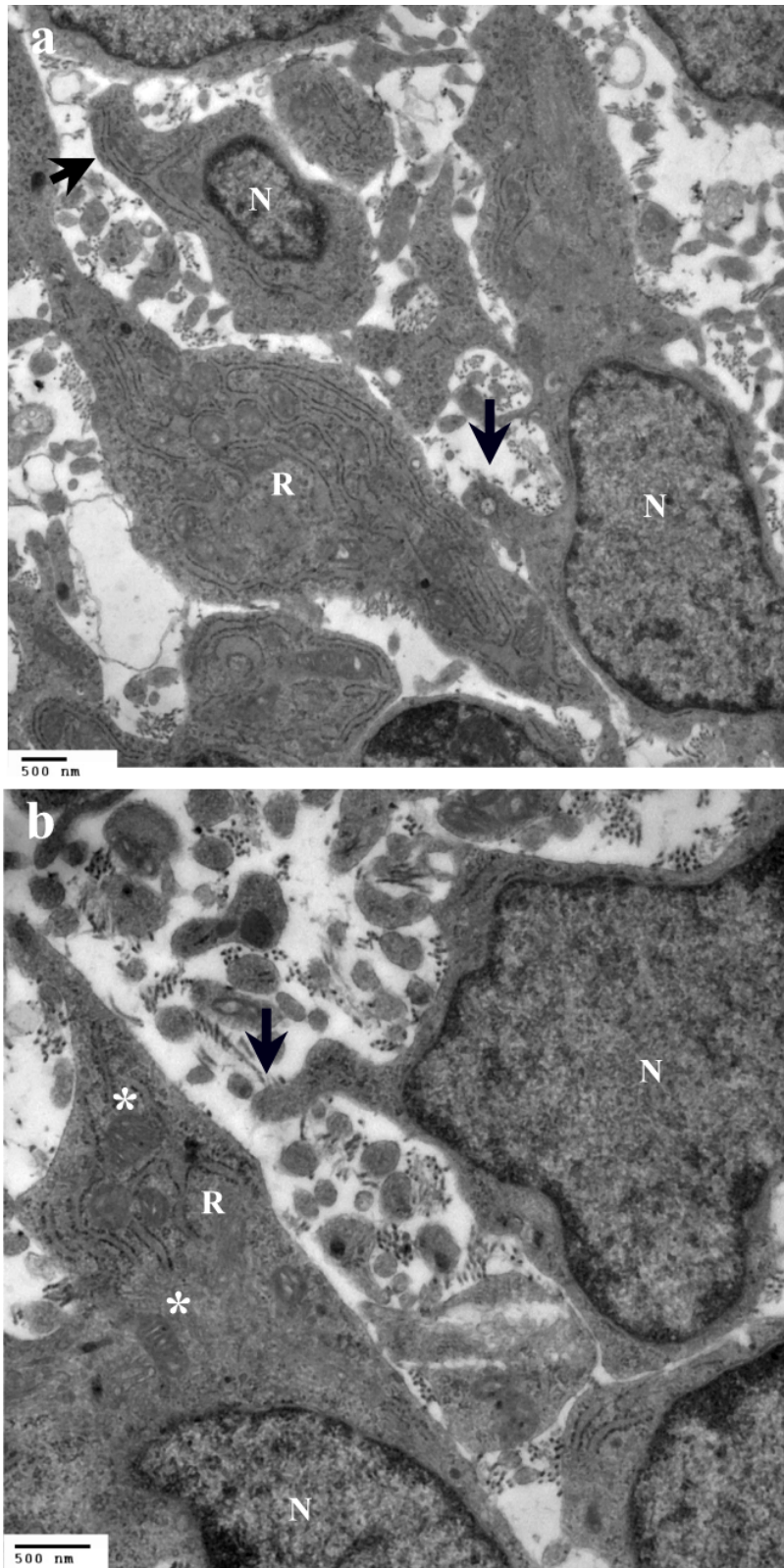


IMAGEN 7. Micrografías electrónicas de una región alejada de los interdógitos contrastadas con Ur/Pb. **a.** Se observa la morfología de las células mesenquimales normales: núcleo con cromatina compacta (N), retículo endoplásmico desarrollado (R), y prolongaciones citoplasmáticas (flechas). **b.** Con mayor aumento vemos que las mitocondrias conservan sus membranas (asteriscos).

