



03081

1
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACPYP del CCH.

**FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA
MUERTE DE CELULAS TRONCALES
EMBRIONARIAS DE RATON**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Doctora en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA

M. en C. Susana Castro Obregón

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES

CUERNAVACA, MOR.

JUNIO DE 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

CONTENIDO

Abreviaturas

Resumen

Abstract

I. Introducción (Publicación 1).

1. Generalidades
2. Las proteasas en la MCP.
3. La familia de CED-9/BCL-2
4. Otros reguladores positivos y negativos de la MCP.
5. Señales que convergen en la maquinaria de muerte.
6. La apoptosis y el ciclo celular.
7. Conclusiones y perspectivas.

II. Justificación.

1. Las células ES son un buen modelo de estudio.
2. El ácido retinoico podría ser un inductor de MCP.

III. Objetivos.

IV. Materiales y Métodos.

1. Transcripción reversa asociada a la reacción de polimerización en cadena.
2. Transfección de células ES por lipofección.
3. Mapa de los vectores transfectados: Pol2neo y PGKbcl-2Neo.
4. Concentraciones usadas para los antioxidantes.
5. Cultivo en hipoxia.
6. Programa PROPSEARCH para buscar proteínas homólogas funcionales.
7. Análisis de RNAm por Northern.
8. Gel de retardamiento para determinar cambios de afinidad de IRP.

V. Resultados.

- A) Estudio del mecanismo de MCP.
1. La ausencia de 2ME provoca la muerte apoptótica en las células ES.
 2. La presencia de Bcl-2 no parece prevenir la muerte por ausencia de 2ME.
 3. El patrón de expresión de algunos genes de muerte no cambia durante la MCP de las ES.
 4. Es posible que el mecanismo de protección de 2ME no involucra la prevención de estrés oxidativo general.
 5. El GSH no participa en la sobrevivencia, sino estimula la proliferación.
 6. El hierro pudiera tener un efecto en la sobrevivencia celular.
- B) Estudio de la regulación de MCP.
1. El AR induce apoptosis y estrés oxidativo en células de cuerpos embrionario (Publicación 2).
 2. La generación de estrés oxidativo podría ser un requerimiento común en la MCP durante el desarrollo (Publicación 3).

VI. Discusión.

1. La expresión abundante de bcl-2 puede resultar letal en las células ES.
2. El estrés oxidativo como señal transductora.
3. Mecanismo de acción del 2ME.
4. El hierro podría modular la actividad de la maquinaria de muerte.
5. El AR podría ser un inductor de MCP durante el desarrollo.
6. Las células ES tienen un ciclo celular anormal que podría predisponerlas a la muerte.

VII. Perspectivas.

1. Sobre-expresión de las enzimas antioxidantes en precursores neuronales.
2. Sobre-expresión constitutiva de las enzimas antioxidantes.
3. Generación de ratones con una disrupción en el gen de la catalasa.

VIII. Referencias.

ABREVIATURAS

2ME	2-mercaptoetanol
Act	actinomicina D1
AE	ácido etacrínico
AR	ácido retinóico
BMP	factor morfogenético de hueso
CHX	cicloheximida
DM	dominio de muerte
DMSO	dimetil sulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
ERO	especies reactivas de oxígeno
ES	células embrionarias totipotenciales
GSH	glutación reducido
IRE	elemento de regulación por fierro
MCP	muerte celular programada
NAC	N-acetil cisteína
NGF	factor de crecimiento neural
OTC	ácido 2-oxo-4-tiazolidino-carboxílico
pb	pares de bases
RE	retículo endoplásmico
RNA	ácido ribonucleico
RNA^m	ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	transcripción reversa asociada a la reacción de polimerización en cadena
TI	transferrina
TNF	factor de necrosis tumoral
X_{xx}	gen "X"
XXX	proteína X

RESUMEN

La muerte celular programada (MCP) es un proceso fisiológico con una importancia equivalente a los procesos de proliferación y diferenciación celular, y al igual que estos procesos es regulado por factores extracelulares e intracelulares; recientemente se han identificado genes específicos que codifican para proteínas que la regulan positiva y negativamente. La correcta regulación de la MCP es importante para la morfogénesis durante el desarrollo, así como para el mantenimiento de la homeostasis en el adulto y el funcionamiento del sistema inmune. El presente trabajo es un esfuerzo para entender el mecanismo y regulación de la MCP en células embrionarias pluripotenciales (ES) de ratón. Se establecieron 2 modelos de estudio, uno utilizando células indiferenciadas que mueren por ausencia de 2 mercaptoetanol (2ME) y otro utilizando cuerpos embrionarios que mueren por presencia de ácido retinoico (AR). En ambos modelos se demostró que la muerte es apoptótica y se analizó el papel del estrés oxidativo en la progresión de la muerte. A pesar de que el 2ME es un agente reductor y en su ausencia hay un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO), su efecto protector parece no deberse únicamente a la reducción generalizada de ERO, pues no fue sustituido por otros antioxidantes y la disminución de la concentración de oxígeno en la atmósfera no atenuó la cinética de muerte en ausencia de 2ME. Nuestros resultados sugieren que el efecto protector del 2ME involucra la reducción de un blanco específico, tal vez relacionado con el metabolismo de hierro, ya que la presencia de transferrina resultó capaz de estimular la sobrevivencia en ausencia de 2ME. El AR indujo apoptosis en células de cuerpos embrionarios, mas no en células indiferenciadas. La inducción de la muerte depende de la generación de estrés oxidativo, pues la sobrevivencia aumentó en presencia de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa. Aunque las células indiferenciadas no murieron en presencia de AR, son capaces de responder a éste, pues diferenciaron hacia neuronas cuando además se retiró el suero. El 2ME también induce la sobrevivencia de células diferenciadas, ya que su presencia permitió detectar neuronas en respuesta a AR. Es posible que el estrés oxidativo participe en la MCP durante el desarrollo embrionario, ya que en un sistema *in vitro* de desarrollo de los miembros de embriones de ratón, la MCP que ocurre en los interdígitos disminuyó en presencia de antioxidantes. Además, en diferentes regiones del embrión en donde ocurre MCP también se observó una mayor cantidad de ERO. En conclusión, proponemos que el estrés oxidativo puede ser un componente común de la activación de la MCP durante el desarrollo y que el AR podría ser un inductor de MCP, quizá induciendo estrés oxidativo. Futuros experimentos analizarán esta hipótesis.

ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) is a physiological process as fundamental as proliferation and differentiation, regulated by both intracellular and extracellular factors; several genes have been identified that regulate positively and negatively cell death. An adequate regulation of PCD is important to ensure a correct morphogenesis pattern during development, as well as for the function of the immune system and homeostasis maintenance in the adult. The present work is an effort to understand the mechanism and regulation of PCD in mouse embryonic stem cells (ES). Two models were established, one to study the death produced by the absence of 2-mercaptoethanol (2ME) in undifferentiated cells, and other to study retinoic acid (RA)-induced death of embryoid bodies. We demonstrated that in both models cells died by apoptosis and the role of oxidative stress was evaluated. Although 2ME is a reducing agent and its absence leads to a rise in the levels of reactive oxygen species (ROS), its protective role may not be related to a general decrease of ROS, since neither it was substituted by other antioxidants, nor a reduction in the atmospheric molecular oxygen modified the cell death kinetic in the absence of 2ME. Our results suggest that 2ME acts by reducing a specific target, perhaps related to iron metabolism, because transferrin was able to promote cell survival in the absence of 2ME. RA-induced apoptosis only in embryoid body cells, but not in undifferentiated cells. RA-induced death was mediated by ROS, since the addition of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase prevented cell death. Even though undifferentiated cells were resistant to RA-induced death, they are responsive to it, since they underwent neuronal differentiation in response to RA in the absence of serum. 2ME also promotes survival of differentiated cells, since its presence allowed neuron positive cells identification. ROS may be a general signal for PCD during development, since in an *in vitro* system culture of murine developing limbs, interdigital cell death diminished in the presence of antioxidants. In addition, several regions where PCD is occurring correlated with high levels of ERO. In conclusion, we propose that oxidative stress might be a common component of PCD during development, and that RA could be a positive regulator of PCD, perhaps transducing its death signal through oxidative stress. Further experiments are required to test this hypothesis.

PUBLICACION 1

CAPITULO MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Autores: Susana Castro Obregón y Luis Covarrubias

en BIOLOGÍA CELULAR (libro de texto)

Compiladores: L.F. Jimenez y H. Merchant

INTRODUCCION

1. Generalidades

1.1 *Las células mueren de manera programada durante el desarrollo: la MCP.*

Durante el desarrollo de los organismos se eliminan ciertas células, ya sea por haberse producido en exceso, o porque forman parte de estructuras transitorias durante el proceso de la formación de la arquitectura del organismo adulto. Dicha eliminación ocurre por un proceso que involucra muerte celular, donde la eliminación de los restos celulares se realiza por fagocitosis. Este tipo de muerte celular participa en diversos procesos, tales como: la eliminación del 50% de las neuronas que se producen durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados; la degeneración de estructuras remanentes de la evolución (e.g. coxa en los amniotes) o que no son necesarias en uno de los sexos (e.g. conducto Mulleriano en machos y de Wolf en hembras); en la formación de estructuras como los dígitos del miembro; durante la metamorfosis de invertebrados, donde todas las células larvares mueren para que los discos imagales proliferen y diferencien organizando al organismo reproductor; etc.

La reproducibilidad en tiempo y en espacio con la que se lleva a cabo el proceso de muerte celular durante el desarrollo, ha dado lugar a la denominación de "Muerte Celular Programada" (MCP). Esta muerte natural de las células está diseñada de tal forma que el contenido intracelular no se vierta al exterior, como ocurre en la muerte accidental de algunas células ante condiciones nocivas extremas (e.g. necrosis), causando daño al tejido adyacente y, en el organismo adulto, inflamación.

La MCP también ocurre en el organismo adulto durante el control de la masa celular de algunos órganos como el hígado, en el recambio continuo de algunos epitelios, y en el funcionamiento del sistema inmune. La reproducibilidad y precisión del proceso de muerte en este caso están exclusivamente determinados por factores ambientales, por lo que una denominación más acorde es la de "Muerte Fisiológica". Sin embargo, la similitud entre el proceso de muerte en el embrión y el que ocurre en el adulto, ha llevado a usar los términos de MCP y muerte fisiológica de manera indistinta.

El control de la muerte celular es fundamental, no sólo por las repercusiones drásticas si no se realiza adecuadamente durante el desarrollo, sino también porque la falta o exceso de muerte celular puede conducir a trastornos en el organismo adulto. Así por ejemplo, alteraciones que induzcan muerte celular fuera de tiempo o de lugar producen enfermedades degenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson, ambas asociadas a muerte neuronal, mientras que una inhibición de la apoptosis puede ser crítica en el surgimiento del cáncer.

1.2 *Factores externos afectan la sobrevivencia.*

Dos mecanismos podrían desencadenar naturalmente el proceso de MCP. En uno de ellos una señal extracelular activaría el proceso de muerte, mientras que en otro, las señales extracelulares (i.e. factores de sobrevivencia) podrían estar impidiendo la muerte de la célula. Aunque como veremos más adelante ambos mecanismos existen en organismos superiores, se ha propuesto que la mayoría de las células están "listas" para morir y que requieren, por tanto, de la presencia continua de factores extracelulares para promover su sobrevivencia.

Esta hipótesis está de acuerdo con la necesidad de factores extracelulares provenientes por ejemplo, del suero fetal bovino, para mantener en cultivo la mayoría de las células animales. Además, si el factor de sobrevivencia resultara limitante, explicaría la muerte neuronal masiva durante el desarrollo del sistema nervioso, durante el cual sobreviven sólo aquellas cuyos axones alcanzaron su célula blanco, proveedora de las señales necesarias para mantener vivas a las neuronas; el factor de crecimiento nervioso (NGF) participa en este proceso. Igualmente, el tamaño de un órgano podría depender de factores de sobrevivencia limitantes, es decir, que sólo un número limitado de células tenga acceso a ellos: si el número de células aumenta este valor, el exceso de células automáticamente muere. De hecho, se ha observado que si se induce artificialmente la proliferación de hepatocitos, el hígado aumenta su tamaño, mientras que basta retirar la droga para que éste regrese a su tamaño original, de acuerdo con la presencia de un factor de sobrevivencia limitante para soportar el tamaño normal del órgano. Puesto que existen factores de sobrevivencia para tipos celulares específicos, la muerte también podría ser un mecanismo para corregir errores durante el desarrollo, al eliminar de esta manera a las células que

migraron hacia una región equivocada, pues no recibirían los factores de sobrevivencia que necesitan.

En consecuencia, se puede considerar que, al menos en organismos superiores, las células necesitan de señales de otras células para sobrevivir, de la misma manera que una célula necesita señales de otras células para proliferar o diferenciarse.

1.3 Diferentes tipos celulares mueren mediante un mismo mecanismo: la apoptosis.

Aunque no están aún totalmente esclarecidos los mecanismos que controlan la MCP, se tienen identificadas características muy particulares del proceso como tal, que permiten identificar cuando una célula está muriendo por MCP. Apoptosis (del griego arcaico apo-TEO-sis, que se refiere a la "caída natural de las hojas en otoño") es un término mecanístico de la MCP, que agrupa características morfológicas y bioquímicas particulares, que permiten distinguirla de la muerte necrótica. Los primeros cambios morfológicos incluyen la pérdida de los contactos celulares y estructuras membranales especializadas (e.g. microvellosidades), así como la formación de protuberancias, tal vez mediada por polimerización de actina. Asociado a estos cambios, se da una disminución de la turgencia, aparentemente debido a la pérdida de fluido intracelular e iones. También hay una translocación de fosfatidil serina de la capa interna de la membrana plasmática hacia la capa externa, como consecuencia de un incremento de la flippasa. Por otro lado, la cromatina se condensa, se fosforila y desensambla la lámina; posteriormente se fragmenta el núcleo, mientras que el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas que se fusionan con la membrana plasmática. Finalmente la célula se rompe en varias vesículas (llamados cuerpos apoptóticos) que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales son fagocitados. A nivel bioquímico ocurre una degradación paulatina del DNA característica, que inicia con fragmentos de más 50 kb y eventualmente genera multímeros de nucleosomas, como consecuencia de la actividad de una endonucleasa que se activa específicamente durante la muerte⁴. Además se detecta actividad de transglutaminasa⁵ y una degradación específica de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), que participa en la reparación del DNA⁶.

Es importante notar, sin embargo, que no todos los tipos celulares presentan todas las características anteriores. Por ejemplo, hay casos en los que no hay degradación internucleosomal del DNA, pero invariablemente los organelos se mantienen intactos dentro de los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas, ya que es condición esencial para que no se cause daño al tejido.

1.4 La MCP es autónoma y las células destinadas a morir son potencialmente funcionales.

A finales de la década de los '80, la MCP se había estudiado fundamentalmente *in vivo* y, puesto que en este contexto es difícil disociar la muerte celular del proceso de fagocitosis, llegó a considerarse que las células fagocíticas eran las desencadenantes de la muerte, es decir, estas células "asesinaban" a sus vecinas. Esta impresión ha resultado equivocada, ya que cuando se evita la fagocitosis, aún ocurre la muerte celular (ver más adelante). Así entonces, la actividad fagocítica resulta ser un evento tardío, encargado solo de eliminar los cuerpos apoptóticos resultantes de la muerte celular. Lo anterior también implica que la célula que va a morir cuenta con todos los elementos para su propia destrucción, razón por la que suele decirse que la MCP ocurre por "suicidio". No obstante, es importante señalar que la MCP siempre es desencadenada por la ausencia o presencia de una señal externa⁷.

¿Es la MCP un mecanismo para eliminar células con carencias funcionales? Esta es una pregunta fundamental de responder, especialmente en la muerte que ocurre durante el desarrollo, pues podría ser que la muerte celular ocurriera como parte de un proceso de "selección natural" dentro del organismo. Los primeros indicios que ayudaron a responder esa pregunta provinieron de estudios en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* en donde, gracias a que se conoce la genealogía de cada célula, fue posible determinar si una célula destinada a morir es capaz de sustituir a su hermana funcional. Por ejemplo, si con un rayo láser se destruye específicamente la neurona encargada del funcionamiento de la faringe en nemátodos jóvenes (M4) en una mutante en la cual la mayoría de las células destinadas a morir sobreviven, ésta se puede sustituir al menos la mitad de la vida del organismo por su célula hermana, originalmente destinada a morir⁸. Por lo tanto, las células que se mueren de manera programada durante el desarrollo son capaces de diferenciarse y, consecuentemente, son potencialmente funcionales.

1.5 Genes específicos codifican para los componentes de la maquinaria de muerte

Ahora es ampliamente aceptado que la MCP es un proceso tan fundamental durante el desarrollo embrionario como la proliferación y la diferenciación celular, y se considera equivalente a un programa genético de diferenciación, formando parte de un repertorio de posibles respuestas celulares a un estímulo externo. En algunos casos es necesaria la síntesis de proteínas para desencadenar el proceso de MCP, como en las neuronas que requieren de NGF para sobrevivir, pues bloqueadores de la transcripción o la traducción tienen un efecto protector cuando son cultivadas en ausencia de NGF¹². La activación génica (más que la inhibición) es necesaria también durante la metamorfosis de *Manolus sexta*, en la que genes específicos se inducen por ecdisona durante la muerte de los músculos intersegmentales¹³. Entonces, en similitud con la activación de varios procesos del desarrollo, se considera que la activación de la muerte celular puede involucrar la transcripción de genes específicos.

C. elegans ha sido un sistema que ha permitido la identificación de algunos de los genes necesarios, ya sea para promover o para impedir la muerte celular. De acuerdo al evento que es bloqueado por mutaciones específicas en este organismo, se han definido cuatro fases dentro del proceso de muerte: la determinación de morir, la ejecución de la muerte, el ser engullidas por las células vecinas, y finalmente la degradación de los cuerpos apoptóticos dentro de las células fagocíticas (Figura 1).

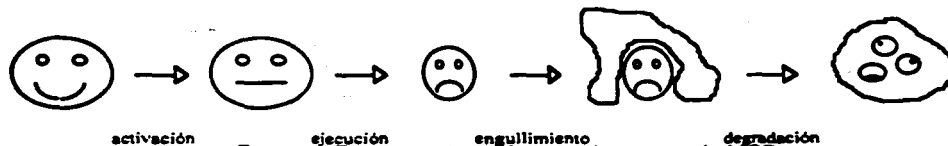


Figura 1. Esquema de las fases del proceso de MCP.

Aunque se han identificado varios genes en *C. elegans* para las fases de ejecución, engullimiento y degradación, la naturaleza de las proteínas codificadas por los involucrados en las últimas dos fases se desconoce. Por otro lado, mientras que los genes encargados de la ejecución, engullimiento y degradación de las células afectan casi todos los tipos celulares, los genes de determinación afectan poblaciones particulares de células¹⁴. Un ejemplo de ello es el gene denominado *Ces-2*, que codifica para un factor de transcripción que participa en la muerte de las neuronas motoras serotoninérgicas (NSM), ya que mutantes que pierden la función de este gene tienen dos NSM extra en la faringe¹⁵.

La ejecución del programa de muerte ha sido la más estudiada y se han identificado tres genes esenciales: *Ced-3* y *Ced-4*, en cuya ausencia la muerte se evita, y *Ced-9* que protege de la muerte provocada por el producto de *Ced-3* y *Ced-4*. *Ced-8*, que fue originalmente propuesto como un gen asociado al proceso de fagocitosis, pudiera ser otro componente de la fase de ejecución, ya que mutantes en este gen tienen el mismo fenotipo que mutantes débiles en *Ced-3* y rescatan el fenotipo de mutantes débiles en *Ced-9*.

2. Las proteasas en la MCP.

2.1 Cistein-proteasas que cortan en aspártico son fundamentales para la ejecución de la muerte: las caspasas.

El producto del gen *Ced-3* (*CED-3*)^{16,17} presenta similitudes funcionales y estructurales con la enzima interconversora de interleucina-1b (*ICE*), una cistein-proteasa de mamífero que corta a su sustrato en residuos de aspártico para generar la forma madura de interleucina-1b (*IL-1b*)¹⁸. De acuerdo al papel previsto de las mutantes en *Ced-3* y la similitud de su producto con *ICE*, tanto la sobreproducción de *CED-3* como la de *ICE* de humano pueden causar apoptosis en fibroblastos de ratón¹⁹. La relevancia en vertebrados de este resultado se resalta por el hecho de que inhibidores específicos de *ICE* son capaces de evitar la muerte de células destinadas a morir o de aquellas que han sido sujetas a condiciones en que su sobrevivencia es limitada; por ejemplo, la muerte de neuronas de pollo desprovistas de NGF puede evitarse cuando el gene *CrmA* (cytokine response modifier A) del virus de la viruela de la vaca, un inhibidor específico de *ICE*, se expresa en ellas²⁰. Es decir, que tanto en organismos invertebrados como en vertebrados, proteasas con similitud a *ICE* son fundamentales para que la MCP ocurra.

La proteína ICE se sintetiza como zimógeno, el cual se procesa por proteólisis para producir un prodominio, una subunidad larga (p20) y otra corta (p10), conformando la proteína activa el heterotetramero (p20:p10)₂ (Fig. 3). El corte proteolítico ocurre adyacente a residuos de aspartato, por lo que se ha sugerido que ICE puede madurar por autocatalisis¹⁰⁰. De manera análoga, CED-3 se autoproteasa para generar una cistein-proteasa activa¹⁰¹.

Si bien la proteína CED-3 en *C. elegans* es necesaria para la mayoría de la muerte que ocurre durante su desarrollo, en mamíferos ICE no es suficiente e inclusive no es la más importante, ya que el ratón mutante con ICE nulo se desarrolla normalmente y las células de estos animales son susceptibles de morir por apoptosis *in vitro*, a excepción de la muerte mediada por Fas (ver más adelante)^{102,103}. Por tanto, otras proteasas relacionadas con ICE debieran estar involucradas en la activación de la muerte. *Nedd2* (cuyo homólogo en humano es conocido como *Ich-1*), por ejemplo, es un homólogo capaz de inducir apoptosis al ser sobre-expresado en fibroblastos de ratón. A diferencia de *Ice*, el patrón de expresión de *Nedd2* durante el desarrollo sí correlaciona con zonas donde ocurre MCP, como en el sistema nervioso central y el riñón¹⁰⁴. Un aspecto interesante de la regulación de *Nedd2/Ich-1* es que, por procesamiento diferencial del RNAm, se generan dos transcritos, uno largo denominado *Ich-1L* que induce apoptosis, y uno corto llamado *Ich-1S*, diferente en tamaño y secuencia en la región carboxilo adyacente a la secuencia catalítica QACRG, que protege de muerte inducida por ausencia de suero¹⁰⁵. Se han planteado dos posibles mecanismos para explicar el papel de ICH-1S: por un lado, pudiera competir por los mismos blancos que ICH-1L u otros homólogos, pero siendo incapaz de contarlos y, por otro lado, pudiera inactivar directamente a las proteasas tipo ICE uniéndose a ellas¹⁰⁶. Parece más probable el segundo mecanismo propuesto, ya que se ha observado que uno de los transcritos del gene *Ice* (se han descrito al menos cinco diferentes) codifica para una isoforma denominada ICEe, capaz de ensamblarse con la subunidad p20 de ICEa, y generar un producto catalíticamente inactivo¹⁰⁷.

En la actualidad se han descrito varios genes homólogos a *Ice*, los cuales conservan una región pentamérica catalítica y son capaces de inducir apoptosis cuando se sobre-expresan en células en cultivo; colectivamente han sido denominadas "caspasas". De estos, el gen denominado *Cpp32*¹⁰⁸, o *Yama*¹⁰⁹, pudiera ser uno de los más frecuentemente implicados en la ejecución de la muerte. En la tabla 1 se enlistan otros de los genes descritos. Haciendo un análisis filogenético de esta familia de cistein-proteasas se han subdividido en tres grupos: la subfamilia CED-3, la subfamilia ICE y la subfamilia NEDD-2 (figura 2). Todos los miembros de las subfamilias caracterizadas hasta ahora se expresan en un amplio rango de tejidos y en diferentes etapas de desarrollo¹¹⁰. Entre las evidencias que indican que estas proteasas tienen un papel en la MCP durante el desarrollo embrionario están: diversos inhibidores de caspasas evitan la apoptosis de neuronas motoras cuando se añaden a un cultivo primario desprovisto de factores tróficos, y que al administrar estos inhibidores in ovo a embriones de pollo, también se inhibe la muerte natural de tales neuronas motoras, así como la MCP que ocurre en las regiones interdigitales durante la formación de los miembros¹¹¹.

Cistein-proteasas implicadas en apoptosis.		
Proteasa	Sitio Activo	Sustrato
ICE	QACRG	Pro-IL-1 β , pro-ICE, pro-YAMA
CED 3	QACRG	PARP (ref Xue, Horvitz)
ICH-1/NEDD-2	QACRG	no determinado
CPP32/YAMA/APOFAINA	QACRG	PARP
IX/ICH-2 ¹¹²	QACRG	Pro-ICE, pro-IX
MCH-2 ¹¹³	QACRG	PARP
ICE α ¹¹⁴	QACRG	no determinado
ICE-LAP3 ¹¹⁵	QACRG	PARP
MACH/FLICE ¹¹⁶	QACRG	PARP
DCP-1 ¹¹⁷	QACCG	PARP

Tabla 1. Proteasas involucradas en MCP que contienen un sitio catalítico común.

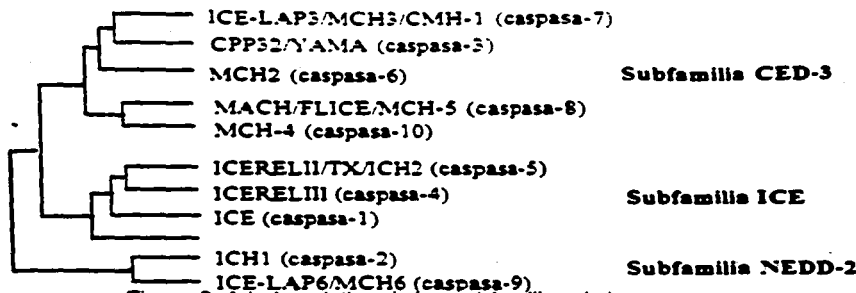


Figura 2. Arbol evolutivo de las subfamilias de las caspasas.

2.2 Las caspasas pueden formar cascadas proteolíticas de regulación.

Si en realidad las caspasas están involucradas en la ejecución de la muerte celular, es de esperarse que éstas se activen en respuesta a un estímulo apoptótico. YAMA, ICE-LAP3 y MCH2, se activan por diversos estímulos apoptóticos tales como la activación de Fas, el tratamiento con staurosporina (un inhibidor de proteínas cinasas de amplio espectro), o en respuesta al factor de necrosis tumoral (TNF- α)²¹.

Es posible imaginarse que la ejecución de la muerte se lleva a cabo a través de una cascada de proteólisis, ya que las caspasas son también activadas por digestión proteolítica en un sitio adyacente a un aspártico. De hecho, CPP32/YAMA es procesada y activada directamente por ICE²¹, y puesto que CPP32/YAMA no es capaz de procesar a ICE, existe una cascada jerárquica en la cual ICE activa a CPP32/YAMA (Figura 3). Tal cascada se observa durante la muerte inducida por Fas, donde la actividad de proteasas de la subfamilia ICE es transitoria, mientras que la actividad de proteasas de la subfamilia CPP32/YAMA se acumula gradualmente en el citosol. De acuerdo con lo anterior, inhibidores específicos para ICE bloquean la muerte inducida tanto por ICE como por CPP32, pero inhibidores específicos de CPP32 sólo bloquean la muerte provocada por CPP32, más no la inducida por ICE²².

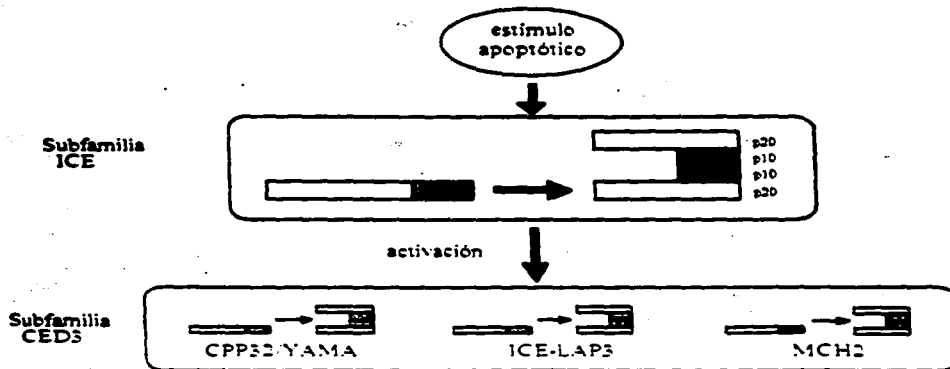


Figura 3. Cascada de activación de las proteasas: ICE activa a CPP32.

Otro caso que sustenta la acción de una cascada de proteólisis durante la MCP, es la apoptosis inducida en las células blanco por las células T citotóxicas, mediante la exposición a perforina y Granzima B. CPP32/YAMA se procesa y activa por Granzima B, por lo que es un fuerte candidato para ser uno de sus sustratos fisiológicos¹⁰⁰.

2.3 Varios sustratos de las caspasas cooperan durante el apoptótico.

Aún se sabe muy poco respecto a los sustratos de las caspasas. Sin embargo, se hipotetiza que los cortes proteolíticos de sustratos específicos contribuyen al proceso de apoptosis de diferentes maneras, tal vez produciendo cambios en proteínas estructurales, la activación de otras moléculas efectoras como nucleasas, o la eliminación de algún inhibidor de la maquinaria de muerte. Suponiendo que el sustrato relevante se exprese de manera tejido-específica, es de esperarse que algunos de los efectos sean específicos para ciertos tipos celulares, sin embargo, puesto que la muerte tiende a ser similar morfológica y bioquímicamente entre los diferentes tipos celulares, podría predecirse que la mayoría de los sustratos son ubicuos y conservados durante la evolución¹⁰⁰.

PARP es una proteína cuya única actividad identificada es la de participar en la reparación del DNA. Se ha determinado que en las fase tempranas de la apoptosis, PARP se corta en los fragmentos de 85 Kd y 25 Kd. Aunque aún no está muy claro cuales son las consecuencias de la digestión de PARP, podría ser que la pérdida de su capacidad reparadora del DNA contribuyera a la apoptosis. De hecho, células HeLa en las cuales experimentalmente se impide el funcionamiento de PARP por medio de la expresión de una variante dominante negativa (i.e. una forma mutante que interactúa con la proteína silvestre y la inactiva), se vuelven más sensibles a agentes inductores de muerte, y algunas líneas incluso sufren apoptosis espontáneamente¹⁰⁰. No obstante, el ratón mutante nulo en *Parp*, aún cuando se vuelve más sensible al estrés ambiental, se desarrolla normalmente¹⁰⁰, indicando que PARP no es desencadenante en la ejecución de la MCP durante el desarrollo.

Sin considerar cuál pudiera ser la función de PARP, es interesante que CPP32/YAMA es capaz de cortar a esta proteína en los fragmentos característicos de 85 Kd y 25 Kd, a favor de que esta proteasa actúa en la fase final de la cascada de proteólisis durante la ejecución de la muerte¹⁰⁰. Puesto que CED3, ICE-LAP3, y MCH2 son también capaces de cortar a PARP, los miembros de la subfamilia CED3 pudieran ser elementos redundantes en esta fase de control.

La proteólisis podría explicar algunas de las alteraciones en el núcleo típicas de la apoptosis. Por ejemplo, la degradación de las láminas podría producir los cambios observados en la cromatina, debido a la pérdida de puntos de contacto con la matriz nuclear. En efecto, la lámina B1 se degrada durante la apoptosis¹⁰⁰ y, como es de esperarse, inhibidores de la familia ICE evitan tal degradación, aunque la proteasa implicada no es capaz de procesar a PARP. Resulta interesante que cuando se inhibe a la proteasa que degrada la lámina, también se detienen la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo que, como se mencionó anteriormente, son características típicas de la apoptosis¹⁰⁰. Por otro lado, se encontró que una proteasa de 24 kDa induce la degradación internucleosomal del DNA cuando se añade a núcleos, y por tanto debe activar a una endonucleasa¹⁰⁰.

Por su parte, la degradación proteolítica por parte de ICE de actina y proteínas asociadas a ella como la fodrina^{100,101}, podría explicar algunos de los cambios en la membrana plasmática característicos de la apoptosis, como la formación de protuberancias y la fragmentación de las células, eventos que dependen de la polimerización de actina. Los sustratos identificados se esquematizan en la figura 4.