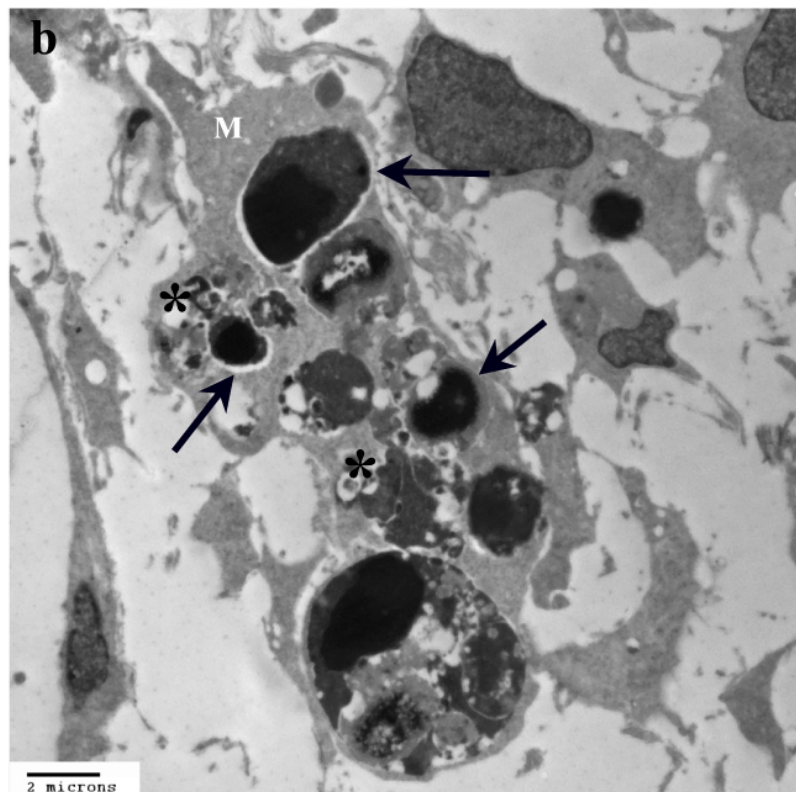
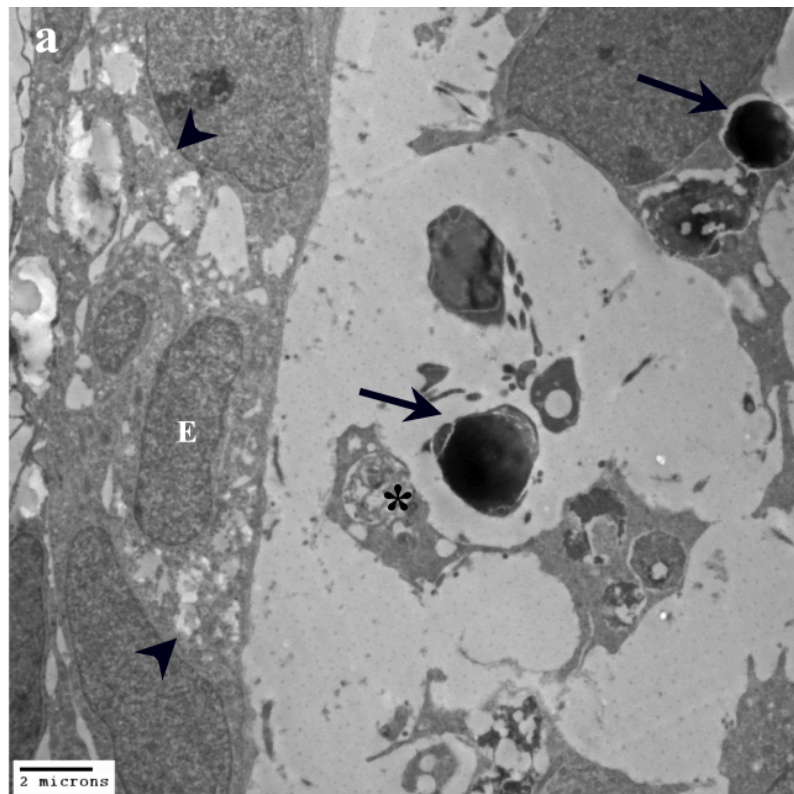
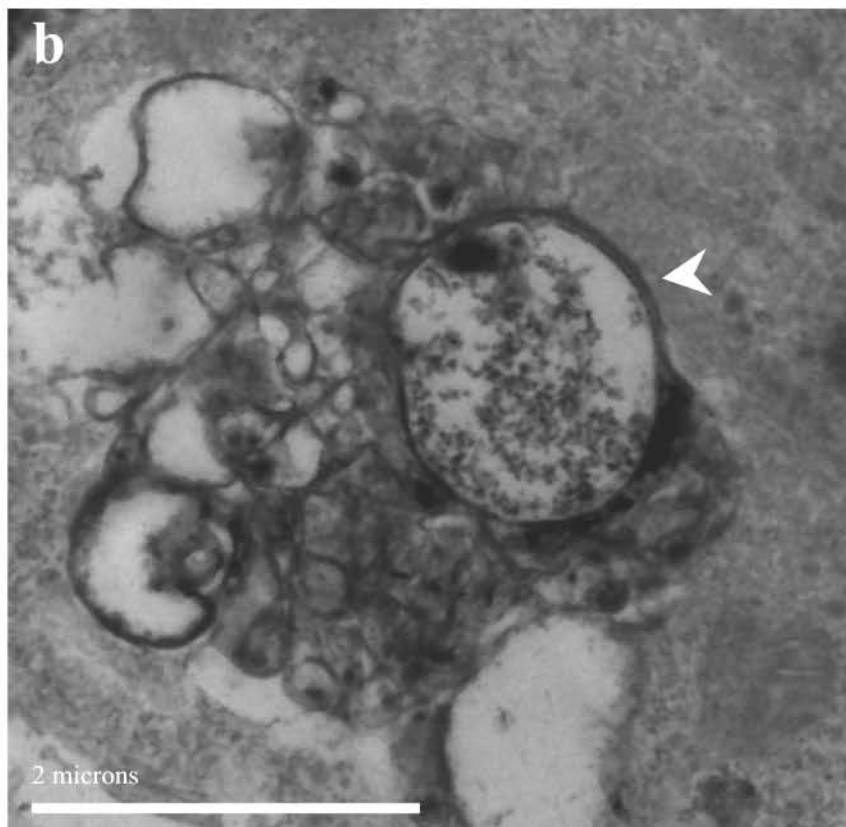
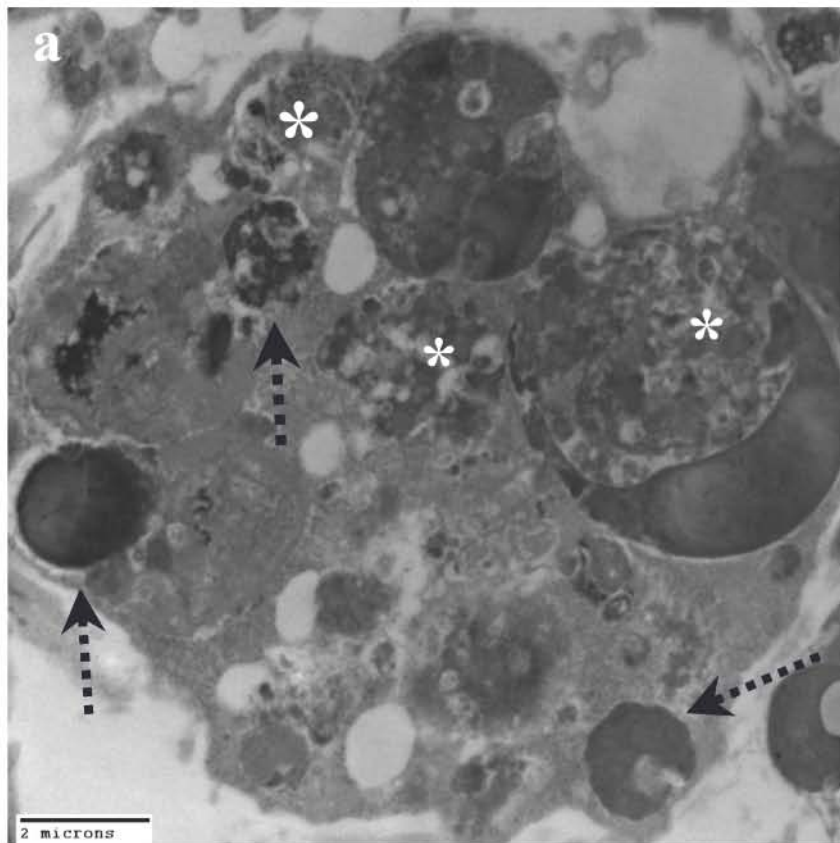


IMAGEN 8. Micrografías electrónicas del proceso de eliminación de células mesenquimales y la alteración en el tejido epitelial contrastadas con Ur/Pb. **a.** En el mésenquima vemos cuerpos apoptóticos (flechas) y células con vesículas fagocíticas (asteriscos). En el epitelio (E), las células muestran dilataciones citoplasmáticas (cabezas de flecha). **b.** Macrófago (M) con vesículas fagocíticas (asteriscos) y cuerpos apoptóticos (flechas) en su interior.



□ IMAGEN 9. Micrografías electrónicas de un macrófago contrastadas con Ur/Pb. **a.** En su interior vemos cuerpos apoptóticos (flechas punteadas) y vesículas fagocíticas (asteriscos). **b.** Con un mayor aumento se observa la doble membrana de un autofagolisosoma (cabeza de flecha).

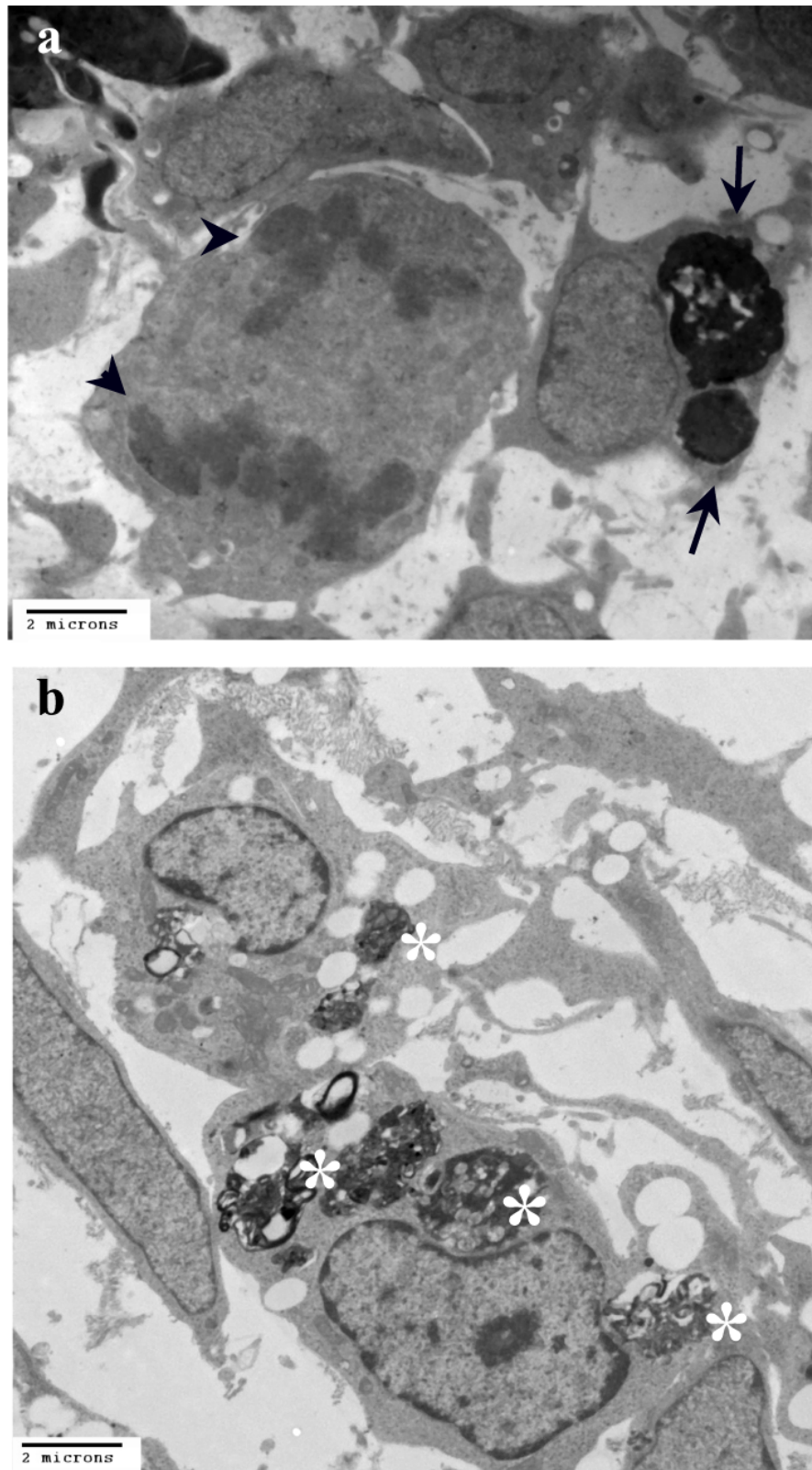


IMAGEN 10. Micrografías electrónicas de los diferentes procesos biológicos que llevan a cabo las células mesenquimales contrastadas con Ur/Pb. **a.** Se muestra una célula con una figura mitótica (cabezas de flecha) y otra que ha fagocitado cuerpos apoptóticos (flechas). **b.** Célula con vesículas fagocíticas vacías y con material de degradación (asteriscos).