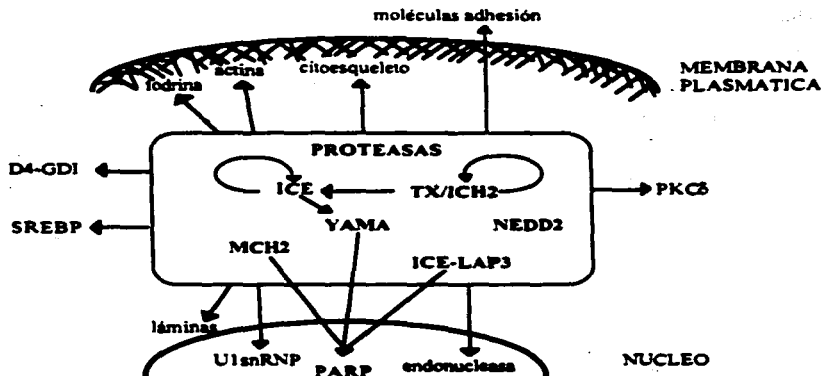


Figura 4. Esquema integrador de los sustratos descritos para las caspasas. Las flechas conectan a la caspasa con su sustrato. ICE y TX/ICH2 son sustratos para ellas mismas. Las flechas que tienen su origen en la caja de caspasas indican que se desconoce la identidad específica de la caspasa involucrada. D4-GDI (inhibidor de la disociación de guanina)²²; SREBP (proteína que se une al elemento regulador de esteroides)²³; U1snRNP (ribonucleoproteína U1 de 70kDa)²⁴; más detalles en el texto.

2.4 El proteosoma participa en la MCP.

Existen dos mecanismos generales para la degradación de proteínas dentro de la célula eucariote. El primero es el sistema lisosomal, que principalmente degrada las proteínas ingeridas por endocitosis mediada por receptor y por pinocitosis, por lo cual difícilmente participaría en procesos regulatorios ya sea citoplásmicos o nucleares. El segundo mecanismo es la proteólisis por un complejo multicatalítico denominado proteosoma 26S que requiere la ubiquitinación, proceso dependiente de ATP, de las proteínas intracelulares que digiere. La ubiquitinación consiste en la unión de la ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, a una lisina preferencialmente dentro de la secuencia PEST. Esta reacción es mediada por tres enzimas: E1, que cataliza la activación de la ubiquitina produciendo un intermediario de alta energía; E2, que transfiere la ubiquitina activada de E1 a la ubiquitina-proteína-ligasa E3; y la ligasa E3, que cataliza la formación de un enlace isopeptídico (enlace covalente entre el carboxilo terminal de la glicina de la ubiquitina con el amino terminal de la lisina) entre la ubiquitina y la proteína blanco. La lisina de la ubiquitina es a su vez ubiquitinada, generando un complejo de ubiquitinas asociadas a la proteína. A pesar de que desde hace mucho tiempo se conoce que el proteosoma degrada las proteínas mal estructuradas o mutantes, también puede degradar proteínas en buen estado y participar en procesos regulatorios, como la presentación de antígenos, la progresión del ciclo celular, la regulación transcripcional y la tumorigénesis²⁵. Recientemente se desarrollaron inhibidores específicos para el proteosoma que han permitido discernir el papel de este complejo en distintas funciones celulares, sin la interferencia de otras proteasas como la calpaína. Relevante al estudio de la MCP, es el descubrimiento de que la actividad del proteosoma es necesaria para la progresión de la apoptosis tanto en neuronas privadas de NGF²⁶, como en timocitos inducidos a muerte por diversos estímulos, como la radiación y la presencia de glucocorticoides o ésteres de forbol. En ambos sistemas se observa que la presencia de inhibidores específicos del proteosoma, como la lactacistina, inhibe tanto la digestión de PARP como la activación de caspasas. Estos resultados permiten especular que el proteosoma podría participar en la regulación de la muerte, tal vez degradando a un inhibidor de la apoptosis como

BCL-2, o bien activando a caspasas mediante la degradación de un inhibidor, de manera análoga a la regulación descrita para NFkB⁶.

3. La familia de CED-9/BCL-2

3.1 Bcl-2 regula negativamente la ejecución de la muerte en sistemas diversos.

Como se mencionó anteriormente en *C. elegans*, *Ced-9* antagoniza la función de *Ced-3* y *Ced-4*, bloqueando la muerte celular. El rápido avance en el entendimiento de algunos de los posibles mecanismos de acción de *Ced-9* se ha debido a la similitud en su secuencia con un proto-oncogen denominado *Bcl-2*, el cual, a diferencia de los oncogenes previamente descritos, tiene la particularidad de promover la sobrevivencia de las células (i.e. las hace independientes de factores de sobrevivencia), manteniéndolas quiescentes en lugar de estimular la proliferación. *Bcl-2* es probablemente un gen humano homólogo a *Ced-9*, ya que la expresión de *Bcl-2* humano en *C. elegans* disminuye la MCP⁶, y viceversa, la sobre-expresión de *Ced-9* actúa negativamente sobre la muerte de células de mamífero. Estos datos además sugieren que las moléculas con las cuales interactúan para impedir la muerte están conservadas evolutivamente.

En los últimos años ha habido gran cantidad de reportes demostrando la capacidad de BCL-2 de inhibir la muerte en diversos tipos celulares y en respuesta a una variedad de estímulos, con pequeñas excepciones (Tabla 2)⁶. La capacidad que tiene BCL-2 para interrumpir la muerte inducida por agentes tan diversos y las características morfológicas de la apoptosis, están de acuerdo con la existencia de un mecanismo similar de MCP. BCL-2 parece bloquear la muerte en un punto temprano del proceso, ya que en todos los casos examinados ninguna de las características morfológicas de apoptosis se han observado (sin embargo, es importante señalar que el efecto de BCL-2 no es 100% eficiente).

Causas de Muerte Prevenibles por BCL-2	
Drogas quimioterapéuticas	Glutamato
Radación gama y UV	Calcio
Estrés calórico	Deprivación de glucosa
Sindbis y Baculovirus	Deprivación de factores de crecimiento
Especies reactivas de oxígeno	Deprivación de factores neurotróficos
p53	Factor de crecimiento transformante b
c-Myc	Algunas células T citotóxicas
Factor de Necrosis Tumoral	Azida
Mutantes en <i>ced-9</i> de <i>C. elegans</i>	
Causas de Muerte No Prevenibles por BCL-2	
Algunas células T citotóxicas	Proteína b amiloide
Selección negativa de timocitos	Algunas neuronas dependientes de CNTF
Lisis mediada por complemento	

Tabla 2. Causas de muerte prevenibles y no prevenibles por BCL-2.

3.2 Bcl-2 se encuentra preponderantemente en la mitocondria.

BCL-2 se encuentra principalmente como proteína integral en la membrana externa de la mitocondria, aunque también se ha observado en la membrana nuclear y el retículo endoplásmico. Por microscopía electrónica se ha determinado que BCL-2 está localizada en parches, tanto en la membrana nuclear como en el retículo endoplásmico, semejando la imagen proyectada por los poros nucleares^{7,8}. BCL-2 tiene un dominio hidrofóbico de 19 aminoácidos en su extremo COOH-terminal, que sirve como anclaje a la membrana. La relevancia de la localización mitocondrial de BCL-2 en su actividad anti-apoptótica se pone de manifiesto cuando se deleta la región transmembranal (TM) de BCL-2, lo que provoca que la proteína mutante se localice en el citoplasma y disminuya su eficiencia para prevenir la apoptosis. Además, si se sustituye la región TM de BCL-2 por la región de localización específica para retículo endoplásmico del citocromo b5, pierde la capacidad de evitar la muerte provocada por la ausencia de suero en células de riñón de perro, pero acorde a lo esperado, si se substituye por la región TM de la proteína mitocondrial ActA, BCL-2 recupera su actividad. Sin embargo, en algunos tipos de inducción de muerte es suficiente la localización de BCL-2 en el retículo endoplásmico, como en la muerte inducida por la sobre-expresión de *Myc* en ausencia de suero de células RAT-1⁹. Estos resultados confirman que la región TM es necesaria sólo para la localización de BCL-2, y no para

su función anti-apoptótica. Además sugiere que las moléculas con las cuales BCL-2 interactúa para mediar su función tienen que estar a su vez compartimentalizadas⁵⁴. Durante el inicio de la apoptosis hay una liberación del citocromo c (que normalmente se encuentra en la mitocondria) al citoplasma, asociada a la activación de las caspasas. La presencia de BCL-2 evita dicho movimiento, pero si experimentalmente se añade citocromo c al citosol, BCL-2 ya no puede evitar la muerte. Por lo tanto, se postula que el mecanismo de acción de BCL-2 involucra la regulación del movimiento de citocromo c, tal vez bloqueando los poros a través de los cuales este se transporta⁵⁵. Acorde a la estructura tridimensional determinada para la proteína homóloga BCL-X_L (ver más adelante), miembros de la familia de Bcl-2 tienen la capacidad de formar canales en las membranas similares a los que forma la toxina de difteria, los cuales pueden permitir el paso de iones o servir como transportadores de proteínas como pudiera ser el citocromo c⁵⁶.

El patrón de expresión de *Bcl-2* durante el desarrollo del ratón, específicamente en el sistema nervioso⁵⁷ y en las extremidades, está de acuerdo con la noción de que BCL-2 tiene un papel importante en la regulación de la MCP. Por otro lado, en el adulto se restringe su expresión a tejidos que requieren tiempos largos de sobrevivencia, como las células troncales del sistema hematopoyético, las neuronas posmitóticas y las de zonas proliferativas⁵⁸. Por tanto, una ganancia o pérdida en la función de BCL-2 debiera manifestar alteraciones importantes en ratones transgénicos. Efectivamente, la sobre-expresión de *Bcl-2* en el sistema linfóide extiende la sobrevivencia normal de células B^m y produce linfomas⁵⁹, mientras que la expresión dirigida a precursores neuronales aumenta en un 30% el número de neuronas generado en el ratón adulto, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico⁶⁰. Sin embargo, contrario a lo esperado, el ratón transgénico homocigoto en un *Bcl-2* no funcional completa el desarrollo embrionario, presentando apoptosis masiva sólo en el timo y el bazo, a pesar de que el inicio de la hematopoyesis es normal⁶¹.

3.3. Miembros de la familia de *Bcl-2* actúan tanto negativamente como positivamente.

Una explicación a esta aparente irrelevancia de *Bcl-2* durante el desarrollo embrionario es que en esta etapa se expresen genes homólogos que estén sustituyendo su función, o bien, puesto que *Bcl-2* se aisló originalmente de células del sistema inmune, que existan variantes para diferentes tipos celulares. De hecho, existen varios genes con similitud estructural que han permitido establecer una familia de proteínas relacionadas. Uno de ellos es *Bcl-x*, que se identificó en pollo mientras se buscaba el homólogo al *Bcl-2* de mamífero. *Bcl-x* presenta 74% de identidad con *Bcl-2* y mediante el procesamiento diferencial de su RNAm produce dos transcritos, uno llamado *Bcl-x_L*, que también protege de apoptosis en ausencia de factores de crecimiento, y otro denominado *Bcl-x_S*, que promueve la apoptosis y contrarresta los efectos inhibitorios mediados por *Bcl-2* y *Bcl-x_L*⁶².

A diferencia de *Bcl-2*, *Bcl-x_L* se expresa de manera abundante en el sistema nervioso central del adulto. El RNAm de *Bcl-2* se induce de 6 a 12 horas después de un estímulo mitogénico en linfocitos, mientras que el RNAm de *Bcl-x_L* se activa más temprano, durante las primeras 6 horas de la inducción⁶³. La disrupción génica de *Bcl-x_L* en ratones transgénicos confirmó que *Bcl-x_L* y *Bcl-2* tienen papeles cualitativamente diferentes en el desarrollo, ya que en ausencia de BCL-X_L el desarrollo se detiene en el estadio E13 con abundante muerte celular en los sistemas nervioso y hematopoyético⁶⁴.

MCL-1 y A1 son proteínas con similitud estructural a BCL-2, cuya expresión aumenta cuando se induce la diferenciación de células mieloides. La proteína MCL-1 es considerablemente más grande que BCL-2, pero en el extremo carboxilo tiene un trazo de 139 aminoácidos con un 35% de identidad (59% de similitud) con BCL-2, mientras que en el extremo amino-terminal contiene secuencias PEST, sugiriendo que puede ser blanco de degradación, provocando que su vida media sea muy corta. Parece también que MCL-1 se localiza en las membranas intracelulares de manera similar a BCL-2, y es capaz de retrasar la muerte inducida por activación de *Myc* (ver más adelante). Por su parte, A1 codifica para una proteína que tiene una identidad con BCL-2 del 40% en una región de 80 aminoácidos hacia el extremo carboxilo, pero que difícilmente se anclaría a la membrana, pues tiene un residuo cargado en la región que correspondería a la porción hidrofóbica de anclaje⁶⁵.

En la búsqueda de proteínas que interactúan con BCL-2 se han aislado otros miembros de la familia. La proteína BAX coprecipita con anticuerpos contra BCL-2 y al igual que BCL-X_S,

promueve muerte celular interfiriendo con la actividad de BCL-2. BAX tiene 21% de identidad (43% de similitud) con BCL-2 y, aunque también se producen varios transcritos, estos parecen generar productos que comparten la habilidad de impedir el efecto de BCL-2^{mut}. Ratones con mutantes nulas en *Bax* presentan displasia de timocitos y células B, así como un exceso de células de la granulosa en los folículos de los ovarios, lo cual demuestra que es necesaria su presencia para la MCP de esas células. Sin embargo, los machos son estériles debido a que la espermatogénesis se detiene, acumulándose células germinales premeióticas, las cuales mueren en el adulto. En comparación a la MCP que ocurre durante la espermatogénesis en el ratón silvestre, en el ratón mutante se presenta mayor MCP, lo que sugiere que BAX podría tener un efecto anti-apoptótico en cierto contexto celular¹⁰.

De manera similar a BAX, BAD tiene la capacidad de unirse a BCL-2, aunque su afinidad por BCL-X_L es mayor. La actividad de BCL-X_S, BAX y BAD establece que no todos los miembros de la familia actúan evitando la muerte, sino que algunos pueden regular la apoptosis por un antagonismo funcional, como se describirá más adelante. Por medio de alineamientos múltiples de los miembros de la familia de BCL-2 se han identificado cuatro regiones conservadas, denominadas regiones de homología a BCL-2 1, 2, 3 y 4 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Esto ha permitido la utilización de oligonucleótidos degenerados complementarios a las regiones conservadas para amplificar secuencias relacionadas por medio de la reacción de polimerasa en cadena (PCR). De esta manera se aislaron *Bcl-w* y *Bak* (Bcl-2 antagonist/killer); el primero muestra un alto grado de similitud a *Bcl-2* y también promueve la sobrevivencia¹¹, mientras que el segundo funciona como un inductor de la muerte^{12,13}. Todos los miembros anti-apoptóticos de la familia contienen el dominio BH4, que se encuentra típicamente en el extremo amino terminal; en cambio, los miembros de la familia pro-apoptóticos, a excepción de Bcl-x_s, carecen de este dominio.

3.4 Los miembros de la familia de Bcl-2 interactúan entre sí.

Los experimentos de mutagénesis en los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 indican que estos se requieren para la interacción entre distintos miembros de la familia de BCL-2 u otras proteínas, y tiene efectos funcionales importantes. Por ejemplo, BH1 y BH2 son fundamentales para la mayoría de las interacciones entre los miembros de esta familia; la región BH3 de BAX, por otro lado, es suficiente para inducir la muerte, mientras que la región BH4 de BCL-2 es indispensable para proteger, aun cuando no se requiere para dimerizar con BAX o BCL-2^{mut}. A pesar de la homología en la secuencia de los dominios BH1 y BH2, éstos confieren una especificidad de interacción, ya que no todas las combinaciones de heterodímeros entre las moléculas identificadas es posible. Por medio de diferentes estrategias experimentales se ha estudiado la interacción de los diferentes miembros de la familia BCL-2, que se resumen en la Tabla 3.

BAD es el único miembro de la familia que no homodimeriza, lo que sugiere que su función es competir por los protectores de muerte BCL-2 y BCL-X_L, quizá aumentando las concentraciones de BAX y BAK. De hecho, experimentos *in vitro* han demostrado que BAD interactúa con el heterodímero BCL-X_L/BAX, desplazando a BAX y permaneciendo asociada a BCL-X_L¹⁴. En este contexto, BAD funcionaría como un inductor de muerte al liberar a las proteínas BAX y BAK, que homodimerizan y matan. Aunque aún no se sabe si los protectores BCL-2 y BCL-X_L actúan mediante la interacción con blancos bioquímicos particulares o por bloquear la acción de BAX y BAK, la cinética de dimerización de BAD sugiere que BAX y BAK son las proteínas efectoras y que BCL-2 y BCL-X_L protegen al impedir su acción. Experimentos de mutagénesis apoyan también esta noción, ya que mutantes de BCL-2 que pierden la capacidad de interactuar con BAX, pero que siguen teniendo la capacidad de homodimerizar, también pierden la habilidad de bloquear la muerte¹⁵. En el futuro será fundamental entender cual, si BCL-2 o BAX, es la proteína efectora de tal forma que el heterodímero secuestre a la responsable de interactuar con la maquinaria de muerte. Sin embargo, también es posible que el heterodímero sea el complejo efector.

Interacciones Entre Miembros de la Familia BCL-2										
	BCI	BA	BA	BCL	BCU	AI	MC	BA	NE	19K5

BCL-2	fuerte									
BAX	fuerte	fuerte								
BAK	mediana	ninguna	fuerte							
BCL-X _L	mediana	fuerte	mediana							
BCL-X _S	mediana	ninguna	NO	mediana	mediana					
A1	débil	fuerte	mediana	NO	NO	NO				
MCL-1	NO	mediana	fuerte	NO	NO	NO	NO			
BAD	débil	NO	NO	mediana	NO	NO	NO	ninguna		
NBk	mediana	NO	NO	mediana	NO	NO	NO	NO	ninguna	
19K1B	NO	mediana	mediana	NO	NO	NO	NO	mediana	mediana	NO

Tabla 3. Resumen de las interacciones descritas por diferentes métodos experimentales entre los miembros de la familia BCL-2

En resumen, se puede decir que el destino de cada célula dependerá de la proporción que tenga de las diferentes proteínas mencionadas, de manera que una célula morirá cuando la cantidad de proteínas que matan exceda la cantidad de proteínas protectoras. Esta proporción podría modificarse por señales externas como factores de crecimiento o de supervivencia, daño al DNA, etc. En la figura 5 se esquematiza un ejemplo de la dinámica de interacciones entre los miembros de la familia BCL-2.

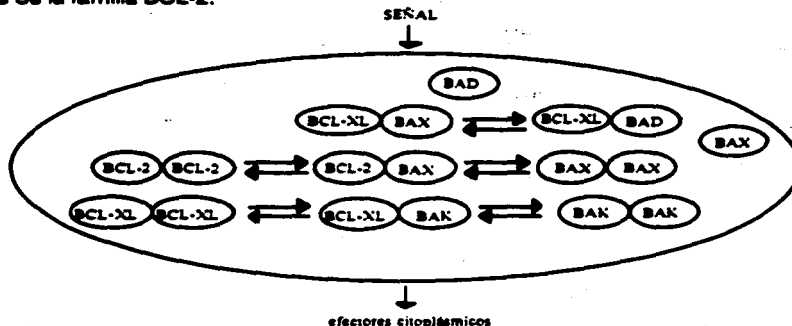


Figura 5. Esquema de las interacciones dinámicas entre los miembros de la familia de BCL-2.

3.5 Proteínas diversas interactúan con la familia de Bcl-2.

Considerando la importancia de la región BH3 de BAX para inducir apoptosis, otras proteínas con este dominio podrían tener la misma actividad. NBk se asocia a varias proteínas de muerte, como 19kDa E1B, BCL-2 y BCL-X_L, aún cuando no tiene las regiones BH1 y BH2. Puesto que NBk sólo comparte homología con el dominio BH3 y tiene la habilidad de inducir muerte celular, es posible que en esa región resida la actividad que provoca la muerte.

Hay otras proteínas que también interactúan con BCL-2, que no tienen secuencias relacionadas a ella. Tales es el caso de BAG, una proteína que cuando se sobre-expresa protege de muerte y se une a BCL-2. Dentro de su estructura, resulta interesante una región que presenta 66% de identidad con proteínas tipo ubiquitina, incluyendo la lisina a la cual se une covalentemente otra ubiquitina, lo que sugiere que podría ser degradada por el proteosoma (descrito anteriormente)²⁰. Es posible imaginarse que la interacción con BCL-2 la establezca, lo cual a su vez permite especular que BCL-2 podría funcionar estabilizando proteínas cuya función sea evitar la muerte. Una hipótesis más especulativa aún podría ser que la región homóloga a ubiquitina sirva para acercarse al heterodímero BAG/BCL-2 a un complejo de proteasas involucrado con la regulación de la muerte, del tipo discutido en la sección del proteosoma.

De las proteínas descritas que se asocian a BCL-2, las más interesantes son R-RAS y RAF-1, ya que permiten establecer una conexión entre las señales extracelulares mediadas por factores de crecimiento o citocinas y la maquinaria de muerte. La interacción de R-RAS con BCL-2 ocurre tanto *in vitro* como *in vivo*^{xxx}, y se ha observado que la expresión de R-RAS antagoniza la habilidad de BCL-2 de bloquear la apoptosis^{xxx}. Sin embargo, la versión oncogénica H-RAS protege de muerte, lo cual también resulta interesante por la capacidad de H-RAS de regular varias vías de transducción de señales.

Aunque aún no está claro el mecanismo de acción de BCL-2, parece fundamental su interacción con RAF-1. Esta interacción es relevante para translocar a RAF-1 a la mitocondria, ya que si a RAF-1 se le añade una secuencia de señal de anclaje a la mitocondria adquiere la habilidad de evitar la muerte en ausencia de BCL-2, lo que no sucede si se le pone una señal de localización a la membrana plasmática o si se mantiene en el citoplasma. Por lo tanto RAF-1 podría tener sustratos fosforilables localizados en la mitocondria, involucrados en el control de la MCP^{xxx}.

3.6 Miembros de la familia BCL-2 se modifican postraduccionalmente.

La fosforilación es una de las principales modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de las proteínas. En el caso particular de BCL-2, aún es un poco controversial el efecto que tiene la fosforilación, pues tiene un efecto tanto en su activación^{xxx} como en su inactivación^{xxx}. Sin embargo, estudios de mutagénesis donde se elimina la región fosforilable de BCL-2, muestran que la fosforilación tiene un efecto inhibitorio, ya que su transfección en timocitos estimula la sobrevivencia celular, mientras que la proteína BCL-2 silvestre no es capaz de hacerlo, pues se fosforila en el interior de la célula. Se desconocen aún las cinasas y fosfatasa implicadas en esta regulación^{xxx}.

BAD es otra proteína cuya actividad se regula por fosforilación. En ausencia del factor de sobrevivencia IL-3 BAD se desfosforila, lo que le permite asociarse a BCL-X_L en la mitocondria y promover la muerte. Cuando BAD está fosforilada se encuentra en el citoplasma asociada a la proteína 14-3-3, que se une a proteínas fosforiladas en serinas, y pierde la capacidad de interactuar con BCL-X_L. RAF-1 no es la enzima responsable de inactivar a BAD, ya que la fosforila en sitios diferentes a los observados *in vivo*; sin embargo, RAF-1 pudiera fosforilar y activar en la mitocondria a la cinasa responsable.

La proteólisis podría ser otro mecanismo postraduccional para regular la actividad de los miembros de la familia de BCL-2. Durante la progresión del SIDA, los timocitos CD4 mueren por apoptosis como consecuencia de la actividad de la proteasa de HIV, pues degrada a BCL-2 generando dos fragmentos inactivos. Resulta interesante que el sitio de corte se realiza adyacente a la fenilalanina 112, pues este residuo está conservado a lo largo de la evolución en todos los homólogos de BCL-2, incluyendo CED-9. Esto sugiere que la proteólisis podría ser un mecanismo de activación de la apoptosis considerando, además, que BAX no tiene conservado ese residuo ni es cortada por la proteasa de HIV^{xxx}.

3.7 La familia de BCL-2 parece actuar arriba de las caspasas en la cascada de muerte.

Ya que en *C. elegans* basta la presencia de CED-9 para que las proteínas CED-3 y CED-4 no provoquen la muerte, es posible que *Ced-9* se encuentre arriba que los genes *Ced-3* y *Ced-4* en la cascada genética. Por otro lado, la sobre-expresión de *Ced-3* provoca la MCP sin necesidad de que *Ced-4* esté presente, mientras que la MCP inducida por la sobre-expresión de *Ced-4* depende de la función de *Ced-3*; estos resultados sugieren que *Ced-4* actúa arriba de *Ced-3* en la cascada, o bien que actúan en paralelo, pero que CED-3 posee mayor habilidad para matar. Puesto que CED-4 parece facilitar la inhibición de CED-3 por CED-9, es posible que CED-9 actúe negativamente sobre CED-4^{xxx}. Dadas las analogías entre los genes de *C. elegans* y los genes de mamífero, se esperaría que BCL-2 actuara sobre la regulación de la familia ICE; esta idea estaría de acuerdo con el hecho de que las proteínas de la familia BCL-2 no tienen una actividad enzimática asociada. Una evidencia a favor de esta hipótesis es que la sobre-expresión tanto de *Bcl-2* como de *Bcl-x_L* en células tratadas con staurosporina (inhibidor de protein-cinasas que activan la MCP) evita la activación de CPP32/YAMA y ICE^{xxx}. Otra evidencia más contundente que la anterior es que, en un sistema *in vitro* consistente de núcleos de células HeLa y extractos de *Xenopus laevis* que tienen una actividad tipo ICE, BCL-2 es capaz de detener el proceso apoptótico siempre y cuando se añada antes de la activación de la caspasa. Después de este punto, sólo los inhibidores de ICE pueden bloquear el proceso

apoptótico. La diferencia en la cinética de inhibición de ICE por BCL-2 o sus inhibidores en estos experimentos indican que BCL-2 no actúa directamente sobre ICE^{MDM}. En la figura 9 se esquematiza la cascada de muerte que se propone en la actualidad.

4. Otros reguladores positivos y negativos de la MCP

4.1 *Ced-4 interactúa con miembros de las familia Bcl-2 y la familia de las caspasas.*

El gene *Ced-4* de *C. elegans*, que como *Ced-3* actúa positivamente sobre la MCP, codifica para una proteína cuya función se desconoce, aunque dos regiones de la proteína presentan cierta similitud con dominios de unión a calcio^{MDM}; además, en similitud con la función dual de otras proteínas de la maquinaria de muerte, también existe un producto más largo al descrito originalmente (CED4L), generado por procesamiento diferencial del RNAm, que inhibe la muerte celular^{MDM}. Aún no se han encontrado genes homólogos en otras especies pero estos deben existir, ya que la sobre-expresión de *Ced-4* en células de mamífero causa apoptosis inhibible por la proteína BCL-X_i y por inhibidores de caspasas. La proteína CED-4 interactúa con las proteínas CED-9 o BCL-X_i por medio de los mismos dominios que les permiten interactuar con BAX u otros miembros de la familia, así como con las proteínas CED-3, ICE o FLICE. La interacción de CED-4 con miembros de la familia de las caspasas y con miembros de la familia de BCL-2 ocurre de manera independiente y simultánea, de tal forma que actúa como un eslabón que físicamente une a las dos grandes familias de proteínas. Dentro de células de mamífero también se ha encontrado una asociación entre las proteínas BCL-X_i y ICE, indicando que debe haber una proteína conectora equivalente a CED-4^{MDM}.

Las interacciones moleculares descritas anteriormente ocurren en la mitocondria, pues la proteína CED-4 se observa difusa en el citoplasma si no hay CED-9, mientras que en su presencia se localiza en parches en la membrana mitocondrial^{MDM}. Considerando estos datos se establece el siguiente paradigma: por un lado CED-9/BCL-2 se encuentra en la mitocondria y se unen a CED-4 y, puesto que la unión de CED-9 a CED-4 no impide la interacción con CED-3, CED-4 podría arrastrar a CED-3 a la mitocondria. Es posible también que la unión de CED-4 a las caspasas induzca su activación, a menos de que CED-9 esté simultáneamente unida al complejo^{MDM}.

4.2 El "dominio de muerte" (DM) es característico de algunas proteínas activadoras de la MCP.

Reaper (Rpr), *head involution defective (Hid)* y *Grim* son genes que, mediante análisis genético, han mostrado ser necesarios y suficientes para inducir la MCP durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Los genes *Hid* y *Grim* codifican para proteínas cuya secuencia no tiene similitud con las reportadas a la fecha y se desconoce su mecanismo de acción. RPR, por otro lado, no forma parte de la maquinaria de muerte, ya que células carentes de *Rpr* aún son capaces de morir por apoptosis en respuesta a dosis altas de rayos X. Durante la embriogénesis, el patrón de expresión de los tres genes coincide con zonas de muerte celular; en particular, *Rpr* y *Grim* se expresan en las células destinadas a morir horas antes de que se observe algún rasgo de apoptosis, y basta su presencia en embriones transgénicos para inducir muerte extensivamente, siendo GRIM capaz de inducir la MCP en la etapa de desarrollo más temprana. Considerando estos datos, y puesto que la carencia de *Rpr* o *Grim* evita la muerte de diferentes tipos celulares y en diferentes etapas del desarrollo, se postula que funcionen en la iniciación del programa de muerte, en un punto convergente de diferentes vías de activación^{MDM}. En concordancia RPR, HID y GRIM participan más arriba en la cascada que las caspasas, ya que la muerte inducida por estas proteínas se protege por inhibidores de cistein-proteasas, como p35^{MDM,MDM}. Estos tres genes se encuentran localizados en una misma región en el cromosoma, se transcriben en una misma dirección y comparten similitud en los primeros 14 residuos del extremo amino, siendo más parecidos *Rpr* y *Grim* entre sí^{MDM}.

Rpr codifica para una proteína citoplásmica, para la cual no se han encontrado homólogos, aunque tiene cierto parecido con un dominio, consistente de aproximadamente 70 aminoácidos, conocido como el "dominio de muerte" (DM). El DM se encuentra en proteínas de mamífero, muchas de las cuales también participan en la activación de la muerte, tales como los receptores membranales TNFR-1, Fas/Apo, CD40 y el de baja afinidad para NGF (p75NGFR). TNFR-1, Fas/Apo, y CD40 comparten la cualidad de inducir apoptosis cuando son activados por la unión de sus ligandos o anticuerpos agonistas, mientras que p75NGFR transduce la señal cuando su ligando no está unido^{MDM}. El DM de estas proteínas media la oligomerización de los receptores y

es esencial para la inducción de la muerte, ya que mutaciones en esta región abolen ambas actividades. De manera análoga, la activación de RPR involucra una oligomerización²⁷.

Poco se sabe aún de la cascada de transducción activada por los receptores mencionados, pero se han caracterizado algunas proteínas citoplásmicas que interactúan con ellos en respuesta a la unión del ligando. Es interesante que estas proteínas también posean un DM, y que sea precisamente por medio del cual se unan a los receptores. Las proteínas FADD/MORT1, RIP, TRADD y FAF-1 se asocian a los receptores TNFR-1 y Fas/Apo y son capaces de inducir muerte cuando son sobre-expresadas²⁸. ¿Cómo la interacción de los DM conlleva a la activación bioquímica de la apoptosis? es un pregunta cuya respuesta comienza a aclararse. La primera enzima descrita hasta el momento que contiene un DM es la cinasa DAP, que también activa la muerte celular y la reducción de su expresión confiere resistencia a las células que son sensibles a interferón-gama²⁹.

4.3 Proteínas adaptadoras conectan a las proteínas que contienen DM con las caspasas. Puesto que la señal para morir o vivir proviene del exterior de la célula, deben existir proteínas adaptadoras que conecten las vías de transducción con las caspasas, el componente efector más importante de la maquinaria de muerte. Por esta razón resulta importante el descubrimiento de la proteína RAIDD, ya que contiene en su extremo carboxilo un DM que le permite unirse al DM de la proteína RIP (mencionada anteriormente), y en su extremo amino una secuencia homóloga al prodominio de ICH-1 y CED-3. Esta región le permite asociarse al mismo dominio de ICH-1 y a CED-3, sirviendo como un adaptador directo entre las proteasas de muerte y el complejo de proteínas con DM que se asocian en respuesta a la unión de TNF y el ligando de Fas³⁰.