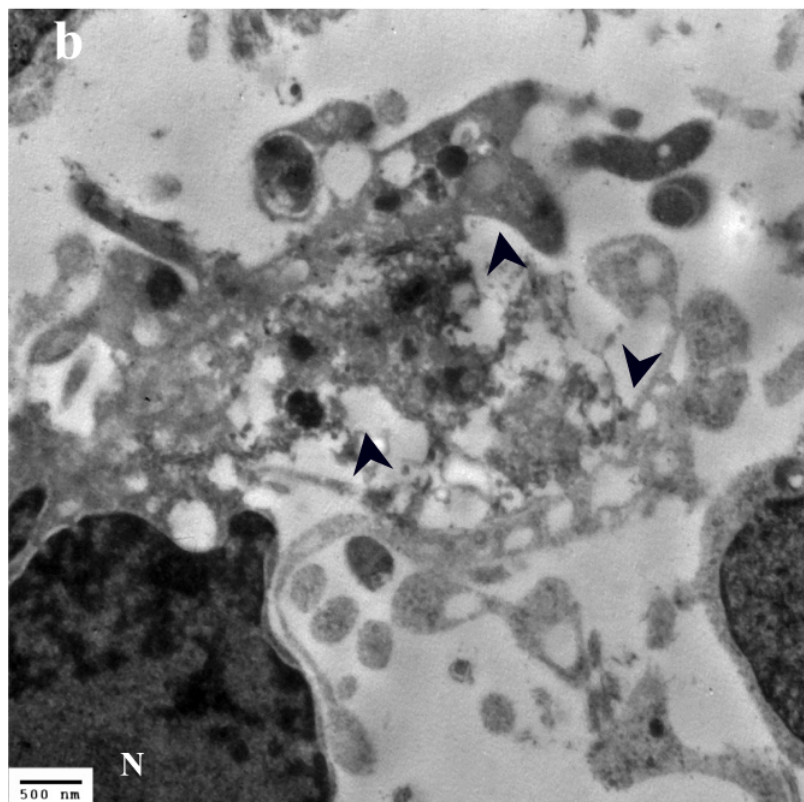
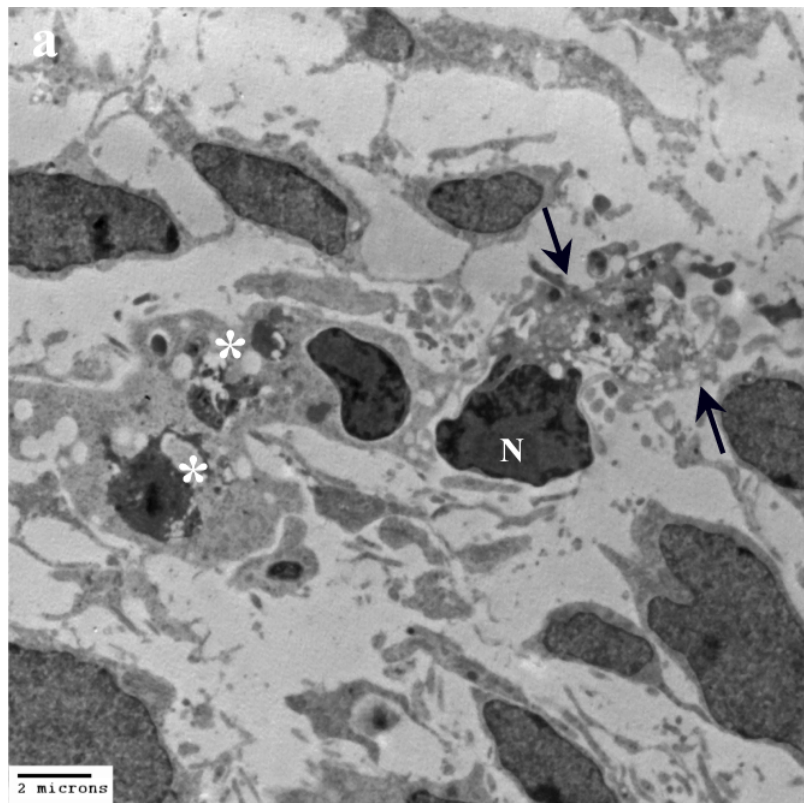
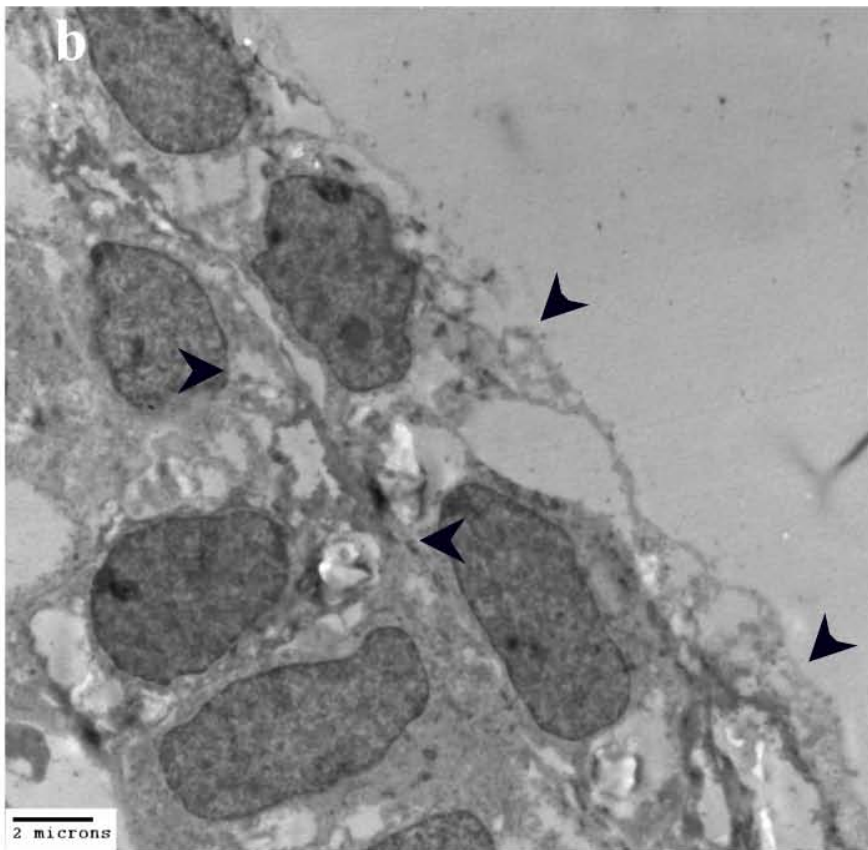
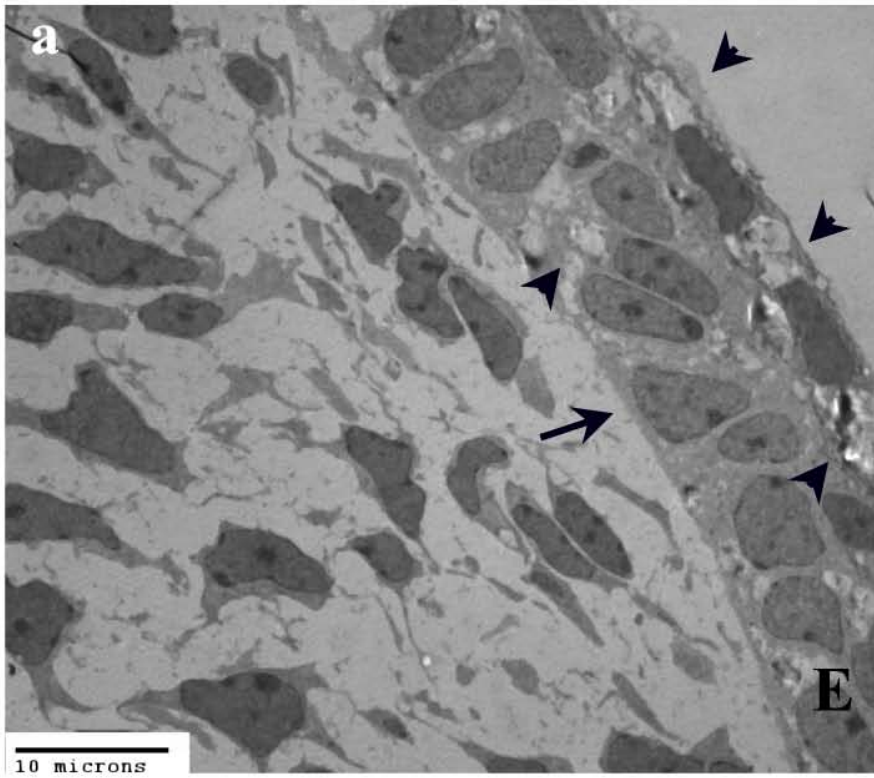


IMAGEN 11. Micrografías electrónicas de células mesenquimales con alteraciones contrastadas con Ur/Pb. **a.** Las células presentan un núcleo con cromatina laxa y compacta (N), vesículas (asteriscos) y una ellas ha vertido su contenido citoplasmático al espacio extracelular (flechas). Con un mayor aumento vemos que esta célula ya no conserva la integridad de su membrana citoplasmática (cabezas de flecha)