Una conexión directa entre las proteínas con DM y las caspasas la establece la proteína MACH/FLICE, ya que además de unirse directamente a FADD/MORT1, tiene en su extremo carboxilo una región homóloga al dominio catalítico de las caspasas. En similitud con las caspasas, MACH/FLICE también requiere ser procesada para activarse, degrada a PARP y es inhibida por inhibidores específicos para caspasas. Por otro lado, en el extremo amino presenta regiones de homología con FADD/MORT1, distintas al DM, por medio de las cuales se une a FADD/MORT1 en respuesta a la activación de Fas y TNFR-1. De manera interesante, MACH/FLICE se produce en varias isoformas, tal vez mediante procesamiento diferencial del RNAm. Algunas de las isoformas (MACHB) carecen del sitio catalítico, interactúan con las isoformas completas (MACHA) y evitan la progresión de la muerte. Estas isoformas podrían constituir un mecanismo para auto-protectores de la citotoxicidad mediada por TNF y FasL, y puesto que las diferentes isoformas se expresan en diferentes tejidos y a diferentes niveles, pudieran contribuir a la respuesta tejido-específica a estos ligandos³¹.

4.4 IAP y DAD-1 son dos grupos de proteínas que inhiben la apoptosis

Las proteínas denominadas IAP's (proteínas inhibidoras de apoptosis) son proteínas originalmente identificadas en el baculovirus que bloquean la muerte provocada por diferentes estímulos apoptóticos, de manera que los miembros de esta familia podrían actuar en un punto común entre las diferentes vías de activación de la muerte. En *Drosophila* se han identificado dos genes, denominados *DIAP1* y *DIAP2*, cuya actividad protectora se demostró al expresarlos en moscas transgénicas, donde evitaron tanto la MCP, como la muerte provocada por la sobre-expresión de genes que matan, como *Rpr* o *Hid*³². En mamíferos se han identificado dos genes de humano que codifican para proteínas semejantes a IAP, denominados *hIAP*³³ y *Niap*, capaces de proteger de la muerte inducida por varios estímulos, así como por la sobre-expresión de *lce* cuando son transfectadas a células en cultivo. De estos genes *Niap* es más interesante pues es la causa genética de la Atrofia del Músculo Espinal, enfermedad en la cual se mueren por apoptosis neuronas motoras, y se encuentra asociada a un gen recesivo por lo cual se consideraba que un factor inhibitorio debiera ser responsable de la enfermedad^{34,35}.

Los miembros de la familia IAP tienen en la región N-terminal dos repeticiones, denominadas regiones BIR, separadas por secuencias de tamaño variable y con poca similitud, por lo que se supuso que la actividad protectora de estas proteínas podría residir en estas regiones. Efectivamente, el extremo N-terminal de DIAP1 es suficiente para proteger de la muerte provocada por múltiples estímulos³⁶.

El gen *Dad-1* es la causa genética de la inmortalización de una línea celular de hamster, que tiene una mutación termosensible que provoca la apoptosis cuando se cultiva a la temperatura restrictiva. La proteína DAD-1 es hidrofóbica y se expresa de manera ubicua. También se encuentra muy conservada en la evolución, ya que se han identificado homólogos en

otros mamíferos (e.g. humano), sapos, nemátodos e incluso plantas, con altos porcentajes de identidad (más del 90% entre vertebrados y del 60% con plantas). Además, son funcionalmente equivalentes, ya que la expresión de *Dad-1* de humano en *C. elegans* previene la MCP con la misma eficiencia que el gene endógeno (*ce-Dad-1*). Recíprocamente, el gene *ce-Dad-1* rescata a la línea mutante de hamster de manera equivalente que los genes de vertebrados. El mecanismo bioquímico por el cual DAD-1 actúa es desconocido, pero dado su carácter hidrofóbico, debe ejercer su efecto en un compartimiento membranal. No parece tener un efecto en la expresión de *Bcl-2* y más bien podría participar en un punto posterior en la cascada de muerte, ya que la sobre-expresión de *Bcl-2* no rescata a la mutante termosensible de hamster. Puesto que todas las proteínas DAD-1 descritas tienen dos aspárticos conservados, se postula que DAD-1 podría ser sustrato de las caspasas y que, por ser un factor de sobrevivencia, su digestión desencadenaría la muerte celular²⁷.

4.5 Los virus contienen genes controladores de la MCP.

Normalmente, las células del sistema inmune detectan y matan a células infectadas, de manera que resulta conveniente para la propagación de un virus, por ejemplo, poder bloquear la apoptosis. Por lo tanto, no es de sorprender que algunos virus tengan en su genoma contrapartes de BCL-2 que les permitan mantener vivas a las células. Puesto que son las fábricas para producir su progenie. Tal es el caso de la proteína E1B de 19kDa de adenovirus, cuya expresión se requiere para inhibir la apoptosis durante la infección viral; esta proteína es capaz de inhibir la muerte inducida por TNF y FasL, interactúa con BAK²⁸, y se ha observado que bloquea la activación de CPP32/YAMA. Los virus llamados Epstein Barr y el de la fiebre africana de puerco (ASFV) tienen genes homólogos a *Bcl-2*, denominados BHRF-1 y LMWS-HL, respectivamente. De estos, se ha demostrado que BHRF-1 es capaz de prevenir la muerte²⁹.

Los virus albergan otros tipos de proteínas que también tienen la capacidad de bloquear la muerte, como las proteínas de Baculovirus p35 e IAP's (mencionadas anteriormente). La proteína p35 es de particular relevancia, ya que es capaz de bloquear la muerte en mamíferos, insectos y nemátodos (e.g. rescata las mutantes *Ced-9* de *C. elegans*³⁰), sugiriendo que las moléculas blanco con las que interactúa están conservadas evolutivamente. De hecho, actúa como un inhibidor competitivo de miembros de la familia de las caspasas, que como se revisó anteriormente, efectivamente están conservadas evolutivamente. La proteína p35 se digiere por las cistein proteasas en 2 partes, una de las cuales se mantiene unida formando un complejo ICE/p35 estable^{31,32}, y de esta manera evita que la caspasa pueda degradar otro sustrato.

El virus HIV que provoca el SIDA ha adquirido una estrategia única para multiplicarse, utilizando la apoptosis. Induce la muerte de células T mediante la proteasa que digiere a BCL-2 (descrita anteriormente), con lo cual provoca el engullimiento de cuerpos apoptóticos por parte de monocitos y macrófagos, los cuales se convierten en células infectadas crónicamente por el DNA viral. Los monocitos y macrófagos infectados sirven como reservorios y transportadores del genoma del HIV a órganos distantes del paciente³³.

5. Señales que convergen en la maquinaria de muerte.

5.1 Los factores de sobrevivencia usan vías de transducción La fase de activación de la MCP es un proceso que, en similitud con los mecanismos de activación de la diferenciación y la proliferación, es muy variado y específico para cada tipo celular. Esto es evidente, no sólo por la carencia de mutantes en esta fase en *C. elegans* que afectan la muerte celular en general, sino por la variedad de factores descritos, principalmente en mamíferos, capaces de provocar o prevenir la MCP. Estos factores incluyen componentes de la matriz extracelular, contactos celulares y factores difusibles proteicos o no proteicos, cada uno de los cuales transduce señales al interior de la célula por rutas muy particulares mediadas por sus receptores. No obstante, independientemente de la diversidad de estos activadores (o inhibidores) y las señales intracelulares generadas, ellos tienen que actuar ya sea sobre la maquinaria ejecutora del proceso apoptótico como tal o sobre sus reguladores directos. Así entonces, con base en lo descrito en las secciones anteriores, es factible que las señales de activación recaigan en miembros de la familia de ICE/CED-3, componente fundamental de la maquinaria ejecutora, o en miembros de la familia de BCL-2/CED-9, regulador predominante de la maquinaria de muerte. La mayoría de la información sobre las vías de activación de la maquinaria de muerte, así como del posible mecanismo bioquímico por el cual actúa, se ha obtenido con modelos basados en células del adulto, principalmente del sistema inmune; por lo tanto, la mayoría de la información que se expone a continuación no necesariamente ocurre también durante el desarrollo.

Muchos factores de sobrevivencia activan receptores que tienen actividad de tirosin-cinasa, los cuales inician una cascada de transducción de la señal que involucra fosforilaciones sucesivas. En esta cascada (GRB2-SOS-RAS-RAF-MAPK's) por lo menos RAF-1 parece ser importante, pues interactúa directamente con BCL-2, como se mencionó anteriormente. Alternativamente a esta vía se ha demostrado que el receptor a IGF-1, con actividad de tirosin-cinasa, transduce su señal de sobrevivencia a través de una cascada que involucra a la cinasa PI3 y a la cinasa denominada Akt; la expresión de Akt exógena incrementa la sobrevivencia, mientras que la presencia de una mutante dominante negativa (que no tiene actividad de cinasa) inhibe la sobrevivencia promovida por IGF-1¹⁰⁴.

Otros factores que inciden sobre la MCP transducen señales por otras rutas que involucran por ejemplo segundos mensajeros clásicos como calcio, IP3, y AMPc o cinasas multifuncionales como la PKC. Los ésteres de forbol, por otro lado, que participan en la activación de la PKC, han demostrado tener un efecto protector sobre la muerte, lo cual hace congruente que la PKC α sea un sustrato de las caspasas²². Globalmente, rutas de transducción en respuesta a señales extracelulares que recaen en la activación de los elementos básicos del complejo transcripcional AP-1 (constituído por FOS y JUN), terceros mensajeros comunes dentro de las rutas de transducción que utiliza ésteres de forbol o calcio, pueden ser utilizadas para la activación de la MCP, ya que la transcripción de estos factores se eleva frecuentemente durante la MCP. A continuación se describen los transductores más comúnmente usados para regular la MCP.

5.2 Los factores inductores de muerte TNF y ligando de Fas utilizan una vía de transducción particular.

Los receptores de membrana TNFR-1 y Fas/Apo transducen la señal de muerte en respuesta a la unión de sus ligandos TNF- α y el ligando de Fas (FasL), respectivamente. Estos ligandos son multiméricos e inducen la aglomeración de sus receptores. Ambas son proteínas identificadas en el sistema inmune, siendo TNF- α producido principalmente por macrófagos activados y FasL por células T citotóxicas, pero los receptores a TNF son prácticamente ubicuos y los de Fas se expresan en gran variedad de células (Fas se ha detectado incluso en células neoplásicas, y ratones mutantes en este gen o su ligando presentan desórdenes linfoproliferativos y autoinmunes). Como se mencionó anteriormente, estos receptores contienen el DM lo que les permite asociarse con otras proteínas que tienen este dominio como FADD/MORT1 y TRADD pero, a partir de este punto, se desconoce con precisión cómo este complejo es capaz de activar la maquinaria de muerte. Dos mecanismos pudieran estar involucrados en esta fase: uno estaría asociado a la producción de ceramida, característica de estos receptores y que se discute en la siguiente sección, y otro sería a través de proteínas como RAIDD y MACH/FLICE que, como se mencionó anteriormente, harían la conexión con la maquinaria de muerte. Pudiera también participar la fosfatasa denominada FAP-1 la cual se asocia al extremo amino-terminal del dominio citoplásmico de Fas/Apo e inhibe la muerte celular²³; puesto que se ha observado que la actividad de BCL-2 se altera por fosforilación²⁴, es posible imaginar que las proteínas con DM inciden sobre la maquinaria de muerte por medio de este tipo de modificaciones.

En particular, el efecto de TNF sobre una célula es muy interesante, pues genera en el interior un balance entre la vida y la muerte. TNF induce la activación de un factor de transcripción denominado factor nuclear kappa B (NF- κ B), el cual activa la transcripción de genes involucrados en la respuesta a la inflamación, la infección y el estrés. La aparición de este factor de transcripción en respuesta a TNF lo propuso como un mediador de la muerte, pero el ratón mutante deficiente de NF- κ B muere antes del nacimiento, al parecer debido a una muerte masiva de células del hígado, lo cual implica que NF- κ B induce la síntesis de proteínas que protegen a las células del hígado embrionario de morir. Además, si se impide la activación de NF- κ B en diferentes tipos celulares (fibroblastos y macrófagos tumorales y no tumorales), las células se vuelven sensibles a morir ante el TNF. Por lo tanto, NF- κ B puede funcionar como un bloqueador general de la apoptosis, estableciendo una retroalimentación negativa con la vía apoptótica encendida por TNF. Puesto que NF- κ B se activa también en respuesta a diferentes agentes apoptóticos, como las drogas que se utilizan en la quimioterapia contra el cáncer, la ineficiencia en la respuesta al tratamiento puede deberse a la protección de la muerte mediada por NF- κ B; por lo tanto, se podría mejorar el tratamiento incluyendo agentes que bloqueen a NF- κ B²⁵.

5.3 La ceramida participa como segundo mensajero durante la cascada de muerte.

La ceramida es un segundo mensajero común en muchas respuestas celulares que incluyen la diferenciación, la proliferación y la muerte celular. La relevancia de la ceramida en la MCP se demuestra al administrar a cultivos celulares variantes activas de la ceramida permeables a las células, las cuales inducen los cambios típicos de apoptosis como la fragmentación nuclear y la degradación internucleosomal del DNA; la utilización de análogos inactivos u otros lípidos que funcionan como segundos mensajeros (e.g. diacilglicerol, ácido fosfatídico o ácido araquidónico) no inducen la muerte¹⁸. Es posible que el DM esté involucrado en la generación de ceramida, puesto que es un mensajero secundario común en la activación de la muerte por TNFR-1, Fas/Apo y RPR, aunque la ceramida es también generada durante la apoptosis inducida por radiación.

La producción de ceramida se lleva a cabo a partir de la hidrólisis de la esfingomielina, un fosfolípido preferentemente concentrado en la membrana plasmática, catalizada por las esfingomielinasas segundos o minutos después de la estimulación. La posterior regeneración de la esfingomielina se realiza al transferir el grupo colina de la fosfatidicolina a la propia ceramida, completando así el ciclo de la esfingomielina. De aquí se desprende que para generar ceramida, las señales inductoras de apoptosis deben estimular la activación de las esfingomielinasas. Hay dos formas de esfingomielinasas, distinguibles por el pH óptimo al cual actúan; una es ácida y se encuentra tanto en lisosomas como en la membrana plasmática, mientras que la otra es neutra, dependiente de magnesio y se encuentra en el citoplasma y en la capa externa de la membrana plasmática. Aunque ambas enzimas son activadas por TNF-alfa y FasL, sólo la esfingomielinasa ácida participa en la activación de la apoptosis, ya que células de ratones mutantes nulos en ésta, pero que producen cantidades normales de la forma neutra, ya no mueren por apoptosis inducida por radiación. Sin embargo, puesto que los ratones mutantes se desarrollan y nacen normalmente, la activación de la muerte durante el desarrollo parece no ser únicamente mediada por esta vía de señalización¹⁹.

La ceramida pudiera transducir la señal a la maquinaria de muerte, a través de enzimas que son activadas por este lípido, como la proteína serin(treonin)-cinasas membranar (llamada CAPK) y la fosfoproteína fosfatasa citosólica (conocida como CAPP). La primera es capaz de fosforilar a RAF-1, lo cual implica una conexión con la cascada de fosforilación regulada por receptores con actividad de tirosin cinasas, mientras que de la segunda se desconocen sus sustratos. De acuerdo a su papel en la MCP, la actividad de CAPK se estimula, y la proteína CAPP se trasloca a la membrana plasmática, en respuesta a TNF-alfa. CAPP pudiera ser más significativa en el proceso de MCP, ya que la apoptosis inducida por ceramida se bloquea en presencia de ácido okadaico, un inhibidor muy potente de esta enzima²⁰. Por otro lado, es importante tomar en cuenta que, ya que la ceramida es capaz de generar estrés oxidativo, este mecanismo podría también participar durante la activación de la muerte (ver siguiente sección).

Independientemente del mecanismo que utilice la ceramida para activar la maquinaria de muerte, parece tener un papel dual, uno antes y otro después de las caspasas, estableciendo un ciclo retroalimentador con estas enzimas en lugar de actuar simplemente en forma secuencial. Al analizar la muerte inducida por RPR en células de insecto, la generación de ceramida se evita en presencia de un inhibidor de estas proteasas, mientras que la muerte inducida por la adición directa de ceramida al cultivo no es prevenible por el mismo inhibidor²¹. Ya que se ha demostrado que la ceramida activa a las caspasas, específicamente CPP32/YAMA, es posible que la ceramida active a las caspasas y que la acción de éstas, a su vez, estimule la generación de ceramida²².

5.4 El estrés oxidativo actúa como un activador de la muerte celular.

El estrés oxidativo se define como el estado en el cual los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) son superiores a la capacidad reductora de la célula. El oxígeno molecular acepta electrones fácilmente de otras moléculas para formar las ERO y es esta peculiaridad la que lo hace tóxico a las células. Por ejemplo, muchas reacciones intracelulares, entre ellas la respiración, reducen el oxígeno molecular a superóxido ($O_2^{\cdot -}$) o bien a peróxido de hidrógeno (H_2O_2); estas moléculas son moderadamente reactivas con las moléculas biológicas, pero el peróxido es muy reactivo en presencia de metales como el hierro y el cobre (reacción de Fenton), generando el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el cual es altamente reactivo y tal vez directamente responsable de la mayoría del daño oxidativo provocado por ERO observado en los sistemas biológicos. Por lo tanto, es importante que la célula elimine tanto al superóxido como al peróxido de hidrógeno, para lo cual cuenta con varios mecanismos. Uno de ellos es la superóxido dismutasa (SOD), enzima que dismuta el superóxido para generar peróxido de hidrógeno, el cual, a su vez, es convertido

en agua y oxígeno molecular por la catalasa; las peroxidases catalizan una reacción análoga, en la cual el peróxido de hidrógeno es reducido a agua por un reductor (Fig. 6).

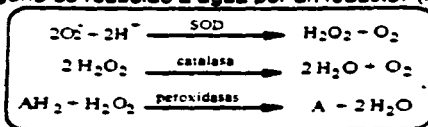


Figura 6. Esquema de las reacciones catalizadas por enzimas antioxidantes para desintoxicar a las células de superóxido y peróxido de hidrógeno (AH_2 , reductor).

Es posible que el estrés oxidativo forme parte importante del proceso de muerte, pues muchos agentes que inducen apoptosis son oxidantes o bien estimulan el metabolismo oxidativo celular; además, en diversos sistemas la muerte no sólo se asocia a un incremento en los niveles de ERO, sino que en ocasiones se evita por la presencia de antioxidantes endógenos o exógenos²². Por ejemplo, el TNF provoca un rápido incremento en ERO, y tanto este incremento como la muerte celular^{22a} se pueden inhibir por la tierredoxina, un tiol intracelular que actúa como antioxidante y peptidor de radicales libres^{22b}, por la N-acetylcisteína (NAC), un tiol antioxidante y precursor de glutatión reducido (GSH)^{22c}, o por la sobre-expresión de la SOD mitocondrial^{22d}.

BCL-2 pudiera participar en el control de los niveles de ERO puesto que su localización correlaciona con sitios de producción de ERO, a saber las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo. Las propiedades antioxidantes de BCL-2 pueden fundamentarse en la capacidad de esta proteína para inhibir la muerte producida en condiciones donde se genera estrés oxidativo como las radiaciones y el estrés calórico²³. Más específicamente, un aumento en la síntesis de BCL-2 intracelular bloquea el incremento de ERO asociado a la muerte; por ejemplo, la presencia de BCL-2 evita la peroxidación de lípidos durante la muerte inducida por dexametasona^{23a}, así como el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos provocado al depletar el GSH intracelular en un cultivo de neuronas^{23b}. Es también congruente con la actividad antioxidante, el hecho de que los ratones mutantes nulos en Bcl-2 se vuelven grises con el segundo ciclo del folículo piloso, indicando una falla en la regulación redox de la síntesis de melanina^{23c}.

Alternativamente se ha propuesto que BCL-2 podría actuar como un pro-oxidante que al incrementar la concentración de ERO de una manera controlada, provocaría la activación de enzimas antioxidantes. Esta hipótesis está basada en evidencias que muestran que, en bacterias, la expresión de *Bcl-2* humano tiene un efecto inmediato pro-oxidante, que como consecuencia activa el mecanismo bacteriano de defensa al estrés oxidativo, como la expresión de la catalasa KatG, lo cual le confiere una resistencia 100 veces mayor a peróxido de hidrógeno. En concordancia, en una línea de células B la expresión de SOD está asociada a la presencia de BCL-2^{23d}.

No obstante lo anterior, el estrés oxidativo no forma parte esencial de la maquinaria de muerte, ya que la apoptosis se lleva a cabo en condiciones anaerobias, donde la producción de ERO es mínima²⁴. Además, puesto que la muerte inducida por hipoxia también tiene características apoptóticas y es protegida por BCL-2 y BCL-X_L, el mecanismo de inhibición de la muerte de estas proteínas no se limita a activar una vía antioxidante²⁵. Por lo tanto, si dividimos el proceso de muerte en dos partes, la de activación y la de ejecución, lo más probable es que el estrés oxidativo participe en la fase de activación de la maquinaria de muerte, en lugar de formar parte del mecanismo que la ejecuta.

Debido a que las ERO son moléculas reactivas y en general no específicas, es difícil ensamblarlas dentro de cascadas de transducción de señales, funcionando como segundos mensajeros. Sin embargo, debido a que se puede modificar la actividad de algunas proteínas alterando su estado oxidado o reducido, pudiera ser que ciertos blancos de las ERO sean parte importante de cascadas de transducción. Por ejemplo, la actividad de algunos factores de transcripción se regula por redox tanto a nivel de su transcripción, incrementando la cantidad del factor, como postraducionalmente, modificando su capacidad para unirse al DNA. En específico, la activación de NF-κB depende de la presencia de peróxido de hidrógeno²⁶, mientras que para la inducción de la expresión de *c-Fos* en respuesta a TNF-α y bFGF se requiere de la producción de ERO²⁷. Además, la afinidad del complejo AP-1 por su sitio de reconocimiento en el

DNA también se regula por el estado redox: en su estado oxidado la capacidad de unión disminuye de manera significativa. Este último proceso es modulado por la proteína REF-1 (redox factor 1), cuya actividad a su vez se regula de acuerdo a su estado oxidado o reducido, lo que está de acuerdo con la existencia de cascadas redox de regulación, de forma análoga a la regulación por cascadas de fosforilación-defosforilación²²⁰⁰.

La posibilidad de que el estrés oxidativo participe en vías de transducción de señales aumenta con el descubrimiento de que las proteínas reguladas por ERO no se restringen a factores de transcripción, sino que hay ejemplos de regulación por redox de la cinasa MAP²²⁰¹, así como de proteínas asociadas a membrana como RAS o los receptores de glutamato tipo NMDA²²⁰². Además, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimula la proliferación de células vasculares de músculo liso, provoca en minutos un aumento de peróxido de hidrógeno. Si este aumento se impide por medio de la adición de catalasa o NAC, se bloquea por completo la estimulación de las células. Puesto que la respuesta a PDGF incluye fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, la activación de la cinasa MAP y síntesis de DNA, el hecho de que la simple abolición del incremento de peróxido de hidrógeno prevenga la estimulación de las células, sugiere que éste puede actuar como una molécula transductora de señal fundamental²²⁰³.

Por lo tanto, no es de sorprender que el estrés oxidativo pueda ser parte de la cascada de transducción de señales que activa la muerte. De hecho, tal parece ser el caso en la muerte de neuronas simpáticas provocada por la ausencia de NGF. En este sistema ocurre un aumento transitorio de ERO antes de que aparezcan los cambios morfológicos típicos de apoptosis, y dicha muerte se evita por la presencia de SOD sólo cuando se aplica en una etapa temprana (i.e., anterior al pico de las ERO)²²⁰⁴.

Es posible que el estrés oxidativo también medie la muerte celular durante el desarrollo. En el blastocisto de ratón células con el potencial de formar el trofocotodermo, que son las que formarán las estructuras extraembrionarias como la placenta, se mueren en el blastocelo (i.e. cavidad del blastocisto), mediante un mecanismo que al peróxido de hidrógeno, mientras que las células capaces de formar parte de la masa celular interna, que son las que darán lugar al embrión como tal, no se mueren (el peróxido de hidrógeno parece originarse a partir de la oxidación de poliaminas). Esta MCP pudiera tener como finalidad evitar la "contaminación" del embrión con células con potencial extraembrionario. (Es posible que la inducción de estrés oxidativo a partir de la peroxidación de poliaminas sea un mecanismo común para inducir la MCP en varios momentos del desarrollo, pues también se ha observado actividad de poliamin-oxidasas en otras regiones de muerte, como la región interdigital de los miembros²²⁰⁵). Además, utilizando reactivos fluorescentes que detectan ERO (dihidro dicloro fluoresceína) y apoptosis (naranja de acridina) se ha observado que en diferentes regiones del embrión de ratón donde ocurre MCP, como los interdigitos, el esternón, el paladar, etc., también hay estrés oxidativo. Usando un sistema de cultivo *in vitro* de miembros de embrión de ratón, donde el proceso de desarrollo ocurre de forma normal, se disminuye la MCP en los interdigitos en presencia de antioxidantes²²⁰⁶.

En plantas las ERO están implicadas en la llamada respuesta hipersensitiva de resistencia a patógenos, en la cual ocurre muerte de las células que rodean el sitio de infección, delimitando la zona de propagación del patógeno. En una mutante de *Arabidopsis thaliana*, hay un descontrol de la muerte celular en ausencia del patógeno y no se detiene la expansión de la muerte una vez que se inició. El superóxido es necesario y suficiente para iniciar la formación de la lesión y se acumula justo antes del inicio de la muerte celular²²⁰⁷. Esto refleja que las plantas comparten al menos parte del proceso de muerte que sucede en células animales.

5.5 Movimientos de calcio intracelular podrían participar en la activación de la muerte.

El calcio es un mensajero fundamental en muchos procesos celulares; multitud de enzimas son sensibles a este ión y es quizá éste el mecanismo usado más ampliamente para desencadenar respuestas celulares específicas. La importancia del calcio en la MCP se ha derivado de estudios que involucran drogas que bloquean o estimulan la movilización de calcio intracelular. La tapsigargina, que bloquea la ATPasa dependiente de Ca^{++} de RE encargada de disminuir el Ca^{++} citoplásmico y retomar lo hacia las zonas intracelulares en el RE, e ionóforos de Ca^{++} que facilitan la entrada de Ca^{++} a través de la membrana plasmática, inducen la apoptosis en muchos tipos celulares. La muerte también se dispara en timocitos por la estimulación del receptor de células T, y en neuronas por la estimulación con glutamato de receptores tipo NMDA, y ambas respuestas involucran un incremento de Ca^{++} sostenido²²⁰⁸. Además, uno de los receptores conocidos a IP3 se requiere para que ocurra la MCP de linfocitos causada por dexametasona²²⁰⁹. Es posible que

la salida de calcio del RE sea relevante en el proceso de muerte, pues durante la apoptosis provocada por el tratamiento con glucocorticoides, la sobre-expresión de una proteína que une calcio en el RE (calbindina), retarda la apoptosis²³. Además, durante la apoptosis inducida por ausencia del factor de sobrevivencia IL3 ocurre un movimiento gradual de calcio, en el que disminuye la concentración en el RE y aumenta en la mitocondria; la presencia de *Bcl-2* evita tanto el movimiento de calcio como la muerte, lo cual sugiere que *Bcl-2* podría también participar en la distribución del calcio intracelular. Consistentemente, *Bcl-2* se localiza en los principales sitios de almacenamiento de calcio, como son el espacio entre las membranas interna y externa del núcleo, así como su continuidad con el lumen del RE²⁴. No obstante lo anterior, aún no se ha determinado como el movimiento de Ca²⁺ inside sobre la maquinaria de muerte, pero las endonucleasas que digieren el DNA de manera internucleosomal, las cuales requieren Ca²⁺ para ser activadas, podrían ser parte de los blancos de este ión. Por otro lado, es interesante mencionar que agentes pro-oxidantes inducen movilidad de calcio intracelular²⁵, lo que es consistente con la demostración de que la muerte causada por incremento en peróxido en plantas requiere de un incremento en el calcio intracelular²⁶.

6. La apoptosis y el ciclo celular.

6.1 Moléculas inductoras de proliferación también inducen apoptosis. Diferentes líneas de razonamiento han generado la noción de que hay una conexión entre la apoptosis y el ciclo celular. Algunos cambios morfológicos observados durante la apoptosis que son reminitivos a los que ocurren durante la mitosis, como la pérdida de adherencia por la célula, la condensación de la cromatina y la fosforilación y desensamblaje de las láminas del núcleo, son sugestivos del uso y control de una maquinaria molecular compartida. Mas revelador aún es la capacidad de distintos oncogenes que generan proliferación descontrolada, de inducir apoptosis. Un caso típico es el efecto provocado por la proteína E1A de adenovirus, la cual, además de ser la principal proteína del virus promotora de la proliferación celular, simultáneamente induce la apoptosis, por lo que, para la propagación exitosa del virus es necesaria la presencia de E1B 19kD, capaz de bloquear la muerte inducida por E1A. Las regiones de la proteína E1A necesarias para inducir la proliferación (e.g. los dominios que median la interacción con la proteína de retinoblastoma, pRB) son las mismas que se requieren para la promoción de la apoptosis, sugiriendo que los mismos blancos están involucrados en ambos procesos^{27,28}.

La proteína celular E7 de papilomavirus, el antígeno T grande (AgT) del virus SV40 y c-MYC, presenta la misma función dual de E1A, pues todos son potentes inductores tanto de la proliferación como de la apoptosis. Por ejemplo, cuando se activa *c-Myc* en fibroblastos cultivados en bajo suero, el número total de células no aumenta porque hay una muerte sustancial por apoptosis. Las regiones de c-MYC necesarias para provocar la apoptosis son las mismas que se requieren para la transformación, autoregulación e inhibición de la diferenciación, como el dominio que permite la heterodimerización con MAX²⁹. Por tanto, el mecanismo molecular por el cual c-MYC induce la apoptosis está relacionado con el mecanismo molecular por el cual realiza otras funciones³⁰.

La inducción de la apoptosis por c-MYC se ha observado también en animales completos. Animales transgénicos cuyos linfocitos expresan *c-Myc* constitutivo presentan elevados niveles de apoptosis espontánea, y una mayor sensibilidad para la inducción de la muerte en órganos linfoides. Consistente con la capacidad de c-MYC para activar la MCP, BCL-2 inhibe la muerte inducida por c-MYC, y la presencia de ambas proteínas sinergizan la oncogenicidad en ratones transgénicos, indicando que la muerte celular es un importante contrahimiento durante la carcinogénesis inducida por c-MYC en ausencia de BCL-2³¹.

6.2 La inducción de la muerte se asocia a eventos de proliferación

De acuerdo con los efectos de los oncogenes mencionados en la sección anterior, durante la muerte provocada a células en estado quiescente de la próstata por privación de factores de sobrevivencia, hay incorporación de bromodeoxiuridina, indicando que las células iniciaron la síntesis de DNA y, asociado a este proceso, se activa la expresión de *c-Myc* y *c-Fos*³². De manera similar, durante la MCP de neuronas posmitóticas desprovistas de NGF hay una activación selectiva de ciclina D1, que promueve la entrada a la fase S³³. La ciclina A podría tener una participación más directa en la muerte, ya que se activa en la apoptosis inducida por c-MYC, y su expresión resulta suficiente para inducir la MCP³⁴.

También reguladores mitóticos parecen participar en la activación de la muerte, pues la activación de la cinasa p34^{cdc2} a tiempos inapropiados durante el ciclo celular provoca muerte con características apoptóticas. En concordancia, la muerte de diferentes tipos celulares inducida por células T citotóxicas o por Granzima B/Fragmentina 2 requiere de la activación prematura de p34^{cdc2}, ya que la fragmentación del DNA y del núcleo no suceden si ésta se inactiva¹⁵⁵. En la apoptosis inducida por agentes genotóxicos están implicadas también ciclinas mitóticas y CDKs (cinasas dependientes de ciclina); por ejemplo, en células HeLa tratadas con staurosporina, cafeína, 6-dimetilaminopurina o ácido okadaico provocan la elevación de ciclina A, además de las cinasas p34^{cdc2} y cdk2, y en células HL60 tratadas con campotecina, un inhibidor de topoisomerasa I, se activan ciclina B1 y p34^{cdc2}. Sin embargo, la activación de p34^{cdc2} no es un requerimiento universal, pues no se activa durante la muerte inducida por falta de factores de sobrevivencia en fibroblastos y neuronas, e incluso hay casos en los que su activación está asociada a la protección de la muerte¹⁵⁶.