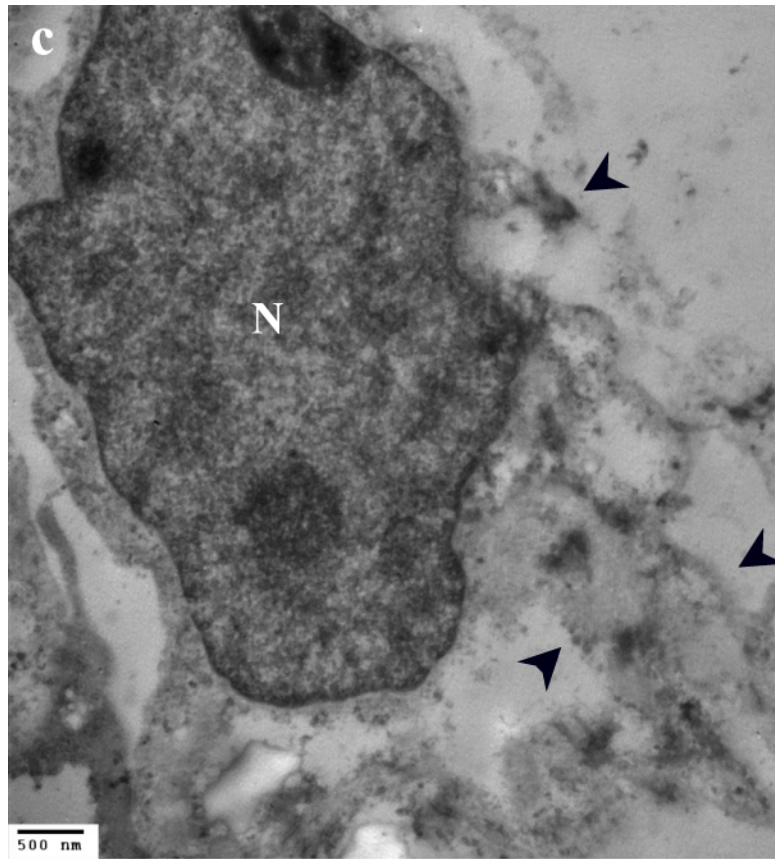


IMAGEN 12. Micrografías electrónicas del tejido epitelial alterado contrastadas con Ur/Pb. **a.** El epitelio (E) conserva su membrana basal (flechas), pero las células presentan dilataciones citoplasmáticas (cabezas de flecha). **b.** La apariencia del citoplasma de las células no es homogénea a causa de las dilataciones (cabezas de flecha). **c.** Con un aumento vemos que el núcleo de una célula tiene cromatina laxa (N), sin embargo, la integridad de la membrana citoplasmática se ha perdido (cabezas de flecha).

DISCUSIÓN

La muerte celular es un proceso por el cual son eliminadas las células que están en desuso o que se encuentran afectadas por alguna anomalía. Se conocen ampliamente los diferentes mecanismos de muerte celular; entre los que destaca la apoptosis, debido a que es la más estudiada y por lo tanto la más descrita. El proceso apoptótico está reportado en diversos eventos biológicos a partir del desarrollo embrionario, donde favorece la correcta arquitectura de diversos órganos. Durante la embriogénesis de algunos organismos vertebrados ocurren eventos importantes, como la eliminación de las membranas interdigitales en las extremidades de los individuos que presentan dígitos individualizados. Evidencias indican que la apoptosis participa durante la regresión interdigital en pollos y en ratones (Fernández *et al.*, 2006). Con respecto a la rata, se ha propuesto que la apoptosis pudiera dirigir la eliminación de las membranas interdigitales (Ballard y Holt, 1968). Sin embargo, las características ultraestructurales, así como las edades a las cuales la eliminación celular es más evidente no son del todo conocidas. En el presente trabajo, se realizaron observaciones a nivel de microscopía óptica y electrónica, que permitieron describir el proceso de eliminación celular que ocurre de manera natural en las regiones interdigitales de embriones de ratas Wistar.

Las características morfológicas que distinguen a la apoptosis son la contracción celular, la fragmentación nuclear, la formación de protuberancias en la membrana celular, así como la formación de cuerpos apoptóticos (Escobar *et al.*, 2015). Las células en proceso de muerte pueden identificarse en cortes para microscopía óptica a través de colorantes que destacan por su afinidad a ciertos componentes, como los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (Ross y Pawlina, 2007). Cuando la cromatina se condensa por mecanismos apoptóticos, la tinción se concentra en el núcleo dándole una apariencia picnótica (Sánchez, 2001). En este trabajo se emplearon técnicas de tinción general que permitieron identificar a las células apoptóticas y se comparó cualitativamente la abundancia de células mesenquimales muertas en tres edades embrionarias diferentes, que forman parte del intervalo conocido de aparición y desaparición de la muerte celular en los interdigitos de las ratas Wistar: 16.5 dpc, 17.5 dpc, y 18.5 dpc (Ballard Holt, 1968). Se vio que la muerte celular interdigital es mayor a los 17.5 dpc en la rata; un tiempo de gestación más avanzado con respecto al

ratón, el cual muestra su mayor tasa de muerte celular a los 14.5 dpc. Al considerar los estadios del desarrollo embriológico que corresponden a esas edades, de acuerdo a la comparación de etapas de las especies de Carnegie (Hill, 2017), vemos que el proceso de regresión interdigital también ocurre en una etapa más temprana del desarrollo en el ratón (etapa 20) que en la rata (etapa 23). La edad de 17.5 dpc se consideró la más adecuada para realizar los estudios posteriores, ya que posee una gran cantidad de células en eliminación.

Observamos que las células muertas suelen encontrarse cercanas a la epidermis y los vasos sanguíneos subyacentes. Lo anterior es comprensible considerando que el ectodermo es un centro señalizador que expresa y regula factores relacionados a la proliferación y sobrevivencia de las células de las extremidades en desarrollo (Chimal *et al.*, 2011). Se ha visto que las señales del ectodermo tienen un papel muy importante en la cascada molecular que culmina con la muerte del tejido interdigital y que su remoción es capaz de inhibirla e inducir la formación de cartílago ectópico (Chen y Zhao, 1998). La cercanía y abundancia de los vasos sanguíneos también se ha correlacionado con la muerte celular; de la oxigenación del tejido depende la producción de especies reactivas del oxígeno, compuestos tóxicos que dañan a las células de la matriz extracelular adyacente al oxidar componentes como el ADN, proteínas y lípidos (Eshkar *et al.*, 2015). Aunado a esto, se sabe que el tejido interdigital expresa una menor cantidad de enzimas antioxidantes para aminorar el daño (Schnabel *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2005).

Se observó que las células mesenquimales muertas son fagocitadas por macrófagos, como han señalado otros investigadores en regiones interdigitales de ratón y aves (Hopkinson *et al.* 1994; Hurlle y Fernández, 1983). Su presencia no es extraña, ya que los macrófagos tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria y la remodelación de los tejidos.

La muerte celular transcurre a la par de la formación de los haces digitales y vemos que algunas de las células mesenquimales que yacen entre ellos presentan vesículas. Células parecidas a éstas, con vesículas fagocíticas y actividad incrementada de la fosfatasa ácida lisosomal, se han visto en las aves durante estadios anteriores al establecimiento de las áreas de muerte; y han sido objeto de especulación para investigadores que sugieren que la

autofagia precede a la apoptosis, como mecanismo de protección ante agentes inductores de estrés (Hurle *et al.* 1996; Hurle *et al.*, 1978).

En este trabajo, las características relacionadas a la condensación de la cromatina y la fagocitosis de las células muertas, apuntaban a que el mecanismo de muerte celular interdigital es la apoptosis, sin embargo, también fue necesario incluir análisis bioquímicos propios del proceso, como la fragmentación del ADN y la participación de las caspasas en su forma activa. Como primer acercamiento para constatar lo anterior, se evaluó la presencia de ADN fragmentado a través de la técnica de TUNEL. Se encontraron células positivas a dicha técnica a lo largo del eje próximo-distal de la región interdigital. La tinción de los núcleos con el colorante fluorescente DAPI, permitió discernir que la señal positiva de TUNEL provenía de los dominios nucleares. Esta distribución coincide con lo observado en otros modelos, donde la muerte celular se detecta inicialmente en la región más distal del autópedo y conforme avanza el desarrollo se encuentra en la región más proximal (Salas *et al.*, 2001). Sin embargo, la fragmentación del ADN no es un proceso exclusivo de la apoptosis, en etapas tardías de la autofagia por ejemplo, también existe fragmentación del ADN (Lockshin y Zakeri, 2004). Por lo que fue necesario realizar la inmunodetección de la proteína *caspasa-3* activa, una caspasa ejecutora muy importante de la vía de muerte celular apoptótica (Escobar *et al.*, 2015), ya que es responsable de muchas características morfológicas que diferencian a la apoptosis. Al evaluar únicamente la señal de DAPI, notamos que había pequeños fragmentos nucleares correspondientes a cuerpos apoptóticos y núcleos de tamaño normal. La sobreposición de señales mostró que la *caspasa-3* activa se encuentra en el citoplasma de las células; dando como conclusión que el tejido mesenquimal es eliminado por apoptosis. Este resultado coincide con lo que se ha documentado en otros modelos experimentales, donde proponen como mecanismo canónico a la muerte celular apoptótica (Hernández y Covarrubias, 2011).

Además de las características estructurales y bioquímicas, en el presente trabajo abordamos el análisis ultraestructural de las zonas en regresión de las membranas interdigitales, utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión. Tomamos como morfología control a las células mesenquimales de una región alejada de los interdígitos. Estas células tienen la morfología normal de una célula mesenquimal: un núcleo con cromatina laxa y

compacta, un citoplasma homogéneo, integridad de las membranas celulares y sus organelos, así como prolongaciones citoplasmáticas (Zimmerman *et al.*, 1982). En tanto, la morfología de las células en las zonas de regresión tuvo diferencias notables. A este nivel de estudio fue posible ver dos tipos de células fagocíticas: fagocitos especializados como los macrófagos y células mesenquimales capaces de engullir los restos de células vecinas.

La existencia de células mesenquimales fagocíticas ha sido muy discutida, pero se ha reportado en aves (Hurle *et al.*, 1996) y en ratones (Zakeri y Ahuja, 1994; Zakeri y Lockshin, 2002), como un mecanismo redundante y compensatorio a la actividad fagocítica de los macrófagos (Wood *et al.*, 2000). En el citoplasma de un macrófago encontramos un autofagosoma y los restos membranosos dentro de un fagosoma, lo anterior es normal considerando que en la mayoría de los tejidos existen niveles de autofagia basal (Escobar *et al.*, 2015).

Tal como se esperaba por los resultados previos, se encontraron células apoptóticas y cuerpos apoptóticos en el tejido mesenquimal, corroborando que este mecanismo está presente en el proceso de eliminación celular. De manera simultánea a la muerte celular pero con menor frecuencia, vimos células en proliferación, así como en otros estudios donde el aumento progresivo en la tasa de muerte celular está acompañada por la inhibición de la mitosis en las células mesenquimales (Zuzarte-Luis *et al.*, 2006).

Los resultados ultraestructurales mostraron que no sólo las células mesenquimales se ven alteradas durante la regresión interdigital, sino también las células epiteliales. Este tipo celular mostró contracciones celulares que indican una posible eliminación tipo apoptótica; sin embargo, en algunos grupos celulares notamos características ajenas a la apoptosis, como la pérdida de integridad en las membranas celulares y dilataciones citoplasmáticas, lo que podría estar indicando que tal vez la epidermis asociada a las zonas de regresión interdigital, es eliminada por un proceso mas parecido a la necrosis. No se ha reportado una alteración así durante la regresión interdigital en el ectodermo de aves ni mamíferos, pero se sabe que antes del nacimiento todas las células epiteliales que conforman el AER mueren sin dejar descendientes en células de otros linajes (Fernández y Ros, 2008; Guo *et al.*, 2003); quizá este fenómeno sea parte de su proceso de eliminación.

La información bibliográfica disponible hasta ahora, sobre la señalización y aparición de la muerte celular en las regiones interdigitales de los vertebrados, aunada a los hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos descritos en este trabajo, nos permite proponer el siguiente modelo de señalización durante la morfogénesis de los interdigitos, los rayos digitales y su relación con los tipos de muerte celular presentes en la regresión interdigital en ratas *Wistar* (Figura 11).