Por lo tanto, la activación de múltiples moléculas reguladoras del ciclo celular durante la MCP apoya la interacción entre el proceso que controla la MCP y el que controla la proliferación. No obstante las correlaciones mencionadas, su relevancia no siempre ha sido demostrada; por ejemplo, la participación de c-FOS en la promoción de la MCP no está muy clara, pues aún cuando se detecta su activación en las células que van a morir por apoptosis en gran variedad de regiones del embrión y durante la muerte inducida por diversos estímulos¹⁵⁷, ratones mutantes nulos en c-fos presentan un patrón normal de MCP¹⁵⁸. Considerando que los participantes en la división celular como c-MYC y p34^{cdc2} inducen apoptosis cuando son activados en condiciones no proliferativas (e.g. en ausencia de suero), se ha planteado la hipótesis en la que la muerte se activa a partir de un conflicto de señales: la célula recibe instrucciones intracelulares para proliferar en un contexto no proliferativo. Sin embargo, dos hipótesis alternativas son plausibles; en una, algunas moléculas que regulan el ciclo celular tendrían un papel dual interactuando con distintos blancos dependiendo del proceso donde participen, y en otra, la ocurrencia de la MCP depende de la activación de la maquinaria del ciclo celular en, por ejemplo, condiciones no proliferativas.

6.3 La proteína supresora de tumores pRB participa en la regulación de MCP.

Muchas proteínas oncogénicas virales, como E1A, E7, y AgT se unen a pRB hipofosforilado (pRBhipo) e inhiben su actividad antiproliferativa mediada por el secuestro del factor transcripcional E2F, regulador positivo de la expresión de genes de la fase S del ciclo celular; es decir, la unión de los oncogenes liberan a E2F de tal forma que se promueve el progreso del ciclo celular cuando pRB está hipofosforilado, como en la fase G0 (Figura 7). Así entonces, el mecanismo anterior es el responsable de los efectos proliferativos de algunos oncogenes y pudiera ser el medio para activar la MCP en ciertas condiciones. Consistente con esta idea, la sobre-expresión de E2F genera el mismo fenotipo que la presencia de E1A, es decir, la inducción tanto de proliferación como de apoptosis¹⁵⁹. En consecuencia, la presencia de pRB activa (i.e. pRBhipo) debería tener un papel protector de la muerte. En efecto, la sobre-expresión de Rb en células de la línea P19 derivada de carcinoma embrionario y la línea SAOS-2 derivada de osteosarcoma, evita la MCP causada por la aplicación de ácido retinoico y por irradiación, respectivamente. Además, el ratón mutante con Rb nulo muere a los 12-13 días *post coitum* y presenta, además de proliferación inapropiada, muerte masiva principalmente en el hígado, en células hematopoyéticas derivadas del hígado, y en el sistema nervioso tanto periférico como central, que son los tejidos donde normalmente se expresa Rb de manera abundante¹⁶⁰.

Lo anterior es consistente con la hipótesis de que pRBhipo protege de muerte al promover un estado quiescente en el cual las células son menos susceptibles a la apoptosis. Sin embargo, la simple detención del ciclo celular mediante la adición de afidocolina, un inhibidor específico de la DNA polimerasa alfa, no protege a las células SAOS-2 de morir por apoptosis inducida por irradiación¹⁶¹, por lo tanto, pRB participa en la prevención de la apoptosis por un mecanismo que difiere del de solo evitar la replicación del DNA. Tal vez sea importante su interacción con otros reguladores del ciclo celular como E2F, ciclina D, o MYC, o bien el estado de arresto en G1/G0 no es competente para que la MCP ocurra. La relevancia de pRB en la MCP se acentúa con las evidencias que muestran un corte de esta proteína por una caspasa durante la progresión de la apoptosis inducida por staurosporina o por TNF. Aunque aún no está clara la consecuencia de dicho procesamiento, es posible que parte del proceso de muerte involucre la supresión de la actividad protectora de pRBhipo¹⁶².

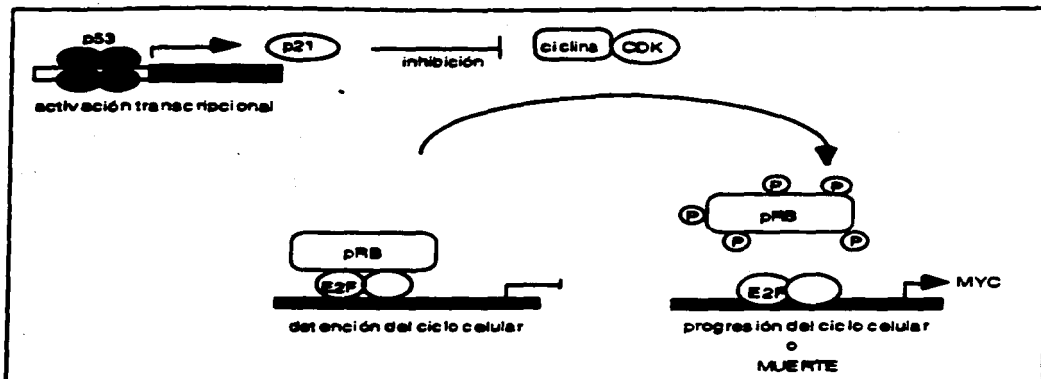


Figura 7. Esquema de la interacción de algunas moléculas reguladoras del ciclo celular que tienen una incidencia en el desencadenamiento de la apoptosis.

6.4 La proteína supresora de tumores p53 Induce MCP.

p53 es uno de los primeros supresores tumorales identificados cuyo gene se encuentra mutado en un porcentaje muy alto de los tumores humanos (70%). De acuerdo con su papel en carcinogénesis, ratones mutantes con p53 nulo se desarrollan normalmente pero tienen una alta incidencia de tumores en la edad adulta. Cuando el DNA sufre daño ya sea por radiaciones o por agentes químicos, p53 se activa y provoca que el ciclo celular se detenga, dándole tiempo para que la maquinaria de reparación del DNA actúe, razón por la que se le ha denominado el guardián del genoma. Sin embargo, cuando el daño al DNA es severo y rebasa la capacidad de reparación, la célula se muere por apoptosis por un mecanismo que requiere de p53. La muerte causada por la activación inapropiada del ciclo celular como la inducida por c-MYC, E1A y E2F, requieren de p53^{32,33}. En relación a lo anterior, es interesante que la muerte observada en el sistema nervioso en desarrollo de un embrión con mutaciones nulas en ambos alelos de *Rb* (*Rb*^{-/-}) se evita cuando p53 está ausente (i.e. en un embrión *Rb*^{-/-}, p53^{-/-}). Entonces, aunque p53 no parece tener una función durante el desarrollo, éste se puede activar en respuesta a una desregulación del ciclo celular, promoviendo la apoptosis³⁴.

Ratones p53^{-/-} y con uno de los alelos de *Rb* funcional (*Rb*^{+/-}) han sido muy útiles para demostrar la importancia de la muerte celular mediada por p53 para evitar la formación de tumores. En ratones *Rb*^{-/-} se generan lesiones degenerativas asociadas a mutaciones somáticas en el segundo alelo de *Rb* pero en ausencia de p53 surgen tumores que crecen agresivamente. Por lo tanto, el crecimiento continuo de células que perdieron el punto de control determinado por pRB parece depender de la pérdida de la respuesta apoptótica mediada por p53, lo cual explica por qué ambas proteínas son un blanco simultáneo en muchos ejemplos de progresión maligna.

Aunque aún no está claro si la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis son manifestaciones de la misma actividad de p53, parece que dependen en parte de dominios diferentes de la proteína. Para detener la progresión del ciclo celular, p53 activa la transcripción de algunos genes como p21/CIP1/WAF1, un inhibidor de las CDK que promueven la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación (y a su vez inactivación) de pRB (fig 7). Esta actividad pudiera participar en el control de la expresión de *Bax* puesto que su región promotora tiene secuencias de unión a p53 y se ha demostrado que puede ser transactivado por p53³⁵. La importancia de este mecanismo se ha determinado *in vivo* en modelos de tumorigénesis, pues la ausencia de BAX incrementa la formación de tumores, aún en presencia de p53. Sin embargo

esta no puede ser la única ruta de activación de la maquinaria de muerte por p53 ya que, por un lado, no siempre se ha observado que incrementen los niveles del RNAm o de la proteína de BAX durante la muerte mediada por p53, y por otro, las células de ratones mutantes nulos en *Bax* expuestas a irradiación, mueren por apoptosis dependiente de p53⁷⁰. En apoyo a lo anterior se ha observado que la apoptosis inducida por daño al DNA dependiente de p53 se lleva a cabo en ausencia de síntesis de RNA o proteína⁷¹.

Alternativamente, la actividad de represión transcripcional de p53, pudiera ser más significativa en el mecanismo de inducción de apoptosis mediado por esta proteína, pues entre los genes reprimidos por p53 está *Bcl-2*. De acuerdo con este mecanismo, tanto en células de cáncer mamario⁷² como en células de leucemia murina se ha observado que la sobre-expresión de p53 reduce la cantidad de RNAm y de proteína de BCL-2 y, además, ratones deficientes en p53 presentan mayor cantidad de BCL-2 y menor cantidad de BAX en diferentes tejidos⁷³. Las proteínas BCL-2 y E1B, por otro lado, tiene efectos negativos sobre la actividad represora de p53 ya que su sobre-expresión bloquea esta actividad y consecuentemente aumentan la expresión de los genes reprimidos por p53⁷⁴.

Al momento, no hay un consenso sobre el mecanismo por el cual p53 induce apoptosis o detención del ciclo celular. Se han postulado dos modelos (figura 8) para explicar el mecanismo por el cual p53 media la apoptosis y su relación con su actividad antiproliferativa. En el primer modelo existe un conflicto de señales, donde la apoptosis es el resultado directo de la implementación del punto de control en G1 por parte de p53 en una célula que simultáneamente está recibiendo una señal proliferativa; tal podría ser el caso de la muerte inducida por proteínas como E1A, c-MYC o E2F, y concordaría con la protección mediada por pRBhipo. En el segundo modelo, la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis serían eventos independientes y separables. Este modelo se apoya por los resultados que indican que la pérdida de una vía no necesariamente perturba a la otra; una mutación puntual de p53 que retiene la habilidad de activar a p21^{CIP1/WAF1} e induce detención del ciclo celular, es incapaz de activar la apoptosis⁷⁵. Con base en lo descrito anteriormente, es probable que ambos operen, dependiendo del tipo celular y de las circunstancias de la célula en cuestión.

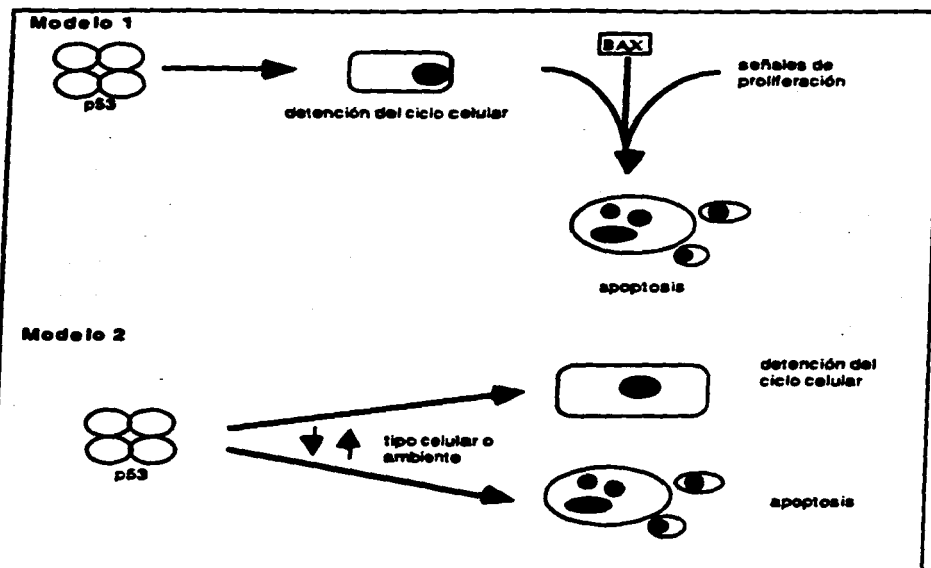


Figura 8. Dos modelos probables de la acción de p53 en la MCP.

6.5 Miembros de la familia de Bcl-2 inciden en el control del ciclo celular.

Considerando la influencia de moléculas reguladoras del ciclo celular sobre la MCP, resulta interesante saber si también las moléculas que controlan la muerte, como BCL-2 y BAX, tienen un efecto sobre el control del ciclo celular. Estudios recientes han demostrado que la sobre-expresión de *Bcl-2* reduce la proliferación y el recambio de timocitos *in vivo*, y retarda la entrada al ciclo celular de timocitos y fibroblastos quiescentes cuando son estimulados con mitógenos²². Por el contrario, la sobre-expresión de *Bax* en ratones transgénicos provoca que al menos el doble de timocitos se encuentren en la fase S, respecto al número observado en ratones silvestres. Al comparar el tiempo que se tardan los timocitos en iniciar la síntesis de DNA cuando las células son sincronizadas, la presencia de BCL-2 produce un retraso, mientras que la presencia de BAX produce un adelanto respecto al tiempo que toma la entrada a la fase S en las células silvestres. Dicha disminución de la velocidad observada en el ratón transgénico que sobre-expresa *Bcl-2* se asocia a un incremento en la cantidad de la proteína p27^{kip1}, un inhibidor de las cinasas que promueven la progresión del ciclo celular. De manera complementaria, la aceleración de la síntesis de DNA provocada por BAX en ratones transgénicos se acompaña por una disminución en la cantidad de p27^{kip1}. Como consecuencia, los niveles de BCL-2/BAX podrían influir en el momento que ocurre la activación de las cinasas inhibidas por p27^{kip1}. En el caso de las células que expresan *Bax*, el facilitar la activación de las CDKs permitiría un progreso más rápido hacia el punto del ciclo celular en que se toma la decisión de vivir o morir. La situación contraria se aplicaría para el caso en que hay un exceso de BCL-2, cuando el punto de decisión se alcanza más tarde²³. El efecto de BCL-2 y BAX sobre el ciclo celular va en concordancia con la hipótesis de

que el inicio de la MCP depende de eventos proliferativos como la entrada a la fase S, siendo protector retardar el ciclo y acelerador de la muerte estimular el inicio de la síntesis de DNA.

7. Conclusiones y perspectivas.

Actualmente no se puede dudar sobre la importancia que tiene la MCP durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta de un organismo. El requerimiento de factores extracelulares para que una célula en cultivo sobreviva, así como la multitud de factores de sobrevivencia descritos a la fecha, establece la propensión de las células a activar su maquinaria de muerte. Aún más, resulta llamativo que los componentes de esta maquinaria, necesarios para desencadenar la MCP, estén siempre presentes en la mayoría de las células, de tal forma que la síntesis de proteínas no es un requerimiento para que la apoptosis ocurra. No obstante, y como se describió a lo largo del capítulo, la transcripción de componentes de la maquinaria de muerte se encuentra regulada, ya sea de manera tejida específica como en el caso de *Nedd2*, o en respuesta a estímulos específicos como sucede con *Ice* en la ausencia de componentes de la matriz extracelular. Además, la expresión de un número importante de genes de la maquinaria de muerte, como los de las familias *Ced-3/Ice* (e.g. *Ich1*, *Nedd2*), *Ced-9/Bcl2* (*Bcl-x*), se encuentra modulada por un proceso decisivo para su función: el empalme alternativo. Este empalme alternativo da lugar a proteínas tan distintas que funcionan ya sea como promotores, o como bloqueadores de la MCP. Así entonces, si bien experimentalmente todas las células activan la apoptosis en ausencia de síntesis de proteínas, es probable que la regulación de la expresión de los genes que codifican para los componentes de la maquinaria sea determinante.

La identificación de los componentes moleculares de la maquinaria de muerte ha llevado a la indudable conclusión de que ésta se ha originado en una etapa temprana de la evolución de los organismos multicelulares y que sus blancos son aún más antiguos, como pudiera concluirse de la clara actividad de los miembros de los principales componentes de la maquinaria de muerte en levadura. No obstante, esta maquinaria ha aumentado en complejidad conforme el organismo se encuentra más arriba en la escala evolutiva. Por ejemplo, en *C. elegans* sólo se ha identificado una caspasa (CED3), mientras que en *Drosophila melanogaster* se han reportado por lo menos dos, y en los mamíferos existe un arsenal de caspasas capaces de transmitir la señal de muerte; un comportamiento similar se observa en la evolución de los miembros de la familia de *Ced-9/Bcl-2*. Este incremento en diversidad puede asociarse a una actividad conjunta entre los miembros de una misma familia, ya sea formando hetero-complejos como es el caso de los miembros de la familia de *Ced9/Bcl-2*, o participando en cascadas de regulación como en el caso de algunas caspasas. Alternativamente, algunos componentes pueden ser específicos de tejido, responsivos a señales muy particulares o redundantes entre ellos.

En contraste al mecanismo de ejecución de la MCP, el mecanismo de activación debiera diferir dependiendo del tipo celular y del activador extracelular, de tal forma que las moléculas responsables estarían conservadas sólo dentro de rutas de transducción comunes. En este sentido resulta interesante que para el gen *Ces-2* de *C. elegans*, regulador negativo de la muerte de las células SMN, exista una molécula homóloga, HLF (hepatic leukemia factor), con una función similar. Una versión mutante de HLF lo convierte en un activador transcripcional más potente que causa que las células se conviertan en malignas, y su presencia hace que células pre-B se vuelvan resistentes a inductores clásicos de muerte como privación de IL-3 e irradiación, sin afectar la proliferación²². Ambas evidencias están de acuerdo con un efecto negativo de HLF sobre la MCP. CES-2 y HLF pertenecen a la subfamilia PAR (proline- and acid-rich) de factores de transcripción que tienen el dominio bZIP (basic leucine-zipper)²³, y puesto que comparten un alto grado de similitud tanto en el dominio básico de unión a DNA como en el cierre de leucina, es posible que tengan una especificidad por la unión a secuencias de DNA casi idénticas. Estas observaciones permiten suponer que por lo menos algunos miembros de la familia de factores transcripcionales CES-2/PAR son reguladores de la MCP conservados en la evolución, que actúan en rutas de transducción comunes o como punto de convergencia de varias rutas de transducción.

A pesar de la cantidad de información que se ha generado en torno a las moléculas que participan en la MCP, aún no se puede establecer con certeza el mecanismo bioquímico por el cual ejercen su efecto. La información actual coloca a las caspasas en el punto central del desencadenamiento de la MCP, las cuales directa o indirectamente debieran tener blancos en distintos compartimentos de la célula. Si bien las caspasas más relevantes, como CPP32, se han encontrado localizadas en el citoplasma, el hecho de que substratos que pudieran ser importantes para la MCP se encuentren en el núcleo sugiere que por lo menos algunas caspasas

tienen acceso a este compartimento; Granzima B pudiera ser un candidato pues se ha logrado detectar en el núcleo. No obstante lo anterior, un nuevo panorama se está elucidando, donde el proceso de MCP se inicia antes de las caspasas, y donde existen rutas alternativas de activación de la MCP que no involucran a las caspasas, las cuales regularmente convergen para desencadenar eficientemente el proceso de muerte celular. Este panorama se desprende del efecto tardío de inhibidores de amplio espectro de las caspasas los cuales bloquean la MCP pero, a diferencia del efecto inhibitorio de BCL-2, lo hacen una vez iniciada la muerte y de manera irreversible. También de acuerdo con este panorama, los miembros de la familia de BCL-2/CED-9 tienen blancos distintos a las caspasas, como pudieran ser los reguladores del estado redox y la calcineurina.

CASCADA DE MUERTE

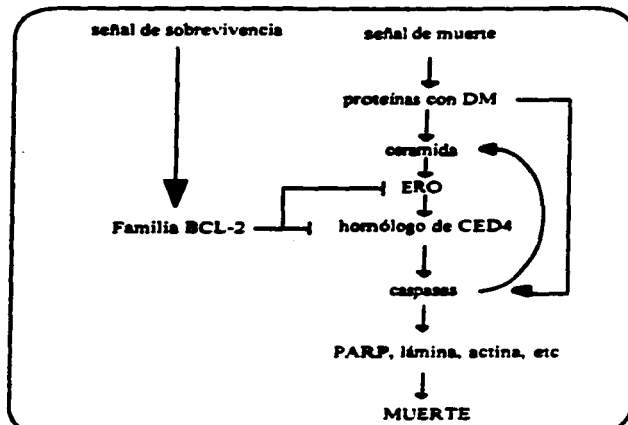


Figura 9. Esquema de la cascada molecular durante la MCP.

En conclusión, la MCP es un proceso complejo que merece ser estudiado no sólo por su relevancia durante el funcionamiento normal de los organismos, sino porque su desregulación favorece el surgimiento de enfermedades como el cáncer o las que involucran degeneración celular. Entender tanto el mecanismo por el cual ocurre la MCP como su regulación, incrementará nuestra comprensión sobre la formación y funcionamiento de los organismos y permitirá diseñar terapias más efectivas que las actuales.

II. JUSTIFICACION

1. Las células embrionarias troncales (ES) de ratón son un buen modelo para estudiar la MCP.

Las células ES se obtienen a partir de blastocistos, etapa de desarrollo en la cual sólo ha habido un evento de diferenciación para generar dos tipos celulares: las células de la masa celular interna y las células del trofoctodermo. Las células de la masa celular interna son pluripotenciales, pues a partir de ellas se formará el individuo como tal, mientras que de las células del trofoctodermo se formarán las estructuras extraembrionarias, como la placenta, etc.

Las líneas celulares ES provienen en particular de la masa celular interna y se pueden mantener en cultivo por tiempos largos en un estado indiferenciado, si se siembran en presencia de una monocapa de células alimentadoras. Si se siembran de esta forma se dividen cada 12 horas y crecen en forma de colonias. Estas células son susceptibles a diversas manipulaciones genéticas, por ejemplo, es posible transfectarlas para sobre-expresar genes, o bien se pueden interrumpir genes por recombinación homóloga y con esas células formar ratones quiméricos, a partir de los cuales se obtienen ratones transgénicos, pues las células ES forman parte de todos los tejidos del ratón, incluyendo la línea germinal²³⁴.

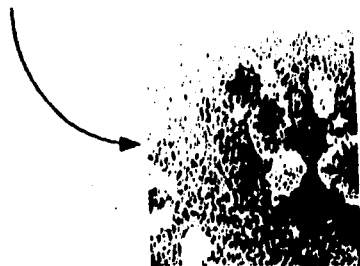
Para inducir la diferenciación, las células se cultivan en suspensión en ausencia de la monocapa de células alimentadoras, permitiendo la formación de agregados. Los agregados en suspensión forman cuerpos embrionarios que recapitulan etapas tempranas del desarrollo semejando aquellas que ocurren alrededor de la implantación, incluyendo la formación del endodermo en la superficie de la masa celular interna, la diferenciación de epitelio columnar y la formación de cavidades. Pueden formar islas sanguíneas donde es posible estudiar la hematopoyesis; eventualmente se forman derivados de mesodermo como músculo cardíaco²³⁵. Para facilitar la observación de los fenotipos diferenciados, los agregados se siembran en cajas de cultivo donde se pueden adherir a la superficie; bajo estas condiciones, las células proliferan y migran hacia afuera del agregado, diferenciando espontáneamente a varios linajes celulares, como el muscular, neuronal, glandular, epitelial, etc. Se ha intentado dirigir el camino de diferenciación de las células generando cuerpos embrionarios en presencia de un inductor de diferenciación, como por ejemplo dimetil sulfóxido para enriquecer la población de células musculares. Anteriormente observamos que la adición de ácido retinóico (AR) a cuerpos embrionarios provoca la muerte de las células, que como se discutirá más adelante, nos permitió estudiar la regulación de la MCP (fig. 1).

La formación de la cavidad en los cuerpos embrionarios ocurre por apoptosis, misma que es inducida por una señal de muerte producida por células del endodermo visceral, de manera similar a lo que ocurre durante el desarrollo embrionario²³⁶. Es de resaltar que durante la etapa de blastocisto también se ha observado MCP por microscopía electrónica y de luz²³⁷, lo que sugiere que los cuerpos embrionarios formados a partir de células ES pueden reflejar procesos de muerte que ocurren durante la blastulación, siendo estos últimos un objeto de estudio más fácil de manipular. Se ha propuesto que la población celular que muere en el blastocisto representa células que aún conservan el potencial de diferenciar hacia trofoctodermo, de manera que su muerte impide la posible formación de estructuras extraembrionarias en el interior del embrión; esto implica que la MCP podría ser uno de los mecanismos que aseguran la homogeneidad del tejido²³⁸. La muerte de las células de la masa celular interna parece estar mediada por peróxido de hidrógeno localizado en el fluido del blastocelo, ya que se evita suministrando catalasa²³⁹. Considerando esta información junto con las evidencias que indican una influencia del estrés oxidativo en la progresión de la apoptosis en diferentes tipos celulares (ver introducción), se planteó la hipótesis de que el papel del estrés oxidativo en la MCP podría ser un evento general. Por lo tanto, se decidió estudiar el mecanismo por el cual el estrés oxidativo podría estar actuando. Es pertinente mencionar que en el momento del inicio del proyecto no estaba claro si el estrés oxidativo formaba parte de la maquinaria de muerte *per se*, o si bien participaba en etapas iniciales como un activador del proceso.

2. El AR podría ser un inductor de MCP.

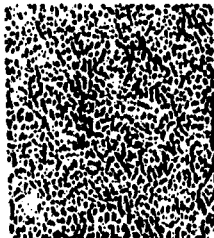
El AR participa en diferentes estadios del desarrollo embrionario, actuando en la formación de los miembros²⁴⁰, y en el desarrollo craneofacial²⁴¹ y del sistema nervioso central²⁴², siendo estos

formación de cuerpos
embrionarios en suspensión

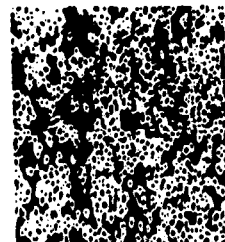


sebrados en caja de
cultivo

Control



AR



FENOTIPO

Figura 1. La presencia de AR durante la formación de cuerpos embrionarios provoca la muerte de las células. La formación de cuerpos embrionarios se realiza cultivando las células en cajas de petri para bacteria, donde no se pueden adherir. Después de 7 días se siembran en cajas para cultivo donde los cuerpos embrionarios se adhieren y las células diferenciadas migran hacia afuera y se facilita la identificación de los fenotipos diferenciados. Se muestra la morfología de células 3 días después de haber sido sembrados los cuerpos embrionarios formados en ausencia (control) o presencia (AR) de ácido retinoico 100 nM.

los procesos más estudiados. Los receptores de AR son una subclase de factores de transcripción inducible por ligando, del tipo de los receptores de esteroides. Tienen regiones de unión específica al DNA, de unión al AR, para dimerizar con otra molécula de receptor, y posiblemente para interactuar con otros factores de transcripción. Hay dos familias de receptores, los RARs y los RXRs, con tres subtipos denominados α , β y γ dentro de cada clase. Es posible que las diferentes respuestas observadas estén mediadas por receptores específicos, pues cada uno presenta un patrón de expresión particular durante el desarrollo. El cultivo de líneas celulares ha sido una fuente considerable de información referente al mecanismo de acción del AR, pues induce la diferenciación de varios tipos celulares. Por ejemplo, células de carcinoma embrionario (EC) pueden diferenciarse hacia endodermo parietal, endodermo visceral, o bien hacia células neuronales, dependiendo de la línea celular, las condiciones de cultivo y las dosis de AR utilizadas. Por otro lado, la línea celular HL-60 diferencia hacia granulocitos en presencia de AR. En estos sistemas se han estudiado los tipos de receptores involucrados, proteínas accesorias que pueden cooperar con los receptores, así como los genes regulados por AR.

El AR también es capaz de inducir apoptosis en células en cultivo, como las líneas celulares HeLa¹⁰⁰⁰ y de origen neuronal^{1001,1002}. La MCP parece estar mediada también por los receptores descritos, pues la inducción de la expresión de RARs en células Jurkat las hace susceptibles a la muerte inducida por AR¹⁰⁰³, además de que mutaciones con efectos dominantes negativos de RARs protegen de muerte, al mismo tiempo que evitan la activación de la transglutaminasa en células epiteliales de la tráquea de rata¹⁰⁰⁴.

Diversas evidencias apoyan la hipótesis de que el AR también induce la MCP *in vivo*. Por un lado, tiene un efecto teratogénico cuando es administrado a madres preñadas. Por ejemplo, durante el desarrollo de las extremidades se generan normalmente zonas de MCP, conocidas como "zonas necróticas", necesarias para el proceso morfogenético. Una de las regiones más estudiadas es la generada en la región de los interdígitos. Se ha demostrado que la presencia de AR produce malformaciones en el embrión debido a un incremento de la muerte en las zonas necróticas¹⁰⁰⁵. Es posible que el receptor RAR β sea el transductor de la señal, pues se expresa justo en la región de los interdígitos; además, el tratamiento con AR induce su expresión ectópica en diversas regiones de la cara, la cual coincide con las regiones donde hubo un incremento de muerte¹⁰⁰⁶. Por otro lado, el AR provoca la muerte de cultivos primarios de explantes de interdígitos¹⁰⁰⁷, sugiriendo fuertemente que ese podría ser su papel biológico. Sin embargo, nada se sabe aún del mecanismo por el cual el AR media la muerte, es decir, que sucede una vez que el receptor se activa, pues se desconocen los genes regulados y si el efecto es activador o represor de la transcripción.

En consecuencia, decidimos caracterizar la muerte causada por AR en las células de cuerpos embrionarios y analizar la participación del estrés oxidativo.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación y el mecanismo de la MCP durante el desarrollo, utilizando las células ES como modelo, ya que este tipo de células reproduce *in vitro* eventos que ocurren durante el desarrollo temprano del ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer dos modelos: uno para estudiar el mecanismo y otro para estudiar la regulación de la MCP.

A) Para estudiar el mecanismo de la MCP:

- 1.- Establecer un sistema de muerte inducida por estrés oxidativo para simular la muerte observada en el blastocisto, utilizando células ES indiferenciadas por representar éstas a las células de la masa celular interna y ser una población homogénea.
- 2.- Analizar si el estrés oxidativo incide sobre la maquinaria de muerte alterando la transcripción de algunos genes implicados en la muerte celular.

B) Para estudiar la regulación de la MCP:

- 1.- Caracterizar la muerte provocada por AR en células ES inducidas a diferenciarse mediante la formación de cuerpos embrionarios.
2. Estudiar el papel del estrés oxidativo en la muerte celular inducida por AR.

III. MATERIAL Y METODOS

1. Transcripción Reversa Asociada a la Reacción de Polimerización en Cadena.

A) Purificación de RNA eliminando completamente al DNA.

Soluciones.

1. Urea 6M/LiCl 3M.

2. Sol. D:

Tiocianato de Guanidina 4M	23.632g	para 50ml
Citrato de Sodio 25mM pH7	1.25ml de stock 1M	
Sarcosil 0.5%	2.5ml de stock 10%	
H ₂ O	28ml	

* Al momento de usar agregar 36 µl 2ME/ 5 ml.

3. Etanol 95%

4. Acetato de Sodio 2M pH4

5. Fenol saturado con H₂O

6. Cloroformo:isoamílico 24:1

7. Isopropanol

8. DNAsa libre de RNAsa

9. Etanol 70%

Procedimiento.

- Lisar las células en sol. urea/LiCl agitando vigorosamente (2×10^6 células/ml sol.).
- Precipitar a -70 °C mínimo 4 horas.
- Centrifugar 10 min a 4 °C, inmediatamente desechar el sobrenadante (donde está el DNA ya que el LiCl precipita preferencialmente el RNA). Con un papel absorbente eliminar el exceso de líquido.
- Resuspender la pastilla en 500ml de sol. D.
- Agregar 150ml (1/3 vol.) de etanol 95% e incubar en hielo 5'.
- Centrifugar 15 min a 4 °C, tirar el sobrenadante. (Esta precipitación rápida elimina DNA ya que requiere de más tiempo que el RNA para precipitar).
- Resuspender en 500ml de sol. D y agregar 50ml (1/10 vol.) de NaAc 2M pH 4; vortex.
- Extraer con 500ml (1 vol) fenol saturado con agua + 100ml (1/5 vol) cloroformo:isoamílico.
- Dejar 15 min en hielo para que se formen las dos fases.
- Centrifugar 20 min en frío.
- Pasar fase acuosa a tubo nuevo y precipitar con 500ml (1 vol.) de isopropanol.
- Incubar 30 min a -20°C. (Tiempos más largos aumentan la contaminación con DNA).
- Centrifugar 20 min a 4°C.
- Resuspender la pastilla en 25ml agua.
- Añadir 1ml de DNAsa libre de RNAsa e incubar 15' a 37 °C. (No es necesario agregar amortiguador para DNAsa, incluso han visto que baja el rendimiento de RNA por actividad remanente de RNAsa en presencia de Mg²⁺)
- Agregar 225ml (10 vol) sol. D (Es suficiente para eliminar completamente la actividad de DNAsa, no es necesario volver a extraer).
- Precipitar con 250ml (1 vol) de isopropanol de 30 min a 1 hora a -20°C.
- Centrifugar 10 min en frío; lavar la pastilla con etanol 70% frío.
- Resuspender en 25ml agua y cuantificar en el espectro 10D₂₆₀=40mg.