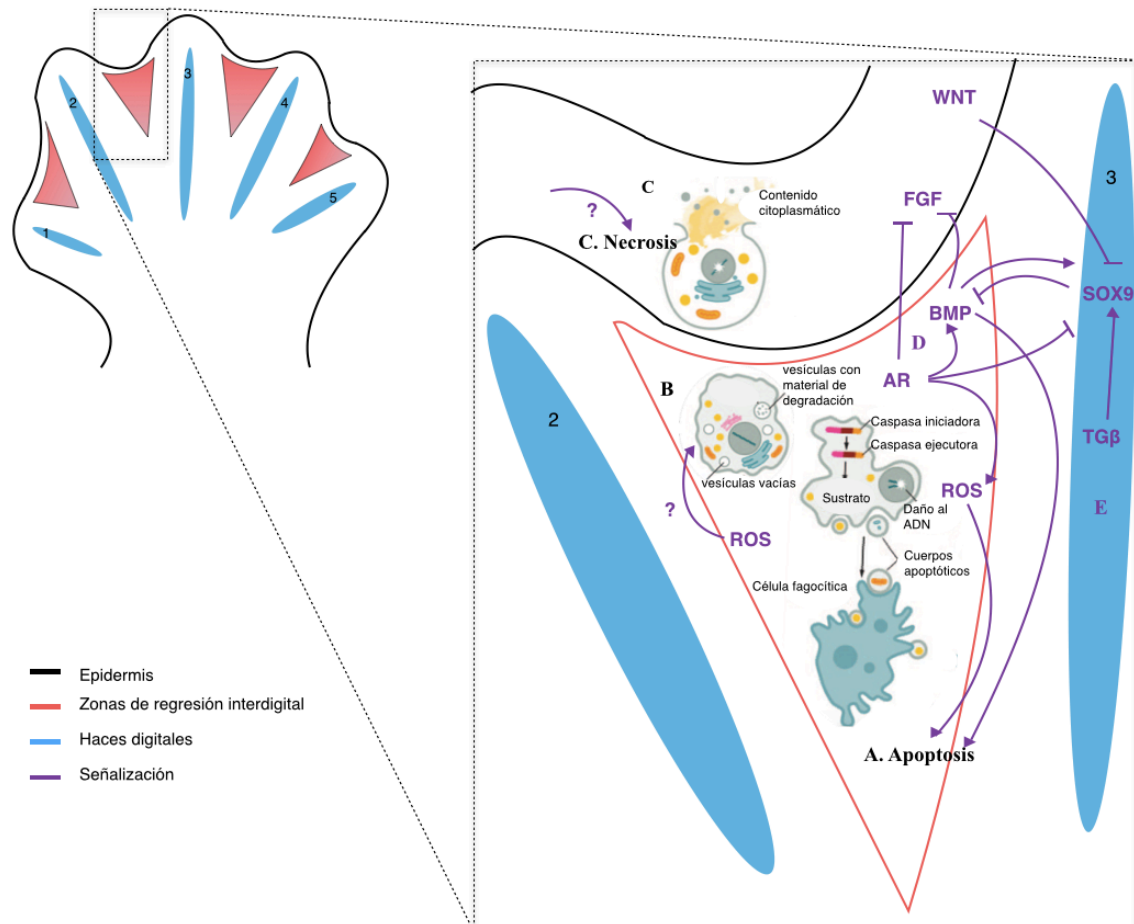


FIGURA 11. Representación esquemática: **A**, **B** y **C**. Participación de los diferentes tipos de muerte celular en la morfogénesis de interdigitos y de rayos digitales durante el desarrollo embrionario de ratas de 17.5 dpc. **A.** Apoptosis. Las células apoptóticas son engullidas por células fagocíticas, como macrófagos y células mesenquimales vecinas. **B.** La presencia de células con vesículas podría estar relacionada a la producción de ROS y su efecto senescente. **C.** Posible necrosis. Son hasta ahora desconocidas las causas que conducen a las células epiteliales a tener una morfología necrótica. **D.** Papel de diversos factores en las zonas de regresión interdigital: AR y BMP's antagonizan la expresión de los factores de proliferación y supervivencia FGF's y SOX9; favorece la aparición de mediadores de la apoptosis como ROS y los mismos BMP's. **E.** En los haces digitales la señal de TGFβ desencadena la expresión de SOX9 y con ello la formación de cartílago. SOX9 es antagonizado en el ectodermo por WNT e inhibe la expresión de BMP's (de acuerdo a la bibliografía). Figuras tomadas y modificadas de Fink y Cookson 2005.

La muerte celular durante el desarrollo es un tema de estudio sin dilucidar en su totalidad; cada vez se encuentran más elementos e intercomunicación entre las vías de señalización de la embriogénesis, que nos hacen reflexionar sobre la alta regulación de este proceso y la enorme importancia que tiene en la morfogénesis de los tejidos. Es necesario realizar más estudios para conocer los mecanismos regulatorios y las formas de muerte celular que contribuyen de manera natural al proceso de regresión interdigital.

CONCLUSIONES

- La eliminación de las membranas interdigitales en embriones de rata es cualitativamente mayor a los 17.5 dpc.
- El tejido mesenquimal interdigital es degradado por apoptosis.
- El tejido epitelial parece tener una ruta de eliminación celular más parecida a la necrosis.
- La fagocitosis es ejecutada por macrófagos y células mesenquimales.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca-Buis RF, Garcíadiego-Cázares D y Chimal-Monroy J. (2006) Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de la extremidad de los vertebrados. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 9(2):78-89

Aburto MR, Hurlé JM, Varela-Nieto I y Magariños M. (2012) Autophagy During Vertebrate Development. *Cells* 1: 428-448.

Baehrecke EH. (2002) How death shapes life during development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 779-787.

Ballard KJ y Holt SJ. (1968) Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes. *Journal of Cell Science*. 3: 245-262

Bell SM, Schreiner CM y Scott WJ. (1998) The loss of ventral ectoderm identity correlates with the inability to form an AER in the legless hindlimb bud. *Mechanisms of Development*. 74: 41-50.

Svandova EB, Vesela B, Lesot H, Poliard A y Matalova E. (2017) Expression of Fas, FasL, caspase-8 and other factors of the extrinsic apoptotic pathway during the onset of interdigital tissue elimination. *Histochemistry and Cell Biology*. 147:497–510

Brancati F, Fortugno P, Bottillo I, Lopez M, Josselin E, Boudghene-Stambouli O, Agolini E, Bernardini L, Bellacchio E, Iannicelli M, Rossi A, Dib-Lachachi A, Stuppia L, Palka G, Mundlos S, Stricker S, Kornak U, Zambruno G y Dallapiccola B. (2010) Mutations in PVRL4, encoding cell adhesion molecule nectin-4, cause ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome. *The American Journal of Human Genetics - Cell Press*. 87: 265-273

Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P y Golstein P. (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Current Biology*. 9(17): 967-974.

Chen Y y Zhao X. (1998) Shaping Limbs by Apoptosis. *The journal of experimental zoology*. 15;282 (6):691-702.

Chimal-Monroy J, Abarca-Buis RF, Cuervo R, Díaz-Hernández M, Bustamante M, Rios-Flores JA, Romero-Suárez S y Farrera-Hernández A. (2011) Molecular Control of Cell Differentiation and Programmed Cell Death during Digit Development. *Life*. 63(10): 922–929

Díaz-Mendoza MJ, Lorda-Diez CI, Montero JA, García-Porrero JA y Hurlé JM. (2013) Interdigital cell death in the embryonic limb is associated with depletion of Reelin in the extracellular matrix. *Cell Death and Disease*. 4: e800.

Dupé V, Ghyselinck NB, Thomazy V, Nagy L, Davies PJ, Chambon P y Mark M. (1999) Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Developmental Biology*. 208: 30-43.

Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T y Vandenabeele P. (2009) Major cell death at glance. *Microbes and Infection*. 11: 1050-1062

Escobar ML, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH. (2015) Necrosis as Programmed Cell Death. En: *Cell Death-Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. Editor Tobias Ntuli. InTechOpen. 419-434

Eshkar-Oren I, Krief S, Ferrara N, Elliott AM, Zelzer E. (2015) Vascular patterning regulates interdigital cell death by a ROS-mediated mechanism. *Development*. 142: 672-680

Fallon JF, López A, Ros MA, Savage MP, Olwin BB y Simandl BK. (1994) FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* 264: 104-107.