B) Transcripción Reversa

Para 50ml de reacción:

x ml RNA (10mg)

1 ml oligodT (1pg/µl)

- calentar 5' a 65°C, mientras mezclar:

10 ml buffer RT 5X

2 ml dNTP's 5mM (200mM final)

2 ml DTT 0.1M (10mM final)

y ml H₂O
0.5ml transcriptasa reversa (BRL 200u/μl)

- Incubar 60 min a 37 °C

C) PCR

Para 50ml de reacción:

x ml H₂O
5 ml de cDNA
5 ml buffer taq 10X
2 ml dNTP's 5mM
y ml oligos (30 pmol de cada uno)
- calentar 3' a 95°C y agregar
0.5ml enzima taq (Boehringer)

Condiciones de amplificación:

1 ciclo: 95 °C 5 min
30 ciclos: 95 °C 30 seg
57 °C 1 min
72 °C 30 seg
1 ciclo: 72 °C 5 min

D) Gel agarosa 3%

- Disolver 1.5g de agarosa en 50ml TBE 0.5X
- Agregar bromuro de etidio a una concentración final de 30 μg/ml antes de vaciar.
- Correr en TBE 0.5X conteniendo bromuro de etidio 30 mg/ml a 260 V.

E) Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

HPRT (fragmento cDNA 344 pb):

oligo H1: 5' CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT 3' (335)
oligo H2: 5' GCT AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA C 3' (361)

bcl-2 (fragmento cDNA 340 pb)

oligo 5': 5' CAT CTT CTC CTT CCA GCC TG 3' (1962)
oligo 3': 5' GTT GAC GCT CTC CAC ACA CA 3' (2281)

bax (fragmento cDNA 300 pb)

oligo 5': 5' GAA CAG ATC ATG AAG ACA GG 3' (59)
oligo 3': 5' GCA AAG TAG AAG AGG GCA AC 3' (332)

p53 (fragmento cDNA 573)

oligo 5': 5' ACG TGC CCT GTG CAG TTG TG 3' (409)
oligo 3': 5' ATA CTC TCC ATC AAG TGG TT 3' (953)

bcl-x (fragmento cDNA bcl-XL 800; bcl-XS 600)

oligo 5': 5' TTG GAC AAT GGA CTG GTT GA 3'
oligo 3': 5' GTA GAG TGG ATG GTC AGT G 3'

ICB (fragmento cDNA 492)

oligo 5': 5' GTT GGA GCT CAA GTT GAC CT 3' (581)
oligo 3': 5' GAC AGG ATG TCT CAA AGA CA 3' (1054)

Nedd 2 (fragmento cDNA 400)

oligo 5': 5' GCG GAA TTC CAG GTC TTT CTC 3'
oligo 3': 5' TGG AAC TCA ACC TGC TGC CA 3'

NrkA (fragmento cDNA 496)

oligo 5': 5' ACC ATG GAC GAT CTG TTT CC 3' (58)
oligo 3': 5' ACT GTC ACC TGG AAG CAG AG 3' (535)

Pes (fragmento cDNA 376 pb; genómico 493)

oligo 5': 5' TGG GCC TAG ATG ATG CCG CA 3' (1908)
oligo 3': 5' AAT CGG AGG AGG GAG CTG AC 3' (2400)

Los números entre paréntesis indican el sitio de inicio del oligonucleótido en la secuencia de cdNA depositada en el GeneBank.

2. Transfección de Células ES por Lipofección.

Medios y Soluciones.

a) Plásmido linealizado

b) M15

c) Tripsina 0.25%

d) PBS

e) Etanol 70%

f) DOTAP (Boehringer)

g) OPTIMEM (DULBECO)

h) G418 (análogo de neomicina) 100X:

- disolver 18 mg de ingrediente activo (cada frasco indica la fracción activa por mg) en 1ml de PBS.
- Esterilizar por filtración.
- Almacenar a 4 °C.

Procedimiento.

A) Preparar conjugado DOTAP:DNA

- 30ml DOTAP
- 5mg DNA
- aforar a 200 ml con OPTIMEM
- incubar 15 min a temperatura ambiente.

- Colectar las células tripsinizando, como si se fueran a subcultivar.
- Centrifugar alícuotas de 10^5 células por tubo.
- Resuspender en 800 ml de OPTIMEM
- Agregar los 200 ml y pasar a un tubo Eppendorf.
- Incubar 4 horas en agitación a 37 °C.
- Cambiar el medio y poner M15 para que se recuperen.
- A las 24 horas agregar M15 con G418 0.18 mg/ml final.

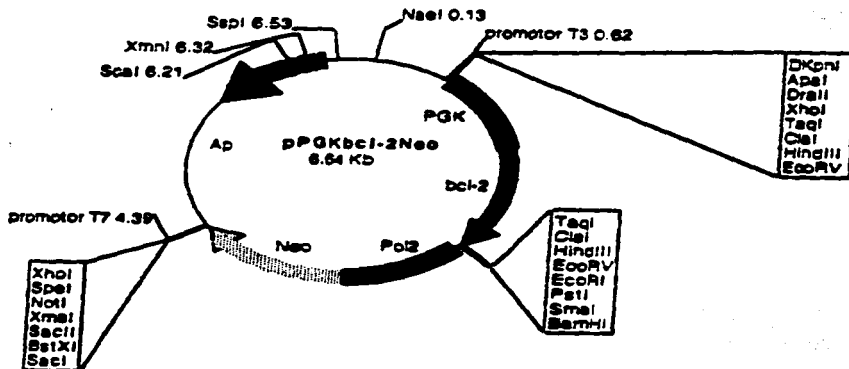
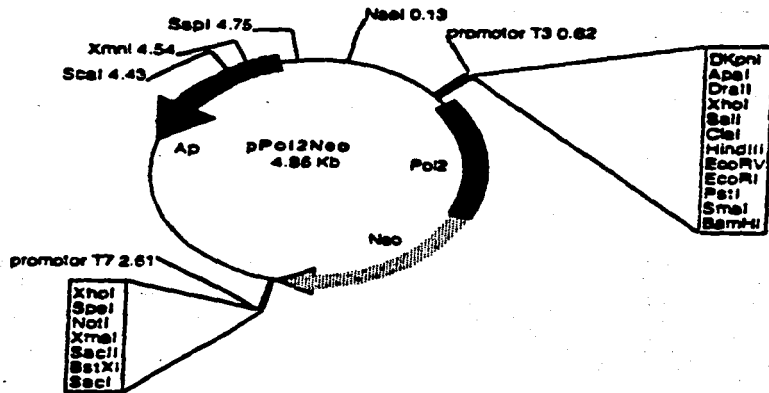
Selección de las colonias recombinantes (día 3-10 u 11)

- Las células con G418 se tardan entre 4 y 5 días en morir. Cambiar el medio conforme se vaya acidificando hasta que desaparezcan los restos celulares y se vean colonias resistentes a G418 a simple vista.

Expansión de las colonias (día 11-12).

- Lavar las cajitas dos veces con PBS; dejar PBS cubriendo las células.
- Poner gotitas de tripsina en la tapa de una caja de 10 cm de diámetro en un arreglo como cajas de 24 pozos:
- Bajo el microscopio tomar cada colonia con una pipeta puesta a un volumen máximo de 10 ml; en ocasiones es necesario despegar mecánicamente la colonia de los bordes. Transferir la colonia a la gotita de tripsina.
- Incubar 10 min -15 min a 37 °C.
- Quitar el medio STO de una caja de 24 pozos con células alimentadoras y poner M15.
- Agregar 20ml de M15 de cada pozo a cada gotita y disgregar la colonia pipeteando.
- Transferir la suspensión de ES a la caja de 24 pozos con células alimentadoras.

3. Mapa de vectores transfectados: Pol2neo y PGKbcl-2Neo



4. Concentraciones usadas para reactivos y enzimas con efectos antioxidantes:

DMSO: 0, 1; 0, 5; 0, 75; 1; 1, 5%
Tirocina: 10; 25; 50; 100; 200 μ M
Catalasa: 1; 5; 25; 50; 100 μ g/ml
NAC: 1, 5; 10; 50; 100; 200; 400 μ M
fenol: 0, 03; 0, 015; 0, 01125; 0, 0075; 0, 005%
GSH: 10; 50; 100; 200 μ M
Cys: 1; 5; 10; 50; 100 μ M

5. Cultivo en Hipoxia

- Sembrar 4 cajas de 3 cm de diámetro a una densidad de 10^5 células/ml de células indiferenciadas en medio M15, durante 12 horas.
 - Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS.
 - Agregar medio M15 a 2 cajas y medio M15 sin 2ME a las otras 2 cajas.
 - Incubar durante 48 horas: una caja con M15 y una caja con M15 sin 2ME en la incubadora con 5% CO_2 , 21% O_2 , a 37 $^{\circ}C$; una caja con M15 y una caja con M15 sin 2ME en una cámara con atmósfera controlada de 95% N_2 , 5% CO_2 , y 21%, 6%, 2% ó 0% de O_2 , a 37 $^{\circ}C$.
- Cuantificar la sobrevivencia como se describe en la publicación 2.

6. Programa PROPSEARCH para buscar proteínas homólogas funcionales.

El programa PROPSEARCH analiza la composición de aminoácidos de las proteínas, ignorando el orden de los residuos en la secuencia. Considera propiedades del tipo de peso molecular, contenido de aminoácidos voluminosos, de aminoácidos pequeños, el promedio de la hidrofobicidad, de la carga, etc. y el contenido de dobles de aminoácidos seleccionados. Son evaluadas 144 propiedades individualmente y se utilizan como un vector de búsqueda. Los pesos para cada propiedad han sido probados usando un algoritmo genético en un grupo de familias de proteínas cuya estructura se conoce. Las secuencias en la base de datos se transforman también a vectores y se calcula la distancia euclidiana entre el vector de búsqueda y las secuencias de la base de datos.

7. Análisis de RNAm por Northern.

A) Gel para RNA.

Soluciones.

1. Buffer MOPS 10X

Para 1 litro:

41,86 gr MOPS

4,1 gr NaAc

20 ml EDTA 0,5M

- Ajustar el pH con NaOH

2. Buffer de carga.

100 μ l H_2O

750 μ l formamida

150 μ l MOPS 10X

240 μ l formaldehído 37%

100 μ l glicerol

80 μ l azul bromofenol 10%

3. Gel de agarosa.

Para 100 ml:

1 gr agarosa

10 ml MOPS 10X

85 ml H_2O

- fundir la agarosa

5 ml formaldehído 37%

4. Amortiguador de corrida: MOPS 1X

Procedimiento.

- Cargar 1 - 3 µg de RNA poliA o bien de 10 - 30 µg de RNA total; agregar 5 vol de amortiguador de cargada.
- Calentar la muestra 5 min a 65 °C antes de cargar.
- Correr el gel a 5 volt/cm (durante 2 - 3 horas).

B) Transferencia Alcalina.

Soluciones.

1. NaOH 0.05N

2. SSPE 2X.

Stock concentrado 20X:

3.6 M NaCl

0.2 M fosfato de sodio

0.02 M EDTA pH 7.7

Procedimiento.

- Armar el aparato de transferencia poniendo un recipiente con NaOH 0.05 N, colocar un banco plano dentro del recipiente sobre el cual se pone un filtro Watman del ancho exacto del gel, con el largo suficiente para que los extremos se sumerjan en la sosa. Se coloca el gel (con el lado plano hacia arriba) sobre el filtro, se moja en agua un filtro Hybond N+ (Amersham, Buteinhamshim, RU) del tamaño exacto del gel, y se le pone encima. Se colocan 3 hojas de papel Watman 3 también del tamaño exacto del gel, previamente humedecidas en sosa. Rodear con parafilm el área del gel. Se pone una torre de papel absorbente de 4 cm de altura con un ligero peso encima para que la adsorción sea homogénea.
- Transferir durante 4 horas.
- Desmontar y marcar con lápiz los pozos del gel en el filtro.
- Lavar brevemente la membrana con SSPE 2X en agitación.
- Dejar secar y guardar protegido del polvo o proceder con la hibridación.

c) Hibridación.

Soluciones.

1. SSPE 20X

2. Denhardt 100X

BSA 2%

Ficoll 2% (tipo 400 Pharmacia)

Polivinil pirrolidona 2%

3. SDS 10%

4. DNA de espermatozoos de Salmón 1mg/ml sonicado.

5. Solución de hibridación.

Para 25 ml

15 ml formamida [final]

6.25 ml SSPE 20X 50%

1.25 ml Denhardt 100X 5X

1.25 ml SDS 10% 0.5%

Procedimiento.

- Después de calentar 5 min el DNA de espermatozoos de salmón, poner en hielo; agregarlo a la solución de hibridación y pre-hibridar mínimo 1 hora a 42 °C, poniendo el filtro con el lado del RNA hacia la luz del tubo de hibridación. Agregar la sonda ($>10^8$ dpm/µg) previamente hervida 5 min e hibridar mínimo 12 horas.

- Lavar con SSPE 2X, SDS 0.1% a 42°C dos veces a temperatura ambiente 5 min y una vez a 42 °C durante 20 min, con la solución precalentada a 42°C.

- Exponer y revelar.

8. Gel de retardamiento para determinar cambios de afinidad de IRP.

A) Preparación de extractos citoplásmicos.

Soluciones.

1. Solución amortiguadora de lisis.

Para 10 ml.

1 ml HEPES 100 mM (1g/50 ml) pH 7.5
30 μ l MgCl₂ 1M
400 μ l (298 mg) KCl 1M
50 μ l glicerol
100 μ l DTT 100 mM
20 μ l NP40
8.4 ml H₂O

[final]
10 mM
3 mM
40 mM
5%
1 mM
0.2%

2. Solución BioRad para Bradford.

Procedimiento.

- Lisar 2.5x10⁷ células en 200 μ l de buffer de lisis a 4°C, en un tubo eppendorf con homogeneizador.
 - Diluir 3X con solución amortiguadora de lisis para dar una concentración final de proteínas de 0.5mg/ml.
 - Eliminar los núcleos centrifugando a 10,000 g durante 1 min (11,000 rpm en microfuga).
- Conversión de "g" a "rpm":
 $r = 7.3$ cm rotor microfuga eppendorf.

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{g}{1.118 \times 10^{-5} \cdot r(\text{cm})}}$$

- Cuantificar la proteína por Bradford: 800 μ l muestra + 200 μ l reactivo BioRad; incubar 5 min a temperatura ambiente y leer densidad óptica a 595 nm. Estimar la concentración de proteína en los extractos citoplásmicos por medio de una curva estándar de albúmina.
- Almacenar muestras alicuotadas a -80 °C.

B) Síntesis del RNA IRE.

Secuencia de los oligonucleótidos clonados para el templado:

IRE1: 5' GAT CCT GCT TCA ACA GTG CTT GAA CG 3'

IRE2: 5' GAT CCG TTC AAG CAC TGT TGA AGC AG 3'

Para 10 μ l de reacción:

1 μ l H₂O
1 μ l pIRE/SmaI (1 μ g)
1 μ l NTP's 25 mM
1 μ l buffer 10X
5 μ l CTP32 (50 μ Ci; 3000 Ci/mmol)
1 μ l polimerasa T7

- Incubar 1 hora a 40 °C.
- Contar incorporación: 1 μ l reacción + 9 μ l H₂O. Guardar 5 μ l en un tubo limpio y precipitar los otros 5 μ l con isopropanol.
- Centrifugar 15 min a máxima velocidad.
- Resuspender en 5 μ l agua y contar respecto a la fracción no precipitada. En promedio se obtuvo una actividad específica de 1.7x10⁶cpm/ μ g, con una incorporación del 12%.

C) Purificación del fragmento IRE.

- Agregar 10 μ l de UREA 10 M/ azul de bromofenol a la reacción de síntesis.
- Correr un gel de acrilamida al 20%/ UREA 8 M.
- Correr a 400 voltz una hora aprox.
- Cortar la banda por "sombra de luz uv".
- Eluir en agua 12 horas a 37°C.
- Precipitar con butanol.

- Resuspender en 100 μ l H₂O libre de RNAsas.
- Extraer con fenol: fenol/cloroformo; cloroformo.
- Precipitar con etanol.
- Resuspender en H₂O libre de RNAsas a una concentración 1 nmol/ μ l (26.4 ng/ μ l).

D) Ensayo de unión: gel de retardamiento.

Soluciones.

1. Amortiguador de lisis.
2. Inhibidor de RNAsas (i.e. RNAsin)
3. Heparina 50 mg/ml
4. Amortiguador de corrida: glicerol 10%, azul de bromofenol.
5. Acrilamida 30%:

Para 200 ml

56 gr acrilamida
2 gr metil bisacrilamida
120 ml H₂O

- disolver a 37°C.
- aforar a 200 ml.
- filtrar 0.45 μ
- pH menor a 7.
- 6. Buffer tris boratos 10X (Tris Boratos 9 M; EDTA 0.2 M pH 8)
- 7. MgCl₂ 1M.
- 8. Buffer de corrida.

Para 200 ml.

20 ml TBE 10X
200 μ l MgCl₂ 1 M
180 ml H₂O

Procedimiento.

- Preparar gel acrilamida 6% (20 ml):
 - 4 ml acrilamida 30%
 - 2 ml TBE 10X
 - 20 μ l MgCl₂ 1 M (1 mM final)
 - 14 ml H₂O
 - 10 μ l TEMED
 - 100 μ l persulfato de amonio
- Incubar 30 min a temperatura ambiente la reacción de 20 μ l:
 - 10 μ l extracto citoplásmico (2.5 - 25 μ g proteína)
 - 1.5 μ l RNA IRE (1.5 fmol)
 - 1 μ l inhibidor RNAsas
 - 7.5 μ l amortiguador de lisis
- Agregar 2 μ l de heparina e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Agregar 2 μ l de buffer de cargada y correr el gel a 150 voltz durante 90 min en el cuarto frío.
- Secar el gel en papel DE81 y exponer.

V. RESULTADOS

A) Estudio del mecanismo de MCP.

Para contar con un modelo para estudiar la MCP en las células ES, se analizó el posible efecto en la sobrevivencia del agente reductor 2-mercaptoetanol (2ME). El 2ME es un aditivo común en el medio de cultivo utilizado para estas células, debido a que había evidencias sugiriendo que el estrés oxidativo podría jugar un papel importante en la MCP. Para esto, se cultivaron las células en presencia o ausencia de 2ME y se cuantificó la proporción de células vivas mediante el análisis de la exclusión de azul de tripano. Como se puede ver en la fig. 2, en ausencia de 2ME las células mueren en un lapso de 48-72 h y no se forman colonias, a pesar de la presencia de 15% suero (fig. 3A y 3B).

Estos resultados sugieren que las células ES no necesitan factores de sobrevivencia presentes en el suero, sino que es suficiente el efecto protector del 2ME. Para probar esto, se cultivaron las células en el medio definido F12 en presencia o ausencia de 2ME y/o suero. En las figuras 2 y 3C-E se muestra que la presencia de 2ME permitió la formación de colonias, mientras que la presencia de suero no.

Puesto que la privación de 2ME del medio de cultivo provocó la muerte celular, la hipótesis de trabajo fue considerar a las células ES en estrés oxidativo constitutivo, lo cual podría mantener activa la maquinaria de muerte. Esta cualidad nos permitiría estudiar cómo el estrés oxidativo podría participar en el proceso de muerte.

1. La ausencia de 2ME provoca muerte apoptótica en las células ES.

Para confirmar que efectivamente la muerte observada al retirar el 2ME es apoptótica, se buscaron características típicas de este proceso de muerte, como la fragmentación del núcleo y la degradación internucleosomal del DNA. Se tiñieron las células con DAPI y se observó bajo el microscopio de fluorescencia que los núcleos se encontraban fragmentados como ocurre durante la apoptosis (dato no mostrado). Se analizó el estado del DNA genómico por medio de electroforesis y las células cultivadas en ausencia de 2ME presentaron el patrón de bandeo en escalera característico de la apoptosis (fig. 2, publicación 2). En conclusión, la muerte de las células ES que se desencadena con el simple evento de remover el 2ME es apoptótica.

En algunos tipos celulares la MCP requiere de la activación de genes específicos, por lo que la muerte se evita en presencia de inhibidores de transcripción o traducción. Para saber si la muerte observada en nuestro sistema también depende de la activación de genes, se agregaron diferentes dosis de Actinomicina D1 o Cicloheximida a los cultivos. Sin embargo, no fue posible concluir si la progresión de la muerte depende de la síntesis de RNAm o proteínas, ya que las células mueren por apoptosis (se observó degradación internucleosomal del DNA) a concentraciones de estos compuestos de incluso 1ng/ml incluso en presencia de 2ME (fig. 4). Cabe mencionar que comúnmente se utilizan dosis en el rango de mg/ml de ambas drogas, provocando la detención del ciclo celular en otros tipos celulares.

2. La expresión de *Bcl-2* no previno la muerte por ausencia de 2ME.

Puesto que había reportes sugiriendo que el mecanismo bioquímico por el cual la proteína BCL-2 evita la muerte es mediante la activación de una vía antioxidante, resultó interesante estudiar el nivel de expresión de *Bcl-2* en las células ES, ya que si éstas se encontraran realmente en un estado pro-oxidante como lo sugería el requerimiento de 2ME para sobrevivir, BCL-2 podría estar ausente. Se analizó la expresión de *Bcl-2* por medio de RT-PCR y acorde a lo esperado, no se detectó RNAm en ausencia o presencia de 2ME (fig. 5), si bien podría haber expresión de otros miembros de la familia, como se muestra más adelante.

Si efectivamente BCL-2 activa una vía antioxidante, era de esperarse que al sobre-expresar *Bcl-2* las células se volvieran independientes del 2ME. Para probar esto, se construyó un vector para transfectar *Bcl-2* bajo el control del promotor PGK (phosphoglycerate kinase-1), un promotor fuerte y constitutivo en las células ES. Debido a que la eficiencia de selección fue menor del 10%, fue necesario seleccionar colonias recombinantes estables, para lo cual se introdujo en el vector un cassette que confiere resistencia a neomicina (mapa en material y métodos). Se expandieron 36 clones independientes y se cuantificó la sobrevivencia en ausencia de 2ME. Se obtuvo sólo una clona que obtuvo una protección poco significativa; se probó la habilidad protectora en ausencia de suero (donde se sabe que BCL-2 sí protege) y se observó una protección mayor (fig. 6). Se confirmó por RT-PCR que el transgene *Bcl-2* se

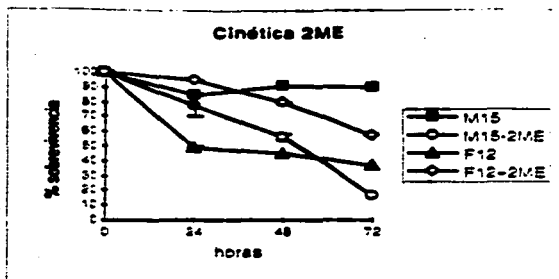


Figura 2. La presencia de 2ME es necesaria y suficiente para sobrevivir. Las células se cultivaron en presencia del medio de cultivo indicado y se cuantificó la sobrevivencia mediante la técnica de exclusión de tripano a los tiempos señalados. M15, 15% suero + 200uM 2ME; M15-2ME, 15% suero; F12, medio mínimo; F12-2ME, medio mínimo + 200uM 2ME. Se grafica un experimento representativo realizado por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

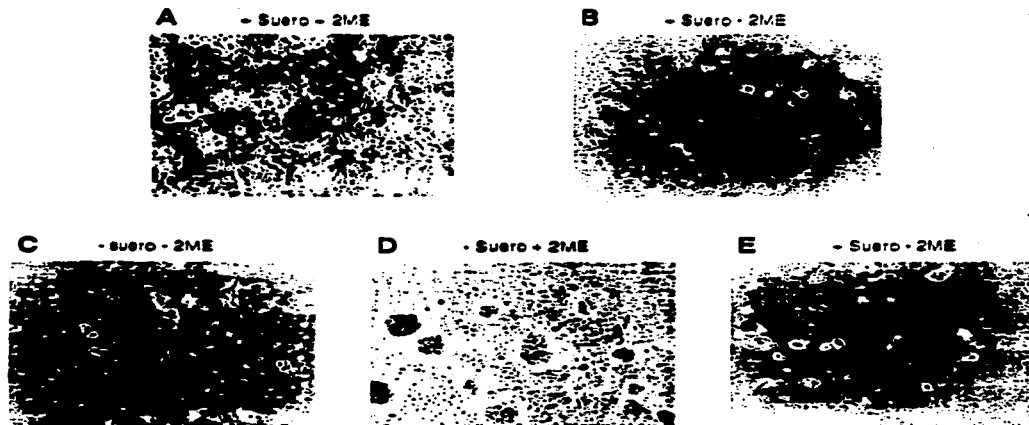


Figura 3. La presencia de 2ME es indispensable para sobrevivir y suficiente para la formación de colonias. A, células cultivadas en medio M15 que contiene suero y 2ME; B, células cultivadas en medio M15 sin 2ME; C, células cultivadas en el medio definido F12; D, células cultivadas en medio F12 suplementado con 2ME; E, células cultivadas en medio F12 suplementado con suero. Amplificación 20x.

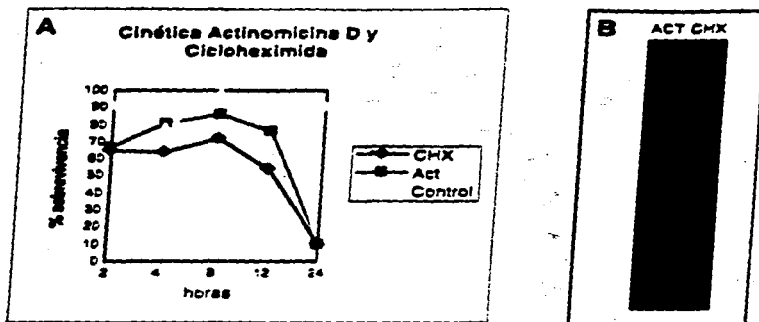


Figura 4. La inhibición de la síntesis de RNAm o proteínas induce apoptosis en las células ES. A, cinética de la muerte provocada por la presencia de 1ng/ml de cicloheximida (CHM) o 1ng/ml de actinomicina D1 (Act). Se cuantificó la sobrevivencia a los tiempos indicados. Se presenta el promedio de 2 experimentos independientes. B, Degradación internucleosomal del DNA de células muriendo por la presencia de cicloheximida (CHX) o de actinomicina D1 (Act) durante 24 horas.

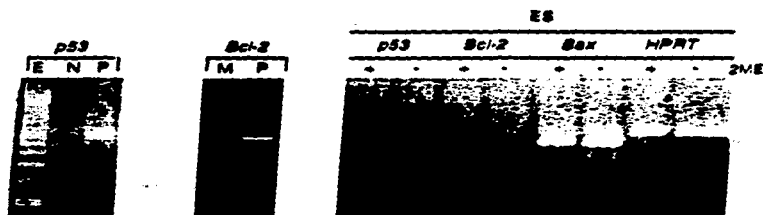


Figura 5. Las células ES no expresan niveles detectables de *Bcl-2* y *p53*, pero transcriben altos niveles de *Bax*; dicho patrón no cambia durante la muerte causada por ausencia de 2ME. RT-PCR de células cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de 2ME durante 48 horas. Se hizo un PCR del RNA de cada muestra para comprobar que no hay contaminación de DNA genómico. E, escalera de 100 pb; N, control negativo; P, DNAC de cerebro como control positivo. M, pBR322/HinfI.

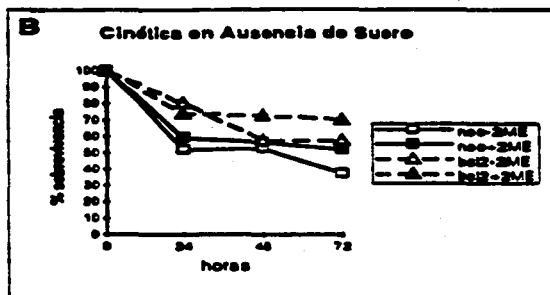
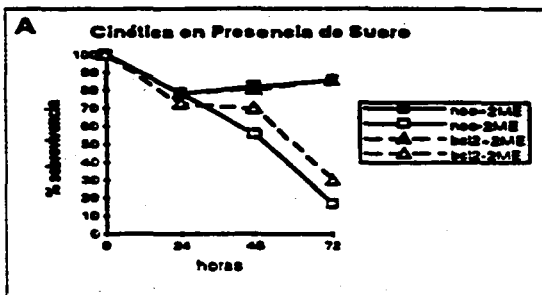


Figura 6. Protección parcial por la expresión de *Bcl-2*. A, las células fueron cultivadas en medio M15 que contiene 15% suero, con o sin 2ME. B, las células fueron cultivadas en el medio definido F12, con o sin 2ME. *Bcl-2*, única clona transfectada con el vector *bcl-2/neo* que presentó una protección parcial en la ausencia de suero o 2ME. *neo*, clona transfectada con el vector *neo*. La sobrevivencia se cuantificó por exclusión de tripano a los tiempos indicados. La clona *bcl-2* que se analizó corresponde a la clona 1 de la figura 7.

expresaba en la mayoría de las clonas (fig. 7), pero puesto que por Northern no fue posible detectar el transcrito (dato no mostrado), los niveles de expresión parecen ser muy bajos. Es posible, entonces, que el incremento parcial en la sobrevivencia presentado se deba a una variación de la clona particular y no necesariamente a consecuencia de la producción de BCL-2. En un intento por seleccionar aquellas clonas que tuvieran niveles de expresión de *Bcl-2* más altos, en lugar de seleccionar las clonas resistentes a neomicina, se seleccionó creciendo a las células en diferentes concentraciones de 2ME. En ningún caso fue posible obtener alguna clona independiente de 2ME. Se intentó rescatar a las células creciéndolas 2 días sin selección y luego retirando el 2ME, pero todas las células se murieron con la misma cinética que células transfectadas con el vector sin *Bcl-2*.

En conclusión, no fue posible obtener clonas que expresaran altos niveles de *Bcl-2* y fueran en consecuencia independientes de 2ME. Recientemente se ha descrito que BCL-2 puede ser pro-oxidante e incluso pro-apoptótico en ciertas condiciones¹⁰⁰. Más adelante se discute la posibilidad de que altos niveles de BCL-2 resulten tóxicos para las células ES.

3. El patrón de expresión de algunos genes de muerte no cambia durante la MCP de las ES.

Puesto que dentro de la hipótesis de trabajo habíamos propuesto que las células ES tienen la maquinaria de muerte activa, y considerando la ausencia de BCL-2, era de esperarse que las células expresaran *Bax*, la única proteína descrita en ese momento capaz de provocar la muerte al ser sobre-expresada. Acorde a lo esperado, por RT-PCR (fig. 5) y Northern (dato no mostrado) se encontró transcripción abundante de *Bax*.

Sin embargo, posteriormente se describieron nuevos genes de muerte y surgió la posibilidad de que expresaran algún homólogo de *Bcl-2*. Se diseñaron oligos para analizar por RT-PCR el patrón de expresión de *Bcl-x_L* y *Bcl-x_s*, así como de los genes de las proteasas *ICE* y *Nedd2*. En la fig. 8 se puede ver que las células ES expresan *bcl-x_L*, quien tiene una función biológica equivalente a *Bcl-2*, pero no expresan *Bcl-x_s*, quien actúa de manera análoga a *Bax*. Si bien podría parecer que estos datos debilitan la hipótesis de que las células ES tengan encendida la maquinaria de muerte, pues la carencia de BCL-2 puede ser sustituida por BCL-X_L y BCL-X_L y BAX heterodimerizan, existe la posibilidad de que los niveles de BAX sean demasiado altos como para que su función sea contrarrestada por BCL-X_L. No se detectó expresión de *ICE* pero sí de *Nedd2*, aunque no se puede concluir que la proteasa esté activa pues ahora se sabe que se regula a nivel postraduccional. Aunque podría haber una diferencia en los niveles de transcripción de *Bcl-x_L*, en los demás genes no parece haber regulación por la presencia o ausencia de 2ME.

Como se mencionó en la introducción, la expresión de p53 está asociada a la progresión de la muerte en diversos sistemas; además, diferentes condiciones que inducen su actividad son pro-oxidantes, como las radiaciones o las drogas que dañan el DNA, lo que nos permitió suponer que la activación de p53 podría estar mediada por estrés oxidativo y participar en la MCP de nuestro sistema. Por lo tanto, se analizó si la expresión de p53 se activa durante la muerte inducida por ausencia de 2ME. En la fig. 5 se demuestra que las células ES no expresan p53 ni se induce en ausencia de 2ME, descartando la participación de p53 en este tipo de muerte.