Fernández-Terán MA, Hinchliffe JR y Ros MA. (2006) Birth and Death of Cells in Limb Development: A Mapping Study. *Developmental Dynamics*. 235:2521–2537

Fernandez-Teran M y Ros MA. (2008) The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *The International Journal of Developmental Biology*. 52: 857-871

Fink SL y Cookson BT. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 73(4):1907-16.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L y Kroemer G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*. 14: 1237–1266

Garcia-Martinez V, Macias D, Gañan Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA y Hurle JM. (1993) Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *Journal of Cell Science*. 106:201-208

Guo Q, Loomis C y Joyner AL. (2003) Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. *Developmental Biology*. 264: 166-178.

Hamburger V y Hamilton HL. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 88(1): 49-92.

Hernández-Martínez R y Covarrubias L. (2011) Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. *Development and Growth Differentiation*. 53: 245–258

Hernández-Martínez R, Castro-Obregón S y Covarrubias L. (2009) Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 136: 3669-3678.

Hill MA. (2017) Embryology Carnegie Stage Comparison. Recuperado el 25 de Septiembre 2017 de https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison.

Hopkinson-Woolley J, Hughes D y Gordon S, Martin P. (1994) Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *Journal of Cell Science*. 107:1159-1167

Hurle J y Hinchcliffe JR. (1978) Cell death in the posterior necrotic zone (PNZ) of the chick wing-bud: a stereoscan and ultrastructural survey of autolysis and cell fragmentation. *Journal of embryology and experimental morphology*. 43:123-36.

Hurle JM y Fernandez-Teran MA. (1983) Fine structure of the regressing interdigital membranes during the formation of the digits of the chick embryo leg bud. *Journal of embryology and experimental morphology*. 78:195-209.

Hurle JM, Ros MA, Climent V y Garcia-Martinez V. (1996) Morphology and Significance of Programmed Cell Death in the Developing Limb Bud of the Vertebrate Embryo. *Microscopy Research and Technique*. 34: 236-246

Klionsky y cols. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 4(2): 151–175.

Lee KK, Chan WY y Sze LY. (1993) Histogenetic Potential of Rat Hind-Limb Interdigital Tissues Prior to and During the Onset of Programmed Cell Death. *The Anatomical Record*. 236:568-572

Lockshin RA y Zakeri Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36:2405–2419

Loomis CA, Kimmel RA, Tong CX, Michaud J y Joyner AL. (1998) Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development*. 125: 1137- 1148.

Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA y Hurle JM. (2015) Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *The International Journal of Developmental Biology*. 59: 55-62

Maatouk DM, Choi KS, Bouldin CM y Harfe BD. (2009) In the limb AER *Bmp2* and *Bmp4* are required for dorsal-ventral patterning and interdigital cell death but not limb outgrowth. *Developmental Biology*. 327: 516-523.

Martin GR. (1998) The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes and Development*. 12: 1571-1586.

Meyer RA, Cohen MF, Recalde S, Zakany J, Bell SM, Scott WJ Jr y Lo CW. (1997) Developmental regulation and asymmetric expression of the gene encoding Cx43 gap junctions in the mouse limb bud. *Developmental Genetics*. 21: 290-300.

Mizushima N, Yoshimori T y Levine B. (2010) Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 140(3): 313–326.

Montero JA y Hurlé JM. (2010) Sculpting digit shape by cell death. *Springer. Apoptosis*. 15:365–375

Montero JA, Lorda-Diez CI, Certal AC, Moreno N, Rodriguez-Leon J, Torriglia A y Hurle JM. (2010). Coordinated and sequential activation of neutral and acidic DNases during interdigital cell death in the embryonic limb. *Apoptosis*. 15(10):1197-210.

Montero JA, Sanchez-Fernandez C, Lorda-Diez CI, Garcia-Porrero JA y Hurle JM. (2016) DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos. *Scientific reports. Nature*. 6:35478

Nakanishi K, Maruyama M, Shibata T y Morsishima N. (2001) Identification of a Caspase-9 Substrate and Detection of Its Cleavage in Programmed Cell Death during Mouse Development. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, (44): 41237–41244.

Petit F, Sears KE, Ahituv N. (2017) Limb development: a paradigm of gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*. *Nature Reviews Genetics*. 18(4):245-258.

Ravichandran KS y Lorenz U. (2007) Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature Reviews Immunology*. 7(12):964-74.

Rodriguez-Leon J, Merino R, Macias D, Gañan Y, Santesteban E y Hurle JM. (1999) Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nature Cell Biology*. 1: 125-126.

Ross H y Pawlina W. (2007) *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. 6-9.

Salas-Vidal E, Valencia C y Covarrubias L. (2001) Differential Tissue Growth and Patterns of Cell Death in Mouse Limb Autopod Morphogenesis. *Developmental Dynamics*. 220:295-306.

Sánchez S. (2001) Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 20(4):266-74

Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA (México). SENASICA: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Slack J. (2006) *Essential developmental biology*. Segunda edición. Blackwell Publishing. 233-241

Schnabel D, Salas-Vidal E, Narváez V, Sánchez-Carbente Mdel R, Hernández-García D, Cuervo R y Covarrubias L. (2006) Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Developmental Biology*. 291: 291–299

Shan SW, Tang MK, Cai DQ, Chui YL, Chow PH, Grotewold L y Lee KK. (2005) Comparative proteomic analysis identifies protein disulfide isomerase and peroxiredoxin 1 as new players involved in embryonic interdigital cell death. *Developmental Dynamics*. 233: 266-281.

Swart C, Du Toit A y Loos B. (2016) Autophagy and the invisible line between life and death. *European Journal of Cell Biology*. 95, 598–610

Tait SW, Ichim G y Green DR. (2014) Die another way: non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*. 127: 2135–2144

Taylor RC, Cullen SP y Martin SJ. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Mol Cell Biology*. 9(3):231-41.

Tickle C y Münsterberg A. (2001) Vertebrate limb development – the early stages in chick and mouse. *Current Opinion in Genetics and Development*. 11: 476 -481.

Theiler K. (1989) *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. New York: Springer-Verlag. 53-60, 87-109 y 118.

Todt WL y Fallon JF. (1984) Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *Journal of embryology and experimental morphology*. 80: 21-41.

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR y Martin P. (2000) Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*. 127: 5245-5252

Young JJ y Tabin CJ. (2016) Saunders's framework for understanding limb development as a platforms for investigating limb evolution. *Developmental Biology*. 429(2):401-408

Zakeri ZF y Ahuja HS. (1994) Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation. *Biochemistry and Cell Biology*. 72(11-12):603-13.

Zakeri ZF y Lockshin RA. (2002) Cell death during development. *Journal of Immunological Methods* 265: 3 – 20

Zeller R, López-Ríos J y Zuniga A. (2009) Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*. 10(12):845-58.

Zimmerman B, Scharlach E y Kaatz R. (1982) Cell contact and surface coat alterations of limb-bud mesenchymal cells during differentiation. *Journal of embryology and experimental morphology*. 72:1-18.

Zuzarte-Luis V, Berciano MT, Lafarga M y Hurlé JM (2006) Caspase redundancy and release of mitochondrial apoptotic factors characterize interdigital apoptosis. *Apoptosis* (5)11: 701–715