Considerando el cambio sutil en los niveles de BCL-X_L durante la muerte, consideramos que un posible mecanismo por el cual el estrés oxidativo desencadena la muerte podría ser mediante la regulación transcripcional de algunos genes de muerte, pues se ha observado que la afinidad por el DNA de algunos factores de transcripción, como FOS y NFκB, se modula de acuerdo al estado redox de la proteína. Incluso la transcripción de los mismos factores se induce por estrés oxidativo¹⁰¹. Puesto que ambos genes se expresan en condiciones de muerte en diferentes tipos celulares, resultaba sugerente que fueran ellos los blancos sensores del incremento en ROS y en consecuencia modularan la transcripción de genes de la maquinaria de muerte, tales como las familias *Bcl-2* y *ICE*.

Para analizar esta hipótesis, se comparó por RT-PCR el patrón de expresión de *Fos* y *NFκB* en presencia o ausencia de 2ME. En ningún caso se encontró alguna diferencia en los niveles de expresión e incluso el RNAm de *Fos* fue apenas detectable (fig. 8). Para confirmar o descartar definitivamente una posible regulación transcripcional de los genes de muerte por estrés oxidativo, se analizó por RT-PCR la expresión de los genes *Bax*, *Bcl-x*, *Nedd2* y *ICE*

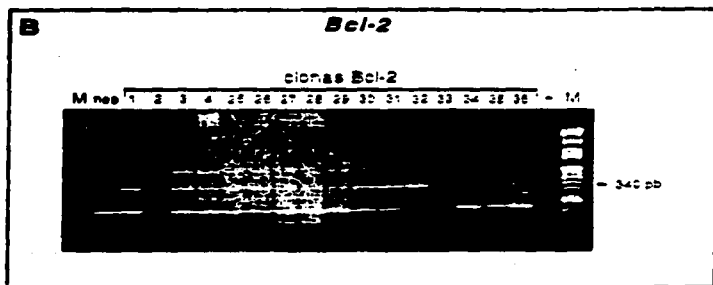
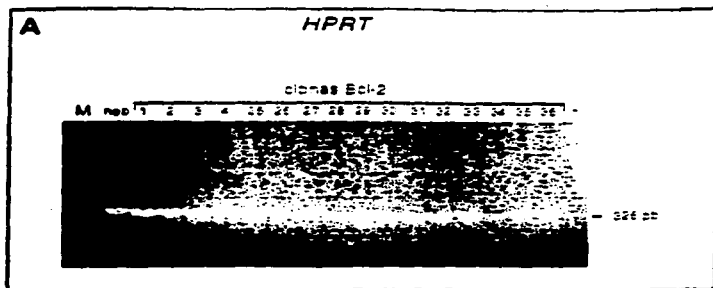


Figura 7. RT-PCR para detectar la transcripción del transgene *Bcl-2* en clones transfectados con el vector *Bcl-2*/neo. — A, amplificación del gene constitutivo *HPRT* como control de calidad del cDNA. B, amplificación de *Bcl-2*. M, marcador M (Boehringer, neo), clona transfectada con el vector neo. -, control negativo. Se presentan clones representativas.

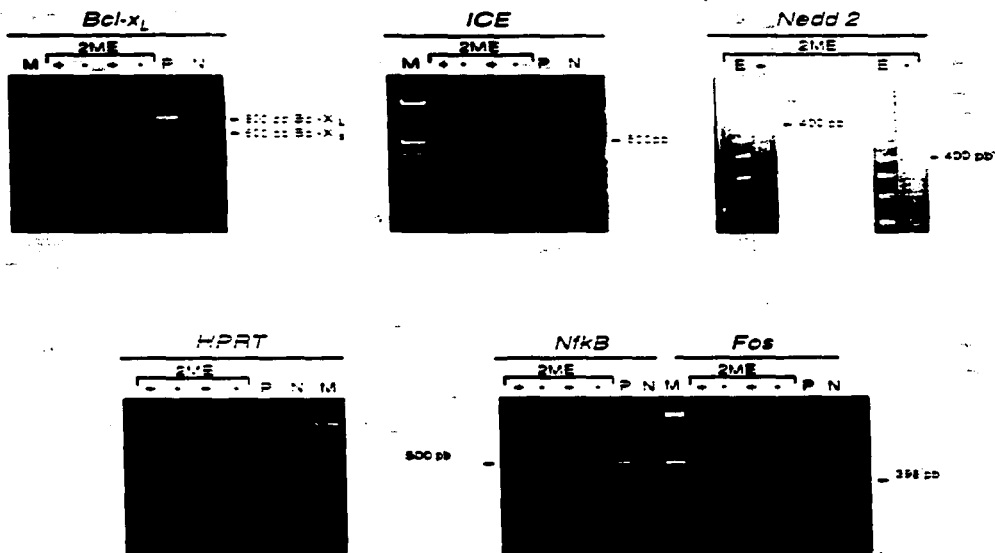


Figura 8. El patrón de expresión de los genes *Bcl-x_L*, *ICE*, *Nedd2*, *Nfkb* y *Fos* no se altera durante la muerte provocada por la ausencia de 2ME. RT-PCR de células cultivadas en presencia o ausencia de 2ME durante 48 horas. En todas las muestras se hizo un PCR del RNA antes de la síntesis del cDNA, para comprobar que no hay contaminación de DNA genómico. M, pBR322 digerido con *Hpa*I; E, escalera de 100 pb; P, cDNA de cerebro como control positivo; N, control negativo. Se indica el tamaño esperado del producto de amplificación.

en fibroblastos inducidos a estrés oxidativo mediante la adición de 200mM de peróxido de hidrógeno; bajo estas condiciones los fibroblastos mueren. De manera sorpresiva, resultó haber una activación del gene protector *Bcl-X_L* y una represión de la transcripción de *ICE*, molécula promotora de muerte, en presencia del peróxido de hidrógeno (fig. 9). Una posible explicación es que lo observado sea un reflejo de la activación de la maquinaria de defensa de la célula, pues se ha propuesto que Bcl-2 protege generando un estado pro-oxidante moderado, que a su vez activa una respuesta de defensa (discutido más adelante).

En resumen, aunque no se detectó cambio en los niveles de transcripción de los genes analizados en respuesta a la ausencia de 2ME, resulta interesante la posible regulación transcripcional de *Bcl-X_L* y *ICE* por estrés oxidativo en fibroblastos. Por otro lado, queda la posibilidad de que exista una regulación redox a nivel postraducciona.

4. Es posible que el mecanismo de protección de 2ME no involucre la prevención de estrés oxidativo general.

Para analizar si el efecto protector del 2ME se debe a su caracter reductor, se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

a) Otros antioxidantes no sustituyen el papel protector del 2ME.

Para saber si el efecto del 2ME en la sobrevivencia celular se debe a su caracter reductor, se intentó remplazarlo por diferentes agentes reductores, tanto biológicos como no biológicos, permeables o impermeables a las células. Para los 7 antioxidantes analizados se hizo una curva de concentraciones considerando los equivalentes reductores de las molécula comparables y se cuantificó la sobrevivencia por exclusión de tripano a las 24 h, 48 h y 72 h. Ningún antioxidante utilizado fue capaz de sustituir el efecto protector del 2ME, en la tabla 1 se presentan los resultados representativos de cada antioxidante a las 72 h.

Agente Antioxidante	Agente Biológico	Agente Permeable	% sobrevivencia
con 2ME (200 mM)	no	si	95
sin 2ME	no	si	38
GSH (200 mM)	si	no	30
Catalasa (1 mM)	si	no	30
Tirosina (200 mM)	si	si	30
Cisteína (100 mM)	si	si	35
DTT (5 mM)	no	si	2
NAC (10 mM)	no	si	24
Fenol (0.0075%)	no	si	39

Tabla 1. Porcentaje de sobrevivencia a las 72 horas de cultivo en presencia de los antioxidantes indicados. *, máxima dosis utilizada; **, mínima dosis que resultó tóxica. Se presenta el promedio de dos experimentos independientes.

Algunos antioxidantes no sólo no protegieron, sino que aceleraron la muerte de las células (DTT y NAC). El caso de NAC resulta interesante, pues se ha observado que esta molécula tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación, provocando que la célula se detenga en la fase G1 del ciclo celular. Por lo tanto, es posible que la muerte se deba a un efecto sobre el ciclo celular, más que a una actividad reductora.

b) En ausencia de 2ME hay mayor cantidad de radicales libres.

El hecho de no encontrar un antioxidante capaz de sustituir al 2ME puede deberse a que no se haya utilizado alguno que tenga el mismo acceso a la célula o que reaccione con el mismo tipo de ERO. Para confirmar que la presencia de 2ME disminuye el estrés oxidativo en las células, se cuantificó la cantidad de ERO en presencia o ausencia de 2ME, utilizando el reactivo diacetato de dihidro-diclorofluoresceína (DH-DCF-DA). Este compuesto es permeable y dentro de la célula esterases separan el diacetato, liberando al DH-DCF; éste al reaccionar con ERO se oxida generando al DCF, mismo que fluoresce al ser excitado. Como se puede ver en la fig. 3A de la publicación 2, efectivamente en ausencia de 2ME hay una concentración mayor de ERO.

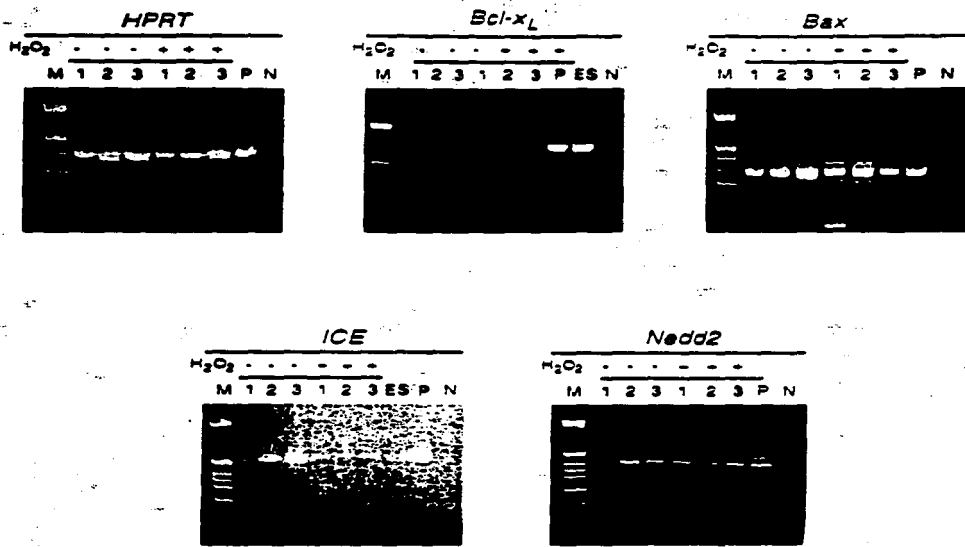


Figura 9. La expresión de *Bcl-X_L* y *ICE* podría regularse por estrés oxidativo en fibroblastos. RT-PCR de fibroblastos STO incubados en presencia (-) o ausencia (+) de 200 μ M de H₂O₂, durante 1, 2 ó 3 días según se indica con números. M, pBR322 digerido con HinfI; P, cDNA de cerebro como control positivo; ES, cDNA de ES como control positivo; N, control negativo.

c) El cultivo en hipoxia de las células ES no disminuye la dependencia del 2ME. Resultaba desconcertante encontrar que en ausencia de 2ME los niveles de ERO fueran mayores, y que ningún antioxidante probado hubiera prevenido la muerte. Para saber si efectivamente la muerte provocada por la ausencia de 2ME esta mediada por ERO, se cultivaron las células bajo una atmósfera controlada para manipular la concentración de O₂. En colaboración con Edith Igarada del laboratorio del Dr. Tonathiu Ramírez (IBT, UNAM), se comparó la cinética de muerte de cultivos realizados a diferentes concentraciones de O₂, en presencia o ausencia de 2ME. Como se puede ver en la tabla 2, la proporción de muerte no disminuyó conforme fue bajando la concentración de O₂.

[O ₂]	% Sobrevivencia 48 horas	
	con 2ME	sin 2ME
21%	89%	56%
6%	84%	58%
2%	80%	52%
0%	10%	7%

Tabla 2. La disminución de O₂ no aumenta el porcentaje de sobrevivencia. Las células fueron cultivadas en las concentraciones de oxígeno indicadas y 48 horas después se cuantificó la sobrevivencia. Se presentan los datos de un experimento representativo.

En conclusión, parece que el estrés oxidativo general no es la causa de la muerte observada al retirar el 2ME. En cambio, pudiera ser que el blanco reducido por el 2ME fuese una molécula específica, tal vez no relacionada a ERO. Esta hipótesis también explicaría porque ningún otro antioxidante pudo sustituir al 2ME.

5. El GSH no participa en la sobrevivencia, sino estimula la proliferación. De entre los efectos descritos del 2ME en la célula, resultó interesante el incremento que provoca en la biosíntesis de glutatión reducido (GSH)^{red}, ya que facilita la importación de cisteína al citoplasma, la cual es un precursor de GSH^{red} (figura 10).

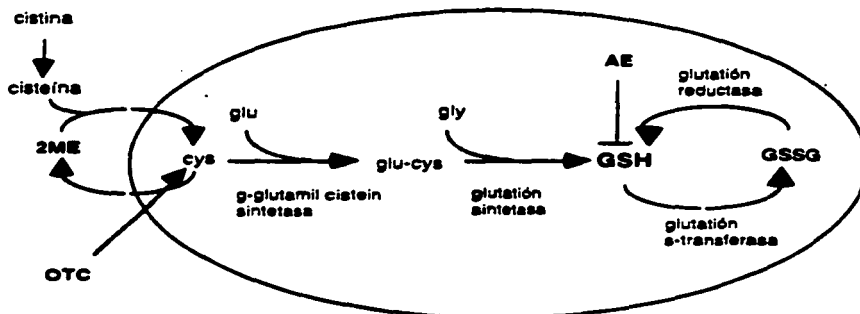


Figura 10. Esquema del mecanismo de inducción de la biosíntesis de GSH por el 2ME. El ácido etacrínico (AE) depleta el GSH, mientras que el ácido 2-oxo-

4-thiazolidino carboxílico (OTC) induce su biosíntesis por ser análogo de cisteína.

Consideramos, entonces, la posibilidad de que el 2ME estimulara la sobrevivencia de las células ES al incrementar la concentración de GSH intracelular. Esto resultaba interesante pues se había demostrado que la presencia de BCL-2 correlaciona con un aumento de GSH, e incluso que si se depleta éste las células mueren²².

Para saber si la sobrevivencia de las células ES se relaciona con un aumento en la concentración de GSH, se manipularon los niveles de GSH intracelular. Por un lado, se cultivaron las células en presencia de diferentes concentraciones de ácido etacrínico (AE), que depleta el GSH tanto citoplásmico como mitocondrial. Como se puede ver en la figura 11, si bien hubo una disminución en la cantidad de células a lo largo del cultivo, el porcentaje de células vivas no cambió a concentraciones de 200µM o menores. Concentraciones mayores resultaron tóxicas. Estos resultados indican que el GSH puede tener un efecto proliferativo, como se ha observado en otros sistemas²², pero su presencia no es indispensable para la sobrevivencia de las células ES. De manera complementaria, se pretendió sustituir al 2ME por análogos de cisteína como el ácido 2-oxo-4-thiazolidino-carboxílico (OTC), ya que la adición directa de GSH no tiene efecto debido a su falta de permeabilidad (tabla 1). Se cultivaron las células en presencia de OTC y en ausencia de 2ME, pero no se incrementó el porcentaje de sobrevivencia (fig 12). La adición de cisteína tampoco estimuló la sobrevivencia celular (tabla 1). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto en la sobrevivencia promovido por el 2ME no está relacionado con la biosíntesis de GSH. Sin embargo, hay un efecto claro en la proliferación, dado que el número de células disminuyó al depletar el GSH.

En conclusión, parece que el 2ME afecta dos procesos celulares: la proliferación mediante el incremento de GSH, y la sobrevivencia, mediante la reducción de un blanco desconocido.

6. El hierro pudiera tener un efecto en la sobrevivencia celular.

Con el objeto de buscar la molécula blanco responsable del efecto en la sobrevivencia, se hizo una revisión sobre las proteínas regulables por 2ME. La más interesante resultó ser la "proteína reguladora de hierro" (IRP-1), ya que el metabolismo del hierro está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo, pues además de que el Fe⁺² participa directamente en la generación de radicales hidroxilo al reaccionar con el peróxido (por la reacción de Fenton), las proteínas IRP-1 e IRP-2, moléculas sensoras de los niveles de Fe intracelular, responden también al estrés oxidativo. Además, resultaba posible que las moléculas ejecutoras de muerte fueran sensibles a los niveles de hierro y no directamente a ERO, pues se acababa de demostrar que la progresión de la apoptosis y su prevención por BCL-2 se lleva a cabo aún en condiciones de hipoxia²³.

Como una aproximación para sondear la posibilidad de que el hierro pudiera unirse a moléculas de muerte se predijo la estructura secundaria de BCL2 y BAX (en colaboración con Gabriel del Río (IBT, UNAM)), ya que aún no se conoce su estructura. Se comparó la estructura de diversas proteínas unificadoras de hierro para identificar una firma de unión a hierro (en colaboración con Nina Pastor (Mount Sinai University)) y se encontró como consenso que las histidinas y cisteínas que coordinan el hierro se encuentran siempre en una cara de α -hélices anfipáticas. De la predicción de estructura secundaria se observó que las histidinas y cisteínas presentes en BAX y BCL-2 se encuentran en una α -hélice anfipática, lo cual abre la posibilidad de que unan hierro al momento de dimerizar. Por otro lado, se hizo una comparación de BAX y BCL-2 con el resto de las proteínas depositadas en el "Protein Data Bank" para buscar alguna semejanza con proteínas que unen hierro (en colaboración con Gabriel del Río). Se utilizó el programa PROSEARCH, que compara a las proteínas con base en su composición de aminoácidos en lugar del orden de los mismos, así como 144 parámetros adicionales, entre ellos el peso molecular, el uso de pares de aminoácidos, la presencia de aminoácidos voluminosos o pequeños, el grado de hidrofobicidad, etc. y encuentra semejanzas funcionales o estructurales entre las proteínas, aún cuando tienen un porcentaje de identidad menor al 25%, casos en los que normalmente no se pueden encontrar por medio de alineamientos de secuencias²⁴. Encontramos que Bcl-2 presenta similitud con varias proteínas que unen hierro, como la cadena pequeña de la Hidrogenasa de Ni/Fe Reactiva a Quinona (94% confiabilidad), y algunos

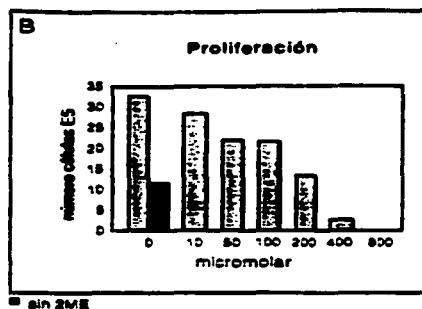
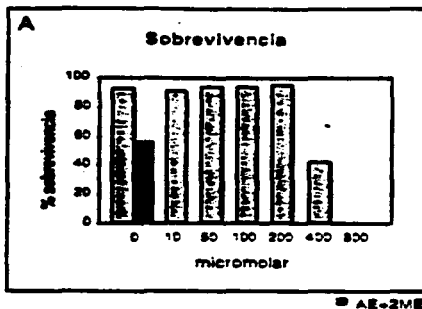


Figura 11. El GSH no participa en la sobrevivencia, sino estimula la proliferación. Las células fueron cultivadas con diferentes concentraciones de AE presencia de 2ME; la sobrevivencia se cuantificó a las 48 horas (A); el número de células es la suma de vivas y muertas (B). Se presenta el promedio de 2 experimentos independientes.

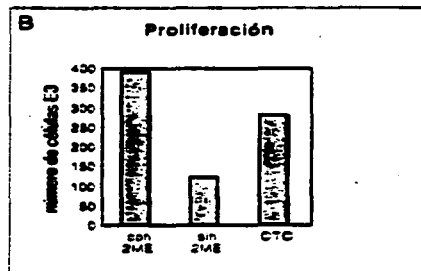
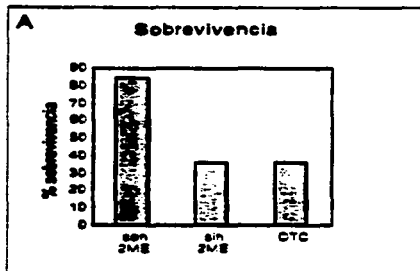


Figura 12. La estimulación de la síntesis de GSH mediante la adición de CTC no es suficiente para prevenir la muerte. Las células se cultivaron con 100 μ M de CTC y 48 horas después se cuantificó la sobrevivencia (A) o el número total de células vivas y muertas (B). Se presenta el promedio de 2 experimentos independientes.

dicromos (87% de confiabilidad). En consecuencia, decidimos estudiar si manipulando los niveles intracelulares de hierro era posible alterar la sobrevivencia celular.

La expresión de proteínas claves en el metabolismo del hierro en vertebrados está controlada por los propios niveles de hierro, mediante interacciones específicas de RNAm/proteína en el citoplasma. Los respectivos RNAs contienen estructuras particulares de "tallo y haza" denominadas Elementos de Regulación por Hierro (IRE), que son reconocidos por las proteínas IRP; dicha interacción controla ya sea la tasa de traducción o la estabilidad del mensajero. Si el IRE se encuentra en el extremo 5', como en el RNAm de la Ferritina, la unión de IRP impide la traducción y en consecuencia disminuye la producción de la proteína. La Ferritina forma jaulas multiméricas en el citoplasma donde queda el hierro, de manera que si baja su concentración aumenta la cantidad de hierro libre. Si el IRE se encuentra en el extremo 3', en cuyo caso hay varias repeticiones del elemento, aumenta la estabilidad del RNAm y se produce más proteína. Tal es el caso del receptor de la transferrina, que participa en la endocitosis de hierro acoplado a transferrina, por lo que un aumento en la cantidad del receptor de la transferrina implica un incremento en la entrada de hierro a la célula. Es decir, que cuando IRP se une a los RNAm hay un incremento neto en la cantidad de hierro libre en el citoplasma. La afinidad de IRP por el RNAm disminuye cuando tiene hierro unido, lo que evita que aumente la concentración de hierro libre indefinidamente. De hecho, la afinidad de IRP por el RNA es tan sensible a los niveles de hierro, que algunos autores utilizan los cambios de afinidad como medida indirecta de la cantidad de hierro en el citoplasma (ver esquema fig. 13).

Para saber si el efecto del 2ME pudiera estar relacionado con un incremento en el hierro intracelular, se agregó transferrina (Tf) a los cultivos celulares en ausencia de 2ME. Como se muestra en la fig. 14, la presencia de 5 mM de Tf es capaz de sustituir el efecto de sobrevivencia del 2ME, promoviendo un 80% de sobrevivencia a las 48 horas. Para descartar la posibilidad de que el efecto se deba a una actividad quelante en vez de a un incremento en la entrada de hierro a la célula, se comparó el efecto en la sobrevivencia de Tf cargada de hierro (holo-Tf) respecto a Tf libre de hierro (apo-Tf) y se confirmó que la sobrevivencia está asociada a la presencia de hierro. Al comparar el número total de células presentes al final del cultivo en presencia de Tf respecto a 2ME, se observó una disminución en la proliferación en presencia de Tf, lo cual sugiere que el efecto de 2ME en la sobrevivencia, tal vez mediado a través de alterar el hierro intracelular, es independiente de su papel proliferativo. En la figura 15 se grafican con fines comparativos los porcentajes de sobrevivencia y el número de células totales obtenidas en presencia de Tf o bien depletando el GSH (con AE) en presencia de 2ME. Puesto que ambos parámetros resultaron semejantes, parece que la presencia de Tf tiene un efecto equivalente al mediado por 2ME, independiente de GSH. La adición directa de Fe^{+2} o Fe^{+3} no tuvo un efecto protector, apoyando la hipótesis de que el hierro intracelular es el que participa en la sobrevivencia, ya que el Fe per se no entra a la célula, sino que requiere ser transportado, siendo el receptor de la Tf el principal importador de Fe (fig. 16). La toxicidad del hierro observada en ausencia de 2ME puede deberse a la generación de estrés oxidativo provocado por la reacción de Fenton en el medio de cultivo, que el 2ME neutraliza.

Si en realidad las células requieren de una incorporación de hierro para vivir, la adición de quelantes de hierro intracelular, debería resultar letal. Para probar esta hipótesis se cultivaron las células en presencia de diferentes cantidades de Desferal, un quelante permeable específico para Fe^{+3} . En la fig. 17A se observa un incremento en la muerte celular conforme aumenta la concentración de Desferal. Como era de esperarse, la adición del quelante en presencia de Tf bloquea el efecto protector de esta última. Resulta interesante resaltar que el hierro libre intracelular es el importante para la sobrevivencia, ya que la adición del quelante impermeable Ferrozina no resulta tóxico para las células, utilizado a concentraciones comparables con el Desferal (fig 17B).

Para saber si el efecto en la sobrevivencia es exclusivo del hierro, se comparó la respuesta a Neocuproina, un quelante específico para Cu^{+2} , y Phenantrotriona, un quelante de Fe^{+2} y Cu^{+2} . En la fig. 18 se muestra la toxicidad de ambos quelantes, puesto que los dos son permeables, estos resultados sugieren que la participación de estos metales en la sobrevivencia es intracelular.

Con el objetivo de comprobar que la presencia de 2ME favorece un incremento de hierro libre intracelular, se intentó cuantificar directamente la concentración de Fe en el citoplasma por un método espectrofotométrico, pero la sensibilidad de tal metodología no fue suficiente para

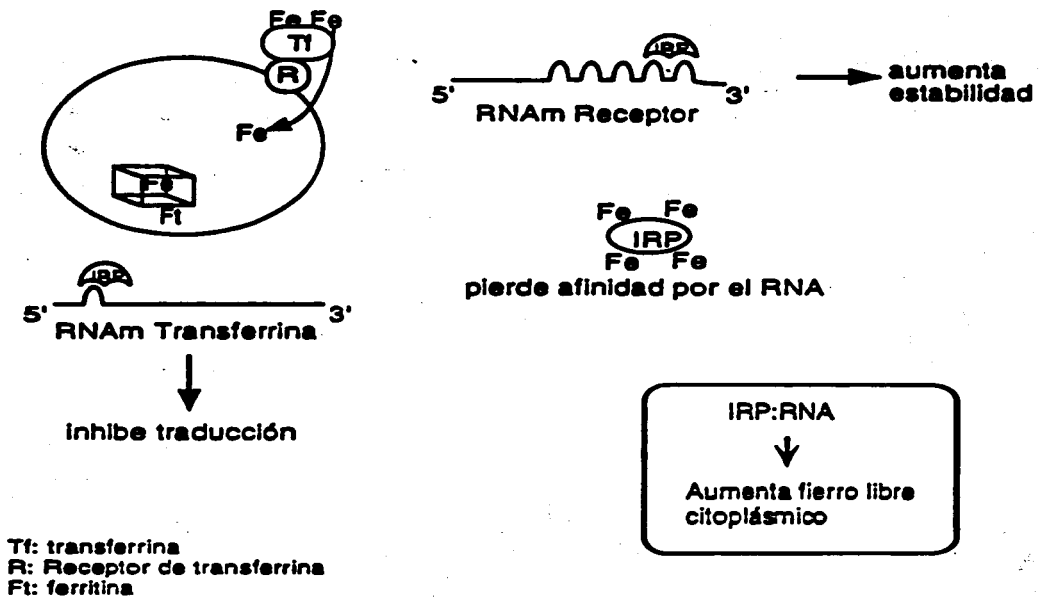


Figura 13. Esquema de la regulación del metabolismo del hierro. Ver texto para detalles.

Holo-Transferrina y Apo-Transferrina

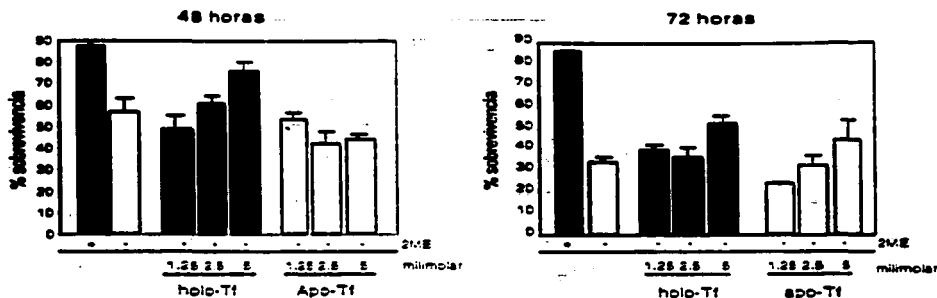


Figura 14. La adición de Transferrina cargada de hierro estimula la sobrevivencia. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de Tf cargada de hierro (Holo-Tf) o libre de hierro (Apo-Tf) durante 48 o 72 horas. Después de ese tiempo se cuantificó la sobrevivencia y el número total de células vivas y muertas. Se presenta el promedio de un experimento representativo hecho por triplicado; las barras de error representan la desviación estándar.

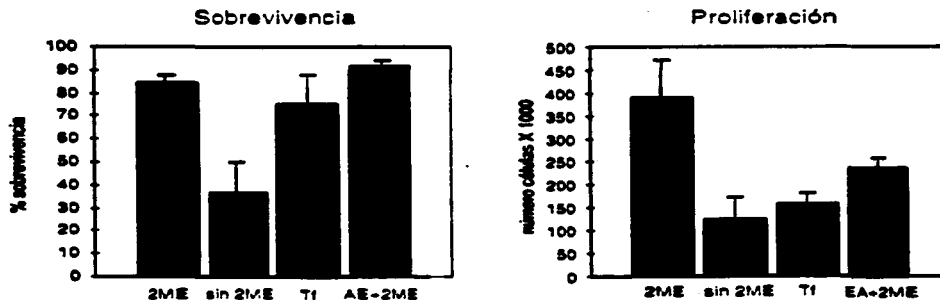


Figura 15. El 2ME parece inducir la proliferación a través del GSH, y la sobrevivencia modulando el nivel de Hierro libre intracelular. Las células fueron cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de 2ME. Tf, células cultivadas en ausencia de 2ME con 5mM Tf. EA+2ME, células cultivadas en presencia de 2ME con 200µM de AE. Se presenta el promedio de un experimento representativo hecho por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

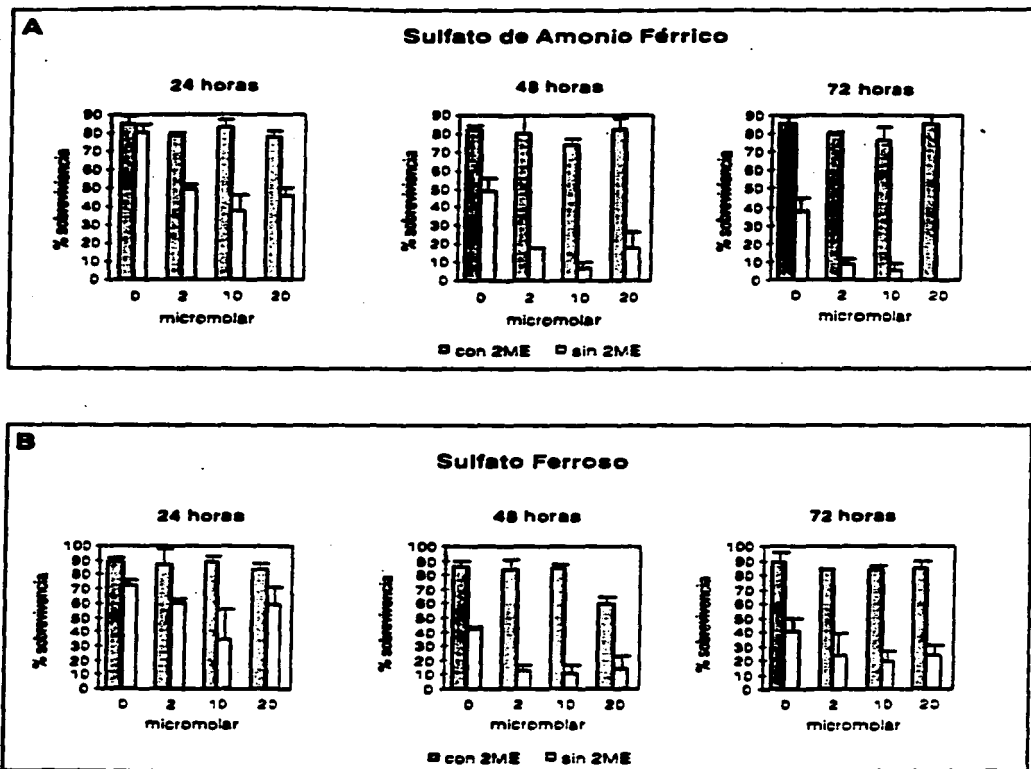


Figura 16. La adición directa de hierro al medio de cultivo no es suficiente para estimular la sobrevivencia. Se cultivaron las células en presencia o ausencia de 2ME con diferentes concentraciones de sulfato de amonio férrico (A) o sulfato ferroso (B). A los tiempos indicados se cuantificó la sobrevivencia y el número total de células vivas y muertas. Se presenta el promedio de un experimento representativo hecho por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

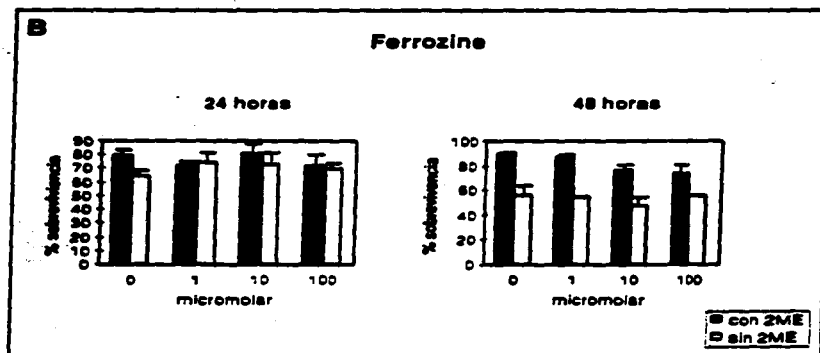
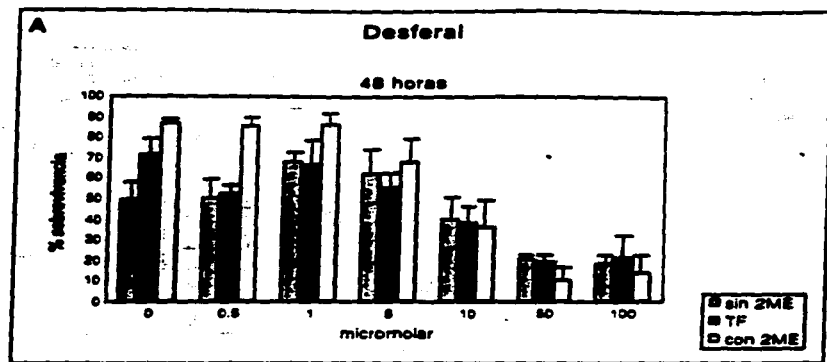


Figura 17. La adición del quelante permeable Desferal provoca la muerte celular y nulifica el efecto protector mediado por Tf. **A**, las células fueron cultivadas en presencia de 2ME, en ausencia de 2ME o en presencia de 5mM Tf con diferentes concentraciones del quelante permeable Desferal. **B**, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de 2ME con diferentes concentraciones del quelante impermeable Ferrozine. A los tiempos indicados se cuantificó la sobrevivencia y el número total de células vivas y muertas. Se presenta el promedio de un experimento representativo hecho por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

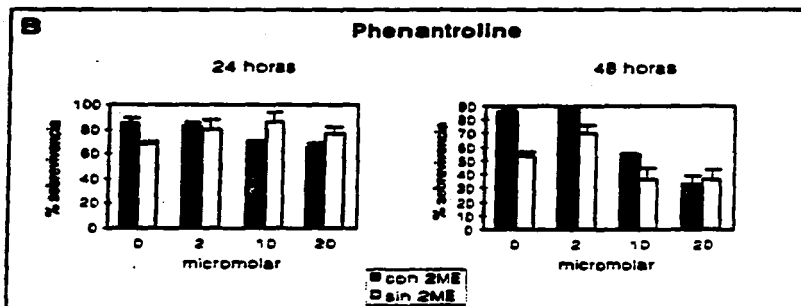
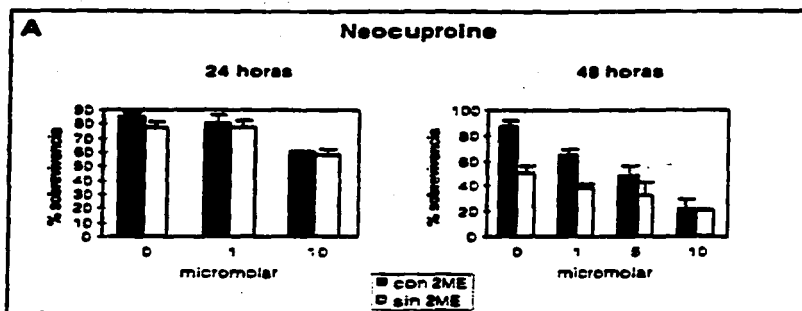


Figura 18. El cobre parece ser importante para la sobrevivencia. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de 2ME, con diferentes concentraciones del quelante de Cu Neocuproine (A), o del quelante de Cu/Fe Phenantroline (B). A los tiempos indicados se cuantificó la sobrevivencia y el número total de células vivas y muertas. Se presenta el promedio de un experimento representativo hecho por triplicado. Las barras de error representa la desviación estándar.

detectar el hierro presente en 2×10^7 células. Se buscó, entonces, identificar un cambio en la afinidad de IRP-1 por el RNA por medio de gels de retardamiento, para lo cual se comprobó que las células ES expresan IRP-1 por experimentos tipo Northern (fig. 19). Para obtener el templado de IRE para la transcripción *in vitro*, se diseñaron 2 oligonucleótidos complementarios que contienen la secuencia consenso de IRE flanqueados por un sitio de restricción (ver material y métodos). Se montaron las condiciones para detectar cambios en el retardamiento dependiendo de la cantidad de proteína presente, utilizando extractos citoplásmicos de diferentes líneas celulares (ES, STO y L929) (fig. 20A). Acorde a lo esperado, en presencia de 2ME hubo menor retardamiento del IRE respecto a lo observado en ausencia de 2ME, indicando una mayor cantidad de Fe libre en presencia de 2ME. Sin embargo, la adición de Ti, que incrementa la sobrevivencia, mostró un retardamiento comparable al observado en ausencia de 2ME. Estos resultados sugieren que la transferrina pudiera incorporar menor cantidad de hierro que el generado por la presencia de 2ME, pero suficiente para promover la sobrevivencia. Sin embargo, existe la posibilidad de que el mecanismo por el cual la Ti protege de muerte no esté directamente relacionado al mecanismo por el cual el 2ME ejerce su efecto. Para descartar el papel de GSH en el cambio de afinidad de IRP presentado, se incluyó en el análisis un extracto obtenido de células cultivadas en presencia de AE (fig 20B).

En conclusión, pudiera ser que las células ES requieren de un umbral de Fe intracelular para sobrevivir, debajo del cual se activa la MCP.

B) Estudio de la regulación de MCP.

1. El AR induce apoptosis y estrés oxidativo en células de cuerpos embrionarios.

Durante los estudios de maestría observamos que la adición de AR a cuerpos embrionarios provoca la muerte de las células. Este resultado nos pareció interesante, pues podría representar uno de los papeles biológicos del AR, ya que además de haber MCP en el blastocisto, en ratones transgénicos con β -galactosidasa bajo el control de un promotor mínimo con el elemento de respuesta a RAR β , se observó expresión en la masa celular interna¹⁹⁹⁹. Esto abre la posibilidad de que el AR participe en la MCP de este etapa de desarrollo. Considerando, además, los reportes que sugieren que la muerte en el blastocisto está mediada por estrés oxidativo, decidimos estudiar si la muerte inducida por AR en cuerpos embrionarios es fisiológica y analizar la participación de ERO en este tipo de muerte.

Para demostrar que la muerte provocada por la presencia de AR es apoptótica, se tilaron los núcleos con DAPI para observar la fragmentación nuclear y se analizó el estado del DNA genómico mediante electroforesis para observar la fragmentación internucleosomal característica (figura 1 publicación 2). Se determinó la concentración de ERO en presencia o ausencia de AR, con el fin de determinar si la muerte inducida por AR correlaciona con un incremento en estrés oxidativo (figur 3 publicación 2). Demostramos que el estrés oxidativo es necesario para la progresión de la muerte inducida por AR, ya que la adición de SOD o catalasa al medio de cultivo aumentó el número de colonias formadas en presencia de AR, indicativo de un incremento en la sobrevivencia celular (figura 1 publicación 2). Para saber si el AR induce apoptosis en las células ES indiferenciadas, se agregó directamente a células sembradas en presencia o ausencia de la monocapa de células alimentadoras y en ningún caso se observó muerte. En esta condición se cuantificaron los niveles de ERO para corroborar que el estrés oxidativo se diera sólo en condiciones de muerte (figura 3 publicación 2). El hecho de que las células indiferenciadas no mueran en presencia de AR se puede deber a que el efecto del AR depende de la adquisición de la capacidad de responder durante el proceso de formación del cuerpo embrionario, o bien a un cambio en la respuesta a AR mediado tal vez por las interacciones celulares. Demostramos que las células indiferenciadas son sensibles a AR, ya que si se cultivan en ausencia de suero diferencian hacia la línea neuronal generando largos axones, evidenciados mediante inmunocitoquímica contra neurofilamentos. El 2ME induce la sobrevivencia tanto de células indiferenciadas como de neuronas, ya que en su ausencia no fue posible obtener células neuronales (figura 5 publicación 2).

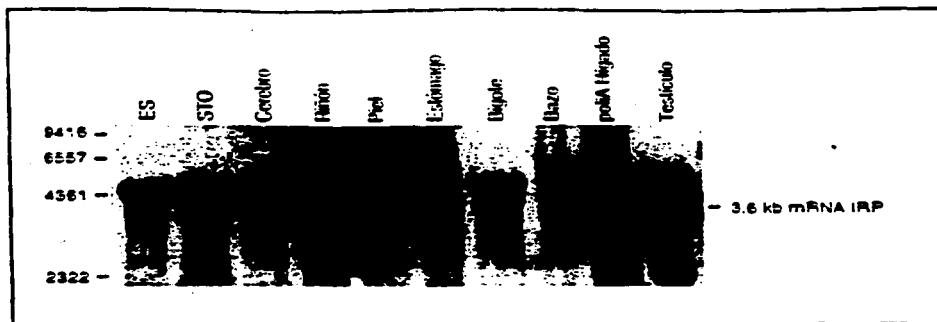


Figura 19. Las células ES expresan IRP-1. Northern de RNA total (20 μ g) de los tejidos de adulto indicados, excepto de Hígado, en cuyo caso se cargó RNA poliadenilado (1 μ g). Se utilizó como sonda el cDNA de IRP-1.

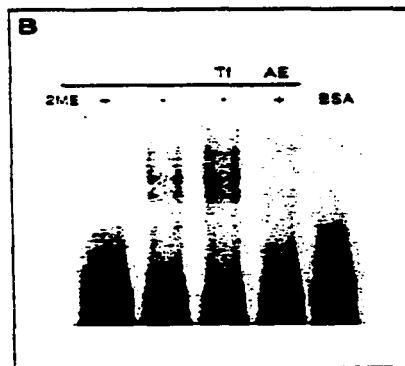
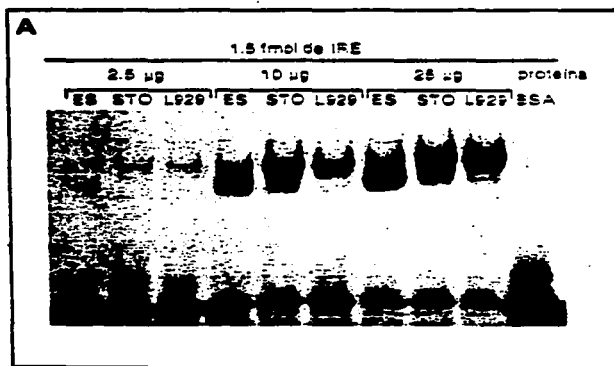


Figura 20. En ausencia de 2ME la afinidad de IRP por el RNA aumenta, sugiriendo una disminución en la disponibilidad de hierro libre citoplásmico. A. estandarización del gel de retardamiento para analizar la unión de IRP al IRE. Se purificaron extractos citoplásmicos de células ES y dos líneas de fibroblastos (STO y L929) con fines comparativos; se presentan las condiciones óptimas para detectar cambios en la intensidad de la banda retardada dependiendo de la cantidad de proteína presente en el ensayo de unión. B. Comparación de la afinidad de IRP entre extractos citoplásmicos obtenidos de células cultivadas 48 horas en presencia (-) o ausencia (+) de 2ME; en presencia de 5 mM Tl (Tl); o bien, con 200 μ M de ácido etacrínico (AE) y 2ME. BSA, 50 μ g de albúmina bovina.

VI. DISCUSION

1. La expresión abundante de *Bcl-2* puede ser letal en las células ES.

A pesar de que recientemente se han identificado diferentes genes que participan en la regulación positiva o negativa de la MCP, aún no se establece el mecanismo por el cual actúan, ni la regulación de su actividad. En el caso de los miembros de la familia de *Bcl-2*, estudios recientes indican que la misma molécula puede tener un efecto protector o inductor de la muerte, dependiendo del contexto celular. En muchos reportes se ha observado que BAX promueve la muerte; sin embargo, su sobre-expresión estimula la sobrevivencia de neuronas privadas de neurotrofinas^{10,11}. Además, el ratón mutante nulo en Bax creció hasta la etapa adulta, pero con un fenotipo sorprendente: aunque algunos linajes como los de timocitos y de células B presentaron mayor número de células (como se esperaba), en otras regiones, como el testículo, hubo muerte celular abundante. Los machos *bax*^{-/-} resultaron estériles, con el epidídimo y las vías deferentes vacías, indicativo de una falta de producción de espermatozoides maduros. Esto sugiere que BAX se requiere para bloquear la apoptosis durante la espermatogénesis y que BAX puede provocar tanto hiperplasia como hipoplasia, dependiendo del linaje celular. El tipo de actividad de BAX podría depender de la proporción de los miembros de la familia de BCL-2 en cada tipo celular¹². Por su parte, BAK, a pesar de que también causa MCP cuando se sobre-expresa, parece tener un efecto protector en una línea celular transformada con el virus Epstein Barr.

Relevante para nuestros resultados es la observación de que BCL-2 también puede tener una función dual, pues en vez de proteger, potencia la muerte inducida por etidina¹³. Es posible, entonces, que la ausencia de clones de células ES transfectadas con PGK-Bcl-2 que presentarían niveles altos de expresión por resultar letal para las ES. Hay autores que sugieren que BCL2 protege de muerte induciendo estrés oxidativo moderado, el cual a su vez activa la maquinaria de defensa endógena de la célula. La expresión de *Bcl-2* en bacterias induce la expresión de la catalasa *KatG* y se observa una tasa de mutación más elevada, característica de estrés oxidativo. En células eucariotas también se han observado al menos dos componentes críticos del mecanismo pro-oxidante: la inducción de antioxidantes endógenos y daño al DNA. Por ejemplo, la presencia de BCL-2 produce, en células B murinas, un aumento del 73% en la actividad de SOD, mientras que en células neuronales murinas, se duplica la concentración de GSH respecto a células no transfectadas, cuando son cultivadas en condiciones aerobias normales, sin ningún tipo de estrés. Este incremento de antioxidantes endógenos permite a las células resistir una subsecuente exposición a estrés oxidativo potencialmente letal. El daño al DNA se ha observado en un híbrido, donde la fragmentación del DNA incrementa del 0% al 0.9% en células transfectadas con *Bcl-2*. Este daño al DNA podría ser consecuencia de un incremento moderado en ERO generado por BCL-2¹⁹. Puesto que observamos que las células ES contienen niveles altos de ERO, podrían ser más sensibles a un efecto pro-oxidante por parte de BCL-2 y morir en presencia de un exceso de BCL-2.

Como se discutió en la introducción, la relación estequiométrica entre los miembros de la familia de BCL-2 también parece ser importante para determinar si una proteína será pro-apoptótica o anti-apoptótica, de manera que es posible que las células ES se encuentren en un estado que no soporte niveles altos de BCL-2. Para probar esta hipótesis sería necesario modular los niveles de BCL-2 y de BAX, para lo cual se planea utilizar construcciones inducibles, usando el operador de tetraciclina.

2. El estrés oxidativo como transductor de señal.

La MCP es importante para la morfogénesis durante el desarrollo, así como para el mantenimiento de la homeostasis en el adulto y el funcionamiento del sistema inmune.

Sin embargo, aún no se entiende el mecanismo por el cual se regula la activación de la maquinaria de muerte, cuales son los componentes de la misma, ni el mecanismo por el cual actúan las moléculas hasta ahora identificadas. En el presente trabajo se establecieron modelos de estudio con el objetivo de aportar información relativa al mecanismo de activación de la maquinaria de MCP. En particular estudiamos el papel del estrés oxidativo, ya que en diferentes sistemas se había observado una correlación entre la generación de ERO y la progresión de la muerte. Sin embargo, al momento del inicio de este proyecto no estaba claro a que nivel actuaba el estrés oxidativo, pues podía ser una señal activadora de la maquinaria de

muerte, parte sustancial del mecanismo, o bien simplemente consecuencia de la misma. De acuerdo a nuestros resultados, el estrés oxidativo parece funcionar como señal para iniciar la vía de muerte en células embrionarias, ya que la muerte inducida por AR genera un incremento de ERO, y la presencia de antioxidantes como la SOD o la catalasa protegen de muerte. Estos resultados son congruentes con otros reportes en los que la presencia de antioxidantes también evitan la muerte, aunque cabe señalar que no se había observado tal efecto en células de origen embrionario; esto nos permite suponer que mecanismos comunes de activación de la MCP ocurren tanto en el desarrollo como en la etapa adulta. Recientemente se demostró que la apoptosis se puede llevar a cabo en condiciones de hipoxia²⁴. Puesto que se considera que la maquinaria ejecutora de la muerte debe estar conservada en todos los sistemas de estudio, y que diferentes tipos celulares se mueren con las mismas características (e.g. por apoptosis), el hecho de que la apoptosis se lleve a cabo en ausencia de ERO descarta la posibilidad de que estos sean parte esencial de la maquinaria. Considerando que la muerte inducida por AR se previene si se evita la generación de ERO, su posible función se restringe a actuar como activadores de la maquinaria de muerte.

Puesto que los resultados presentados fueron obtenidos en un sistema *in vitro*, quisimos averiguar si el estrés oxidativo participa también en la MCP que ocurre durante la morfogénesis del ratón. En colaboración con varios miembros del laboratorio se cultivaron miembros de embrión de ratón obtenidos justo cuando la regresión de los interdígitos comienza, para analizar el papel del estrés oxidativo en la regresión de los interdígitos. En este sistema de cultivo el desarrollo de los dígitos progresa normalmente, aunque un poco más lento respecto al desarrollo *in vivo*. Acorde a lo esperado, la adición de antioxidantes como fenol y DMSO a los cultivos disminuyó la MCP de los interdígitos. Es de resaltar que las células del interdígito que no mueren debido a la presencia de los antioxidantes parecen conservar su potencial diferenciativo, ya que son positivas con azul alciano y aglutinina de cacahuete fluorocinada, marcadores de condrogénesis. Para saber que tan general es el papel del estrés oxidativo en el desarrollo, se tiñeron embriones tanto con anaranjado de acridina (AA), un indicador de apoptosis, como con detectores de ERO (DH-DCF y MTT). Al observar en diferentes regiones embrionarias, se encontró que en la mayoría de las zonas donde ocurre MCP existe simultáneamente una mayor cantidad de ERO, como en los interdígitos, la región de fusión del paladar o del esternón, la vesícula ótica, etc. Por lo tanto, proponemos que el estrés oxidativo puede ser una señal que activa a la maquinaria de muerte en la mayoría de la MCP que ocurre durante el desarrollo (Publicación 3).

3. Mecanismo de acción del 2ME.

Por diferentes estrategias abordamos la hipótesis de que las células ES se encuentran en estrés oxidativo constitutivo, lo cual las convierte en dependientes de 2ME. Si bien encontramos que en ausencia de 2ME la concentración de ERO aumenta, parece que el mecanismo por el cual el 2ME protege de muerte no es únicamente previniendo un estrés oxidativo general, ya que ningún antioxidante utilizado (biológicos y no biológicos, permeables e impermeables a la célula) fue capaz de sustituirlo. Además, cuando disminuimos la concentración de oxígeno molecular en la atmósfera, la cinética de muerte no cambió. Si bien, cabe la posibilidad de que en una atmósfera con 2% de oxígeno se produzca una concentración suficiente de ERO para activar la maquinaria de muerte. Habría sido necesario determinar los niveles de ERO en las diferentes atmósferas utilizadas, pero la dificultad metodológica no lo permitió, ya que para hacer tales determinaciones era necesario retirar los cultivos de la cámara de atmósfera controlada, y la exposición a 21% de oxígeno atmosférico cambiaría el estado redox de las células.

Si bien no pudimos determinar el mecanismo por el cual el 2ME estimula la sobrevivencia, su papel como inductor de la proliferación mediante la estimulación de la biosíntesis de GSH parece claro. Sin embargo, sería necesario cuantificar directamente los niveles de GSH en presencia o ausencia de 2ME, para confirmar los resultados presentados.

4. El fierro podría modular la actividad de la maquinaria de muerte.

Diversos esfuerzos se han realizado para entender el mecanismo por el cual BCL-2 protege de muerte. El descubrimiento de que en ausencia de oxígeno la apoptosis se lleva a cabo y que sigue siendo bloqueada por BCL-2 y BCL-X_L, descarta la activación de una vía antioxidante como mecanismo de acción de estas proteínas. En cambio, los resultados obtenidos en el

presente trabajo sugiriendo que cierto umbral de hierro intracelular puede promover la sobrevivencia celular, permiten considerar la participación del hierro como modulador de la actividad de la maquinaria de muerte.

Una posibilidad es que el hierro se una directamente a miembros de la familia de BCL-2 modulando su actividad. Los análisis de estructura secundaria no descartan esta posibilidad. Además, utilizando el programa PROSEARCH, BCL-2 resultó semejante a varias proteínas que unen hierro, entre ellas el citocromo c. Esta semejanza es intrigante, pues recientemente se demostró que durante la apoptosis se libera el citocromo c de la mitocondria al citoplasma, lo cual activa a las caspasas. La presencia de BCL-2 impide la translocación del citocromo c, lo que sugiere que su mecanismo de acción involucra la regulación de la liberación del citocromo c²². Recientemente se resolvió la estructura terciaria de BCL-XL y sus hélices alfa presentan un arreglo reminiscente del dominio de translocación membranar de algunas toxinas bacterianas, como la toxina de la difteria²³, que forma poros en la membrana. Por lo tanto, se propone que BCL-2 y BCL-XL pueden ser parte de un poro que regule la salida del citocromo c. Tal vez la presencia de hierro en el citoplasma favorezca la retención del citocromo dentro de la mitocondria.

Aun se desconoce el mecanismo de acción del citocromo c en el citoplasma mediante el cual promueve la activación de las caspasas, pero considerando que es una hemo-proteína, el hierro podría estar participando en la activación de la maquinaria. En este sentido parecería contradictorio que se requiera de hierro intracelular para sobrevivir, pero el hierro libre podría tener un acceso a blancos diferentes que el hierro unido al citocromo c. Resulta difícil imaginarse un mecanismo que involucra un intercambio de hierro en el citocromo c, ya que es la única hemo-proteína que une covalentemente al grupo hemo.

Finalmente, puede ser que el hierro regule la actividad de alguna proteína aún no identificada involucrada en la regulación de la maquinaria de muerte, tal como el homólogo en mamífero de Ced-4, que aunque aún no se ha encontrado, puede existir (ver introducción).

Si es verdad que el hierro intracelular participa en la regulación de la maquinaria de muerte, se debe observar su efecto en diversos sistemas de estudio. Por lo tanto, sería interesante analizar si el efecto de la transferrina en la sobrevivencia es una particularidad de las células ES o bien se observa por ejemplo en el modelo ampliamente utilizado de muerte provocada por staurosporina (un inhibidor de cinasas de amplio espectro) en fibroblastos. Si resultara ser un evento general, valdría la pena estudiar la capacidad de BCL-2 de unir hierro directamente, así como el efecto que tienen diferentes niveles de BCL-2 y BAX sobre los niveles de hierro intracelular, tal vez analizando el cambio en la afinidad de IRP por el RNA. Sin embargo, dada la complejidad de la interpretación de los resultados, las múltiples opciones posibles, así como las limitaciones de los estudios *in vitro*, consideramos dedicar el esfuerzo a estudiar otras propuestas planteadas más adelante.

5. El AR podría ser un inductor de MCP durante el desarrollo.

En el presente trabajo demostramos que el AR induce la MCP de células de cuerpos embrionarios, mediante la generación de ERO. Este efecto del AR puede ser de relevancia biológica durante el desarrollo, ya que las regiones donde observamos MCP concomitante con estrés oxidativo son sitios potenciales de producción de AR, pues expresan una alcohol deshidrogenasa que participa en la biosíntesis de AR. En el caso particular del blastocisto, que es la etapa de desarrollo de donde provienen las ES, ocurre una activación de un promotor mínimo con elementos de respuesta al receptor de AR (RARE), lo cual es una evidencia indirecta de la presencia de AR en esa etapa de desarrollo. En conclusión proponemos que el AR podría ser una molécula reguladora del inicio de la MCP durante el desarrollo, y que podría incidir sobre la maquinaria de muerte mediante la generación de ERO. Para probar esta hipótesis resulta necesario impedir la síntesis de AR mediante inhibidores de la alcohol deshidrogenasa y observar si eso evita la MCP y/o la generación de ERO. Acorde con la hipótesis, en experimentos preliminares Enrique Salas observó una disminución de la muerte en los interdigitos al cultivar miembros de embrión en presencia del inhibidor citral.

Durante la formación de las extremidades de los vertebrados se produce AR en la cresta apical. Se ha propuesto que el AR es la molécula inductora de la MCP durante la regresión de los interdigitos ya que incrementa las zonas necróticas y el receptor RAR β 1 se expresa exclusivamente en esa región. Por otro lado, en estudios *in vitro* se ha demostrado que el receptor alfa es indispensable para la muerte (ver justificación). Sería interesante estudiar el tipo de receptor utilizado en la muerte observada en las células de los cuerpos embrionarios e

investigar la vía que genera el incremento en ERO, así como el mecanismo por el cual el estrés oxidativo activa la apoptosis. Sin embargo, para hacer ese tipo de estudios sería conveniente contar con una población de células homogéneas, pues durante la formación de cuerpos embrionarios se generan varios tipos celulares. Por lo tanto, resulta necesario encontrar condiciones en las cuales el AR induzca la muerte celular sin necesidad de formar cuerpos embrionarios.

Parece que las proteínas llamadas factores morfogenéticos de hueso (BMP) participan en la muerte de diferentes tipos celulares durante el desarrollo, ya que el patrón de expresión de los genes *Bmp-2* y *Bmp-4* sobrelapa con las zonas necróticas, durante la regresión de los interdigitos del pollo. Además, la sobre-expresión de una mutante dominante negativa del receptor BMP en los miembros inhibe la MCP, provocando que permanezca una membrana entre los dígitos. Concordantemente, la adición directa de BMP-2 o BMP-4 a células mesenquimáticas provenientes de los interdigitos provoca la muerte celular¹²³⁴. Por otro lado, BMP-4 también induce la MCP que ocurre durante la migración discreta de las células de la cresta neural. El patrón de las estructuras esqueléticas y musculares de la región branquial de la cabeza está determinado por la cresta neural, cuyas células migran a partir de los rombómeros pares (1+2, 4 y 6), mientras que de los rombómeros nones (3 y 5) no surgen células. Esto se debe a que las células que migrarían mueren, debido a la expresión de *Bmp-4*, la cual induce a su vez la expresión de *Msx-2*, un posible factor de transcripción que contiene una caja homeótica. La expresión de *Bmp-4* y consiguiente MCP en los rombómeros 3 y 5 depende de la presencia de los rombómeros pares; la adición de BMP-4 a explantes de los rombómeros 3 y 5, que aislados producen cresta neural, induce la activación de *msx-2* y la apoptosis de la población de la cresta neural¹²³⁵. Por lo tanto, se propone que BMP-4 induce la apoptosis mediante la activación de *Msx-2*. Puesto que la expresión de *Bmp-4* depende de la presencia de los rombómeros pares, estos deben producir algún factor inductor, cuya naturaleza se desconoce. En otros sistemas también se ha observado la activación de *Msx-2* por BMP-4¹²³⁶, por lo que es posible que MSX-2 también señalice la muerte de las células de los interdigitos. Considerando que la muerte inducida por AR depende de la formación de cuerpos embrionarios, es posible que participen eventos de inducción como el descrito en los rombómeros. En este caso, la muerte observada sería el resultado de una combinación de la señal generada por AR, más la generada por la producción de BMP-4. Valdría la pena analizar la expresión de *Bmp-4* y *Msx-2* durante la formación de cuerpos embrionarios en presencia y ausencia de AR. Si este fuera el caso, la formación de cuerpos embrionarios se podría sustituir por la adición directa de BMP-4 o MSX-2 a células ES indiferenciadas, con lo cual contaríamos con un sistema homogéneo que permitiría abordar las preguntas planteadas anteriormente. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el AR induzca la muerte mediante la activación de *Bmp-2* y/o *Bmp-4*, ya que la adición de AR en la gema del miembro provoca la expresión ectópica de *Bmp-2*¹²³⁷.

6. Las células ES tienen un ciclo celular atípico que podría predisponerlas a la muerte. Diversos datos sugieren que las células ES tienen un ciclo celular atípico, pues carecen de pRB y p53 funcionales, que son los supresores tumorales más importantes. En el caso de pRB, se produce la proteína pero ésta se encuentra constitutivamente hiperfosforilada (inactiva)¹²³⁸, mientras que normalmente el estado de fosforilación de pRB oscila, permitiendo la alternancia entre la detención en la fase G1 y la entrada a la fase de Síntesis de DNA. En el caso de p53, simplemente no hay transcripción del gen, aunque es posible inducir su expresión mediante la exposición de las células a luz ultravioleta¹²³⁹. Puesto que p53 también funciona como un punto de control de la transición de G1 a S, la ausencia de pRB y p53 sugiere que las células ES no pueden interrumpir su ciclo celular en la fase G1/S. Esta noción se apoya por la observación de que las células ES fueron capaces de proliferar y formar colonias en ausencia de suero, pues sugiere que la progresión de la proliferación es independiente de mitógenos que se encuentran normalmente en el suero, ya que estos inciden sobre la maquinaria de G1.

Considerando lo anterior, es posible que las células ES no sean capaces de dejar de proliferar pues carecen de la maquinaria para detenerse al menos en la fase G1 del ciclo celular; en consecuencia, factores externos que las obliguen a ello podrían provocar la muerte celular. En concordancia con esta hipótesis, las células resultaron ser sensibles a concentraciones muy bajas (ng/ml) de inhibidores de la transcripción y la traducción (e.g. actinomicina D y cicloheximida), a diferencia del común de las células (i.e. neuronas, fibroblastos, endotelios) que responden a dosis de µg/ml deteniéndose en la fase G1. Además, podría también ser la razón por la que el antioxidante NAC aceleró la muerte celular en lugar de disminuirla cuando fue

utilizado en lugar de el 2ME, ya que se ha observado que también promueve la detención en la fase G1 del ciclo celular²².

En *Drosophila* y en *Xenopus* se ha descrito que las primeras divisiones a partir de la fertilización son sincrónicas, con un ciclo celular denominado embrionario, durante el cual las células transitan de la fase S a la fase M, sin detenerse en las fases intermedias G1 y G2. Carecen de los puntos de control de estas fases y no es sino hasta la etapa de transición de la midblástula que se empiezan a transcribir las proteínas del ciclo celular responsables de la transición por la fase G2 y posteriormente de la fase G1, cuando ya el ciclo celular se denomina somático (esto ocurre a partir de las 14 divisiones en *Drosophila* y de las 20 divisiones en *Xenopus*). Esta etapa de desarrollo embrionario es muy importante en estos organismos, pues coincide con el inicio de la transcripción embrionaria (antes de este estadio se traducen RNAs de origen materno), se desincronizan las divisiones celulares y se inicia el establecimiento de los patrones de formación²³. En mamíferos no se ha descrito una etapa de desarrollo equivalente, pues la transcripción embrionaria ocurre desde las primeras divisiones y es difícil correlacionarlo con una asincronía de las divisiones, debido a la compactación de la célula. Sin embargo, es posible que en los mamíferos también exista un ciclo celular embrionario y tal vez una etapa equivalente a la transición de midblástula, pues hay genes homólogos en mamífero de las proteínas que participan en *Drosophila*, como *string*, que codifica para la fosfatasa cdc25. La transición de un ciclo celular embrionario a un ciclo celular somático podría correlacionar con la adquisición de la dependencia a factores de sobrevivencia, pues de todos los tipos celulares estudiados en cultivo, sólo los blastómeros (y las células ES) se han podido cultivar en ausencia de factores de sobrevivencia²⁴. En este sentido sería interesante estudiar la regulación del ciclo celular de las ES.

VII. PERSPECTIVAS

Considerando la relevancia potencial del estrés oxidativo como transductor de la señal de muerte en diferentes regiones del embrión, se planea estudiar *in vivo* el efecto de manipular los niveles de ERO, mediante la manipulación genética de las enzimas SOD y catalasa. En el caso del ratón existen tres genes caracterizados para la SOD, generando proteínas localizadas en el citoplasma (SOD1), en la mitocondria (SOD2) y en el espacio extracelular (SOD3) y uno para la catalasa. Los experimentos que se planean se describen a continuación.

a) Sobre-expresión de las enzimas antioxidantes en precursores neuronales.

Se harán ratones transgénicos para sobre-expresar las proteínas SOD1, SOD2, SOD3 y catalasa específicamente en precursores neuronales, utilizando el promotor de la enolasa específica de neuronas (NSE), que se expresa específicamente en esa población. Este promotor se utilizó para generar un ratón transgénico que sobre-expresa *Bcl-2*, y se observó una mayor cantidad de células en regiones específicas del cerebro, acorde al papel descrito para *BCL-2*²⁵³. Si dicha muerte ocurre mediante la generación de ERO, la sobre-expresión de SOD o catalasa debería generar el mismo fenotipo que el obtenido con *BCL-2*. Se planea analizar si el fenotipo se agudiza con la cruce de los animales que expresen diferentes enzimas. En este momento contamos ya con las construcciones necesarias y se están haciendo las microinyecciones para la generación de los ratones transgénicos. Este proyecto se está realizando en colaboración con la Dra. Verónica Narváez.

b) Sobre-expresión constitutiva de las enzimas antioxidantes.

Para analizar si efectivamente la MCP que ocurre en las regiones del embrión donde simultáneamente observamos incremento en ERO depende del estrés oxidativo, se harán ratones transgénicos que expresen las mismas enzimas utilizadas anteriormente bajo el control del promotor de actina. Dentro del vector se incluirá el gen de la proteína verde fluorescente como marcador para poder rastrear las regiones de expresión y analizar el fenotipo en ratones transgénicos transitorios. Este proyecto también se está realizando en colaboración con la Dra. Verónica Narváez.

c) Generación de ratones con una disrupción en el gen de la catalasa.

Si la sobre-expresión de enzimas antioxidantes debería incrementar la sobrevivencia celular, es de esperar que la carencia absoluta de ellas genere un descontrol en la MCP. Para probar esta hipótesis se planea hacer la disrupción genética de la catalasa mediante recombinación homóloga en las ES, para con ellas generar ratones quiméricos. En este momento contamos con la dona genómica y se está mapeando para construir el vector de "gene targeting". Este proyecto se está realizando en colaboración con el Dr. Ramiro Ramírez de la Texas A&M University. Vale la pena mencionar que la disrupción genética de las tres diferentes SOD se está desarrollando en otros laboratorios.

VIII. REFERENCIAS

- ¹ Driscoll, M. and Chalfie, M. (1992). *TINS* 15(1):15-19.
- ² Shwartzman, R. A. and Cidlowski, J. A. (1993). *Endocrine Reviews* 14(2):133-151.
- ³ White, E. (1993). *Genes and Development* 7:2277-2284.
- ⁴ Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993). *Science* 242:695-700.
- ⁵ Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M.P., Taresa, E. and Piacentini, M. (1989). *FEBS Lett.* 245:150-154.
- ⁶ Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Otaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. (1993). *Cancer Res.* 53:3976-3985.
- ⁷ Hedgecock, E.M., Sulston, J.E. and Thomson, J.N. (1983). *Science* 220:1277-1279.
- ⁸ Avery, L. and Horvitz, H.R. (1987). *Cell* 51:1071-1078.
- ⁹ Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.C. and Johnson, E.M. Jr. (1988). *J. Cell Biol.* 106:829-844.
- ¹⁰ Schwarz, L.M., Kosz, L. and Kay, B.K. (1990). *P.N.A.S.* 87:6594-6598.
- ¹¹ Steller, H. (1995). *Science* 267:1445-1449.
- ¹² Metzstein, M.M., Hengartner, M.O., Tsung, N., Ellis, R. and Horvitz, H.R. (1996). *Nature* 382:545-547.
- ¹³ Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Harwig, A. and Yuan, J. (1993). *Cell* 75:653-660.
- ¹⁴ Huginin, M., Quintal, L.J., Mancovich, J.A., and Ghayur, T. (1996). *J. Biol. Chem.* 271:3517-3522.
- ¹⁵ Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H.R. (1993). *Cell* 75:641-652.
- ¹⁶ Gagliardini, V., Fernández, P.A., Lee, R.K.K., Hannes, C.A., Rotello, R.J., Fishman, M.C., and Yuan, J. (1994). *Science* 263:826-828.
- ¹⁷ Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, K.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, G., J. F., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjoco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Ralando, A.M., Salley, J.P., Yamin, T.T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M., Mumford, R.A., Schmith, J.A., and Tocci, M.J. (1992). *Nature* 356:768-774.
- ¹⁸ Xue, D. and Horvitz, R. (1995). *Nature* 377:248-251.
- ¹⁹ Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, L., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Parkind, M., Rodman, L., Salfeld, J., Towne, E., Tracey, D., Wardwell, S., Wei, F.Y., Wong, W., Kamen, R., and Seshadri, T. (1995) *Cell* 80:401-411.
- ²⁰ Kiuda, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingstone, D.J., Su, M.S.S., and Flavell, R.A. (1995) *Science* 267:2000-2003.
- ²¹ Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N., and Jenkins, N. (1994). *Genes and Dev.* 8:1613-1626.
- ²² Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J. (1994). *Cell* 78:739-750.
- ²³ Gu, Y., Wu, J., Faucheu, C., Lalanne, J.L., Diu, A., Livingstone, D.J., and Su, M.S.S. (1995). *EMBO, J.* 14:1923-1931.
- ²⁴ Alnemri, E., Fernández-Alnemri, S.T., and Litwack, G. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:4312-4317.
- ²⁵ Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvessen, G.S., and Dixit, V.M. (1995). *Cell* 81:801-809.
- ²⁶ Fernández-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1994). *J. Biol. Chem.* 269:30761-30764.
- ²⁷ Chinnaiyan, A.M., and Dixit, V. (1996). *Current Biology* 6(5):555-562.
- ²⁸ Milligan, C.E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L.C., Tomaselli, K.J., Oppenheim, R.W., Schwartz, L.M. (1995). *Neuron* 15:385-393.
- ²⁹ Faucheu, C., Diu, A., Chan, A.W.E., Blanchet, A.M., Miossec, C., Herve, F., Collard-Dutilleul, V., Gu, Y., Aldape, R.A., Lippke, J.A., Rocher, C., Su, M.S.S., Livingstone, D.J., Herdend, T., and Lalanne, J.L. (1995). *EMBO, J.* 14:1914-1922.
- ³⁰ Fernández-Alnemri, T., Litwack G., and Alnemri, E.S. (1995). *Cancer Res.*
- ³¹ Munday, et.al. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:15870-15876.

- ¹²³¹ Duan, H., Chinnaiyan, A.M., Hudson, P.L., Wing, J.P., He, W.W., and Dixit, V.M. (1996). *J. Biol. Chem.* 271(3):1621-1625.
- ¹²³² Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). *Cell* 85:803-815. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M., *Cell* 85:817-827.
- ¹²³³ Song, Z., McCall, K., and Steller, H. (1997). *Science* 275:536-540.
- ¹²³⁴ Enari, M., Talianian, R.V., Wong, W.W., and Nagata, W.S. (1996). *Nature* 380:723-726.
- ¹²³⁵ Darmon, A.J., Nicholson, D.W., Bleackley, R.C. (1995). *Nature* 377:446-448.
- ¹²³⁶ Martin, S.J., Green, D. (1995). *Cell* 82:349-352.
- ¹²³⁷ Schreiber, V., Hunting, D., Trucco, C., Gowans, B., Grunwald, D., Murcia, G., and Murcia, J.M. (1995). *P.N.A.S.* 92:4753-4757.
- ¹²³⁸ Wang ZQ., Auer, B., Stingl, L., Berhammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., et al. (1995). *Genes and Dev.* 9:509-520.
- ¹²³⁹ Neamaty, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J., and McConkey, D.J. (1994). *J. Immunol.* 154:1693-1700.
- ¹²⁴⁰ Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (1995). *P.N.A.S.* 92:9042-9046.
- ¹²⁴¹ Wright, S.C., Wei, Q.S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D.H., and Larrick, J.W. (1994). *J. Exp. Med.* 180:2113-2123.
- ¹²⁴² Kayalar, C., Ord, T., Testa, M.P., Zhong, L.T., and Bredesen, D.E. (1995). *P.N.A.S.*
- ¹²⁴³ Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahaboubi, A., Saido, T.C., and Green, D.R. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:6425.
- ¹²⁴⁴ Na, S., Chuang, R.H., Turi, T.G., Hanke, J.H., Bokoch, G.M., and Danley, D.E. (1996). *J. Biol. Chem.* 271(19):11209-11213
- ¹²⁴⁵ Wang, X., Zelenski, N.G., Yang, J., Sakai, J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). *EMBO J.* 15:1012-1020.
- ¹²⁴⁶ Tewari, M., Beidler, D.R., and Dixit, V.M. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:18738-18741.
- ¹²⁴⁷ Pahl, H.L., Baeuerle, P.A. (1996). *Curr. Op. Cell Biol.* 8:340-347.
- ¹²⁴⁸ Sadoul, R., Fernandez, P.A., Quiquerez, A.L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J.D., Irmier, M., Tschopp, J., Martinou, J.C. (1996). *EMBO J.* 15(15):3845-3854.
- ¹²⁴⁹ Grimm, L.M., Goldberg, A.L., Poirier, G.G., Schwartz, L.M., and Osborne, B. (1996). *EMBO J.* 15(15):3835-3844.
- ¹²⁵⁰ Herganzer, M.O., and Horvitz, H.R. (1994). *Cell* 76:665-676.
- ¹²⁵¹ Vaux, D.L., Weissman, I.L., and Kim, S.K. (1992). *Science* 258:1955-1957.
- ¹²⁵² Reed, J. (1994). *J. Cell Biol.* 124(1,2):1-6.
- ¹²⁵³ Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A.S., Dyer, M.J.S., Mason, D.Y., and Greaves, M.F. (1992). *Histochem. Cytchem.* 40:1819-1825.
- ¹²⁵⁴ Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J. (1993). *Cancer Res.* 53:4701-4714.
- ¹²⁵⁵ Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L., Leber, B., and Andrews, D.W. (1996). *EMBO J.* 15(8):4130-4141.
- ¹²⁵⁶ Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). *J. Biol. Chem.* 268:25265-25268.
- ¹²⁵⁷ Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, Jiyang, Peng, T., Jones, D.P., Wang, X. (1997). *Preventions of apoptosis .cyt c.* *Science* 275:1129-1132. Kluck, R.M., Bossy-Weisel, Ella, Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). *Science* 275:1132-1136.
- ¹²⁵⁸ Muchmore, S.W., et al. (1996). *Nature* 381:335. Minn, A.J., Véléz, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., and Thompson, C.B. (1997). *Nature* 385:353-357.
- ¹²⁵⁹ Merry, D.E., Veis, D.J., Hickey, W.F., and Korsmeyer, S.J. (1994). *Development* 120:3301-3311.
- ¹²⁶⁰ Hockenberry, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., and Korsmeyer, S.J. (1991). *P.N.A.S.* 88:6961-6965.
- ¹²⁶¹ Nufez, G., Hockenberry, D., McDonnell, T.J., Sorensen, C.M. and Korsmeyer, S.J. (1991). *Nature* 353:71-73.

- ¹²⁰⁴¹ McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nuñez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1989). *Cell* 57:79-88.
- ¹²⁰⁴² Farlie, P.G., Dringen, R., Rees, S.M., Kannourakis, G., and Bernard, O. (1995). *P.N.A.S.* 92:4397-4401.
- ¹²⁰⁴³ Veis, D.J., Sörenson, Ch. M., Shuter, J. R. and Korsmeyer, S. J. (1993). *Cell* 75:229-240.
- ¹²⁰⁴⁴ Boise L.H., González García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turk, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thomson, G.B. (1993). *Cell* 74:597-608.
- ¹²⁰⁴⁵ Hockenberry, D.M. (1995). *BioEssays* 17(7):631-638.
- ¹²⁰⁴⁶ Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and Loh, D.Y. (1995). *Science* 267:1506-1509.
- ¹²⁰⁴⁷ Oltvai, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993). *Cell* 74:609-619.
- ¹²⁰⁴⁸ Knudson, C.M., Tung, KSK., Tounellotte, W.G., Brown, G.A.J., and Korsmeyer, S.J. (1995). *Science* 270:96-99.
- ¹²⁰⁴⁹ Chinanden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I., and Guild, B.C. (1995). *Nature* 372:733-736.
- ¹²⁰⁵⁰ Keifer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., Barr, P.J. (1995). *Nature* 374:736-739.
- ¹²⁰⁵¹ Hanada, M., Aimé-Sempé, C., Sato, T., and Reed, J. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:11962-11968.
- ¹²⁰⁵² Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (1995). *Cell* 80:285-291.
- ¹²⁰⁵³ Yin, X.M., Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994). *Nature* 369:321-323.
- ¹²⁰⁵⁴ Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., and Reed, J.C. (1995). *Cell* 80:279-284.
- ¹²⁰⁵⁵ Fernandez-Sarabia, M.J., and Bischoff, J.R. (1994). *Nature* 366:274-275.
- ¹²⁰⁵⁶ Wang, H.G., Millan, J.A., Cox, A.D., Der, C.J., Rapp, U.R., Beck, T., Zha, H., and Reed, J.C. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:1103-1114.
- ¹²⁰⁵⁷ Wang, H., Rapp, U.R., and Reed, J. (1996). *Cell* 87:629-638.
- ¹²⁰⁵⁸ Chen, C.-Y., and Faller, D.V. (1996). *J. Biol. Chem.* 271(5):2376-2379.
- ¹²⁰⁵⁹ Haldar, S., Jena, N., and Croce, C.M. (1995). *P.N.A.S.* 92:4507-4511.
- ¹²⁰⁶⁰ Gajewski, T.F., and Thompson, C.B. (1996). *Cell* 87:589-592.
- ¹²⁰⁶¹ Strack, P.R., Frey, M.W., Rizzo, C.J., Cordov, B., George, H.J., Meade, R., Ho, S.P., Corman, J., Tritch, R., and Korant, B.D. (1996). *P.N.A.S.* 93:9571-9576.
- ¹²⁰⁶² Shaham, S., and Horvitz, R. (1996) *Genes & Development* 10:578-591.
- ¹²⁰⁶³ Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G., and Vishva, M.D. (1996). *J. Biol. Chem.* 271(9):4573-4576.
- ¹²⁰⁶⁴ Cosulich, S.C., Green, S., and Clarke, P.R. (1996). *Current Biology* 6(8):997-1005.
- ¹²⁰⁶⁵ Yuan, J., and Horvitz, H.R. (1992). *Development* 116:309-320.
- ¹²⁰⁶⁶ Shaham, S., and Horvitz, R. (1996). *Cell* 86:201-208.
- ¹²⁰⁶⁷ Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., and Dixit, V.M. (1997). *Science* 275:1122-1126.
- ¹²⁰⁶⁸ Wu, D., Wallen, H.D., and Nuñez, G. (1997). *localization ced-4... Science* 275:1126-1129.
- ¹²⁰⁶⁹ Golstein, P. (1997). *Science* 275:1081-1082.
- ¹²⁰⁷⁰ White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). *Science* 264:677-683.
- ¹²⁰⁷¹ White, K., Tahaoglu, E., and Steller, H. (1996). *Science* 271:805-807.
- ¹²⁰⁷² Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K., and Steller, H. (1995). *Genes and Dev.* 9:1694-1708.
- ¹²⁰⁷³ Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B., and Abrams, J.M. (1996). *Genes / Development* 10:1773-1782.
- ¹²⁰⁷⁴ Rabizadeh, D., Oh, J., Ord, T., Zhong, L., Yang, J., Bitler, C., Butcher, L.L. and Bredesen, D.E. 1993. *Science* 261:345-348.
- ¹²⁰⁷⁵ Deiss, L.P. et al. (1995). *Genes and Dev.* 9:15-30.
- ¹²⁰⁷⁶ Duan, H., and Dixit, V. (1997). *Nature* 385:86-89.

- ⁶⁰⁰ Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). *Cell* 85:803-815. Muzio, M., Chinaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Genz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996). *Cell* 85:817-827.
- ⁶⁰¹ Hay, B.A., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). *Cell* 83:1253-1262.
- ⁶⁰² Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gillfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M., and Thompson, C.B. (1996). *EMBO J.* 15(11):2685-2694.
- ⁶⁰³ Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shuttler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., Salih, M., Aubry, H., Tamai, K., Guan, X., Icanou, P., Crawford, T.O., Jong, P.J., Surth, L., Ikeda, J.E., Korneluk, R.G., and MacKenzie, A. (1995). *Cell* 80:167-178.
- ⁶⁰⁴ Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Hovart, G. et al. (1996). *Nature* 349:352.
- ⁶⁰⁵ Sugimoto, A., Hozak, R.R., Nakashima, T., Nishimoto, T., and Rothman, J.H. (1995). *Nature* 374:4434-4441.
- ⁶⁰⁶ Farrow, S.N., White, J.H.M., Martinou, I., Raven, T., Punk, K.T., Grinham, C.J., Martinou, C.J., and Brown, R. (1995). *Nature* 374:731-733.
- ⁶⁰⁷ Sugimoto, A., Friesen, P.D., and Rothman, J.H. (1994). *EMBO J.* 13(9):2023-2028.
- ⁶⁰⁸ Bump, N.J., Hackett, M., Huginin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Licari, P., Mankivich, J., Shi, L., Greenberg, P.H., Miller, L.K., Wong, W.W. (1995). *Science* 269:1885-1888.
- ⁶⁰⁹ Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., Greenberg, M.E. (1997). regulation of neural survival by the Akt. *Science* 275:661-665.
- ⁶¹⁰ Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1995). *J. Cell Biochem.* 58:191-198.
- ⁶¹¹ Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. (1995). *Science* 268:411-415.
- ⁶¹² Beg, A. and Baltimore, D. (1996). *Science* 274:782-784. Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). *Science* 274:787-789.
- ⁶¹³ Santana, P., Peña, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1996). *Cell* 86:189-199.
- ⁶¹⁴ Fronk, G.J., Ramer, K., Amiri, P., and Williams, L.T. (1996). *Science* 271:808-810.
- ⁶¹⁵ Martin, et al. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:6425.
- ⁶¹⁶ Bunke, T.M., and Sandstrom, P.A. (1994). *Immunol. Today* 15:7-10.
- ⁶¹⁷ Wong, G. H., Elwell, J. H., Oberley, L. W. and Goeddel, D. V. (1989). *Cell* 58, 923-931.
- ⁶¹⁸ Matsuda, M., Masutani, H., Nakamura, H. et al. (1991). *J. Immunol.* 147, 3837-3841.
- ⁶¹⁹ Chang, D. J., Rongold, G. M. and Heller, R. A. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 538-546.
- ⁶²⁰ Wong, G.H., Elwell, J.H., Oberley, L.W., and Goeddel, D.V. (1989). *Cell* 58:923-931.
- ⁶²¹ Hockenbery, D.M., Yin, X.M., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). *Cell* 75:241-251.
- ⁶²² Kane, D.J., et al. (1993). *Science* 262:1274-1277.
- ⁶²³ Steinman, H.M. (1995). *J. Biol. Chem.* 270(8):3487-3490.
- ⁶²⁴ Jacobson, M., and Raff, M.C. (1995). *Nature* 374:814-816.
- ⁶²⁵ Shimizu, S., et al. (1995). *Nature* 374:814-816.
- ⁶²⁶ Schmidt, K.N., Amstad, P., Cerutti, P., and Baeuerle, P.A. (1995). *Chemistry and Biol.* 2:13-22.
- ⁶²⁷ Lo, Y.Y.C., and Cruz, T.F. (1995). *J. Biol. Chem.* 270(20):11727-11730.
- ⁶²⁸ Sun, Y., and Oberley, L.W. (1996). *Free Rad. Biol. Med.* 21(3):335-348.
- ⁶²⁹ Fialkow, L., Chan, C.K., Rotin, D., Grinstein, S., and Downey, G.P. (1994). *J. Biol. Chem.* 269:31234-31242.
- ⁶³⁰ Lei, S.Z., et al. (1992). *Neuron* 8:1087-1099.
- ⁶³¹ Sundaresan, M., Yu, Z.N., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). *Science* 270:296-299.
- ⁶³² Greenlund, L.J.S., Deckwerth, T.L., and Johnson, T.L. (1995). *Neuron* 14:303-315.
- ⁶³³ Parchment, R.R. (1993). *Int. J. Dev. Biol.* 37:75-83.
- ⁶³⁴ Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R?, Escalante-Alcalde, D. and Covarrubias, L. sometido.
- ⁶³⁵ Jabs, T., Dietrich, R.A., and Dang, J.L. (1996). *Science* 273:1853-1856.

- ¹²⁸² McConey, D. and Orrenius, S. (1994). *Trends Cell Biol.* 4:370-375
- ¹²⁸³ Khan, A.A., Soloski, M.J., Sharp, A.H., Schilling, G., Sabatini, D.M., Li, S., Ross, C.A., and Snyder, S.H. (1996). *Science* 273:503-507.
- ¹²⁸⁴ Richter, C. (1993). *FEBS letter* 325(1.2):104-107.
- ¹²⁸⁵ Levine, A., Pannel, R.L., Alvarez, M.E., Palmer, R., and Lamb, C. (1996). *Curr. Biol.* 6(4):427-437.
- ¹²⁸⁶ Evan, G., Brown, L., Whyte, M., and Harrington, E. (1995). *Current Opinion in Cell Biology* 7:825-834.
- ¹²⁸⁷ Amati, B., Littlewood, T.D., Evan, G.I., and Land, H. (1993). *EMBO, J.* 12(13):5083-5087.
- ¹²⁸⁸ Evan, G., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). *Cell* 69:119-126.
- ¹²⁸⁹ Colombel, M., Olson, C.A., Ng, P and Buttyan, R. (1992). *Cancer Research* 52:4313-4319.
- ¹²⁹⁰ Freeman, R.S., Estus, S., and Johnson, M. Jr. (1994). *Neuron* 12:343-355.
- ¹²⁹¹ Hoang, A.T., Cohen, K.J., Barrett, J.F., Bergstrom, D.A., and Dang, C.V. (1994 *P.N.A.S.* 91:6875-6879.
- ¹²⁹² Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., and Greenberg, A.H. (1994). *Science* 263:1143-1145.
- ¹²⁹³ Smeynes, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Roberson, L.M., Curran, T., and Morgan, J.I. (1993) *Nature* 363:166-169.
- ¹²⁹⁴ Roffler-Tarlov, S., Brown, J.J.G., Tarlov, E., Stolarov, J., Chapman, D.L., Alexiou, M., and Papaicannou, V.E. (1996). *Development* 122:1-9.
- ¹²⁹⁵ Clarke, A., Maandag, E., Van Roon, M., Van der Lugt, N., Van der Valk, M., Hooper, M., Berns, A., and Te Riele, H. (1992) *Nature* 359:328-330. Lee, E.H., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. (1992). *Nature* 359:288-294. Jacks, T., Fazeli, A., Schmith, E., Bronson, R., Goodell, M., and Weinberg, R. (1992). *Nature* 359:395-300.
- ¹²⁹⁶ Haas-Kogan, D.A., Kogan, S.C., Levi, D., Dazin, P., Tang, A., Fung, Y.K., and Israel, M.A. (1995). *EMBO, J.* 14:461-472.
- ¹²⁹⁷ Janicke, S.U., Walker, P.A., Lin, X.Y., and Porter, A.G. (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO, J.* 15(24):6969-6978.
- ¹²⁹⁸ Bates, S., and Vousden, K.H. (1996). *Current Opinion in Genetics and Development* 6:12-19.
- ¹²⁹⁹ Macleod, K.F., Hu, Y., and Jacks, T. (1996). *EMBO, J.* 15(22):6178-6188.
- ¹³⁰⁰ Miyashita, T., and Reed, J. (1995) *Cell* 80:293-299.
- ¹³⁰¹ Caselles, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1994). *Nature* 370:220-226.
- ¹³⁰² Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., and Croce, C.M. (1994) *Cancer Research* 54:2095-2097.
- ¹³⁰³ Miyayashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J. (1994). *Oncogene* 9:1799-1805.
- ¹³⁰⁴ Shen, Y., and Shenk, T. (1994). *P.N.A.S.* 91:8940-8944.
- ¹³⁰⁵ Rowan, S., Ludwig, R.L., Haupt, Y., Bates, S., Lu, X., Oren, M., Vousden, K.H. (1996). *EMBO, J.*
- ¹³⁰⁶ O'Reilly, L.A., Huang, D.C.S., and Strasser, A. (1996). *EMBO, J.* 15(24):6979-6990.
- ¹³⁰⁷ Brady, H.J.M., Gil-Gómez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J.M. (1996). *EMBO, J.* 15(24):6991-7001.
- ¹³⁰⁸ Inaba, T., Inukai, T., Yoshihara, T., Seyschab, H., Ashmun, R.A., Canman, C.E., Laken, S.J., Kastan, M.B., Look, T. (1996). *Nature* 382:541-544.
- ¹³⁰⁹ Metzstein, M.M., Hengartner, M.O., Tsung, N., Ellis, R. and Horvitz, H.R. (1996). *Nature* 382:545-547.
- ¹³¹⁰ Ramirez-Solis, R., Davis, A.C., and Bradley, A. (1993). *Methods in Enzymology* 225. Guide to techniques in mouse development. pp 855-870.
- ¹³¹¹ Robertson, E.J. (1987). *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach.* IRL Press, Oxford, England.
- ¹³¹² Coucouvanis, E. and Martin, G.R. (1995). *Cell* 83:279-287.
- ¹³¹³ El-Shershaby, A.M., and Hinchliffe, J.R. (1974). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31:643-654.
- ¹³¹⁴ Parchment, R.R. (1993). *Int. J. Dev. Biol.* 37:75-83.

- Gramzinski, R.A., Parchment, R.E., and Pierce, G.B. (1990). *Differentiation* 43:59-65.
- Linney, E. (1992). *Current Topics in Dev. Biol.* 27:309-349.
- Morris-Kay, G. (1993). *BioEssays* 15(1):9-15.
- Maden M., and Holder, N. (1992). *BioEssays* 14(7):421-458.
- Linney, E. (1992). *Current Topics in Dev. Biol.* 27:309-349.
- Nagy, L., Thomazy, V.A., Shipley, G.L., Fesus, L., Lamph, W., Heyman, R.A., Chandrarana, R.A. and Davies, P.J. (1995). *Mol. Cell. Biol.* 15:3540-3551.
- Howard, M.K., Burke, L.C., Mailhos, C., Pizzey, A., Gilbert, C.S., Lawson, D., Collins, M.K.L., Thomas, N.S.B., and Latchman, D.S. (1993). *J. Neurochem.* 60:1783-1791.
- Piacentini, M., Fesus, L., and Melino, G. (1993). *FEBS* 320(2):150-154.
- Helmsberg, A., Auphan, N., Caelles, C. and Karin, M. (1995). *EMBO J.* 14(3):452-460.
- Zhang, L., Mills, K.J., Dawson, M.I., Collins, S.J., and Jentsch, A.M. (1995). *J. Biol. Chem.* 270(11):60 22-6029.
- Alles, A.J., and Sulik, K.K. (1989). *Teratology* 40:163-171.
- Osumi-Yamashita, N., Iseki, S., Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Taniguchi, S., Doi, H., and Eto, K. (1992). *Develop. Growth & Differ.* 34(2):199-209.
- Lee, K.K., Yung, W.T., Kung, J.L., Ng, J.L., and Chan, K.S. (1994). *Dev. Dyn.* 201:297-309.
- Steinman, H.M. (1995). *J. Biol. Chem.* 270(8):3487-3490.
- Sun, Y., and Obeery, L.W. (1996). *Free Rad. Biol. Med.* 21(3):335-348.
- Schick, M.R., Nguyen, V.Q., and Levy, S. (1993). *J. Immunol.* 151:1918-1925.
- Ishii, T., Bannai, S., and Sugita, Y. (1981). *J. Biol. Chem.* 256:113.
- Rabizadeh, D., Oh, J., Ord, T., Zhong, L., Yang, J., Butler, C., Butcher, L.L. and Bredesen, D.E. (1993). *Science* 261:245-348.
- Shimizu, S., et al. (1995). *Nature* 374:814-816
- Uwe Hobohm and Chris Sander. (1995). *J.Mol.Biol.* 251:390-399
- Rossant, J., Zimigib, R., Cado, D., Shago, M., and Giguere, V. (1991). *Genes & Dev.* 5:1333-1344.
- Middleton, G., Nunez, G., and Davies, A.M. (1996). *Development* 122:695-701.
- Knaudson, C.M., Tung, K.S.K., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A.J., and Korsmeyer, S.J. (1995). *Science* 270:96-99.
- Cortazzo, M., and Schor, N.F. (1996). *Cancer Research* 56:1199-1203.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, Jiyang, Peng, T., Jones, D.P., Wang, X. (1997). *Science* 275:1129-1132. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, Ella, Green, D.R. (1997). *Science* 275:1132-1136.
- Muchmore, S.W. et al. (1996). *Nature* 381:335.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N., and Kuroiwa, A. (1996). *BMP media PCD en limb. Development* 122:3725-3734.
- Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., and Lumsden, A. (1994). *Nature* 372:684-686.
- Monsoro-Burg, A., Duprez, D., Watable, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P., and Le Douarin, N. (1996). *Development* 122:3607-3616.
- Francis, P.H., Richardson, M.K., Brickell, P.M., and Tickle, C. (1994). *Development* 120:209-218.
- Savatier, P., Huang, S., Szekely, L., Wiman-KG., and Samarut, J. (1994). *Oncogene* 9(3):809-818.
- Corbet, S.W., Gledhill, S., Clarke, A.R., Bird, C.C., and Wyllie, A.H. (1995). *J. Cell. Biochem.* 59:270.
- Ferrari, G., Yan, C.Y.I. and Green, L. (1995). *NAC J. Neuroscience* 15:2857-2866.
- Edgar, B.A., and Lehner, C.F. (1996). *Science* 274:1646-1642.
- Raft, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D. (1993). *Science* 262:695-700.
- Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y., and Martinou, J.C. (1992). *Science* 258:302-304.

IX. APENDICE

PUBLICACION 2

Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation.

S. Castro-Obrégón, L. Covarrubias*

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received 22 January 1996

Abstract Embryonic stem (ES) cells are a suitable system to study events occurring during development. In the present work we show that the apoptotic program was activated in ES cells, either by simple removal of the reducing agent 2-mercaptoethanol (2-ME), or by addition of *all trans*-retinoic acid (ATRA) to embryoid bodies. In these two conditions, there was an increase in reactive oxygen species and antioxidants such as catalase, superoxide dismutase or phenol prevented ATRA-induced cell death. Neuronal differentiation was observed when undifferentiated ES cells were treated with ATRA in the absence of serum and the presence of 2-ME.

Key words: Embryonic stem cell; Cell death; Neuronal differentiation; Retinoic acid; Oxidative stress

1. Introduction

Retinoic acid (RA) is a molecule with a broad biological activity present in all vertebrates. Clear effects of RA have been observed when systemically injected in pregnant mice [1], or when applied during specific processes such as limb and neural tube development [2,3]. Cellular responses to RA in vitro range from cell death to differentiation. RA-induced cell death with characteristics of apoptosis has been observed in several cell lines such as HeLa and HL-60 [4]. On the other hand, RA-induced differentiation has been observed, for instance, in embryonal carcinoma cells which differentiate into extra-embryonic endoderm-like cells or neuroectoderm derivatives such as neurons and astrocytes [5,6]. Although the ability of RA to regulate gene expression is well characterized, the mechanisms following this event are not known. In general, both RA-induced cell death and differentiation are mediated by specific nuclear receptors [7,8].

Oxidative stress has been proposed as a major mediator of apoptosis, since many agents which induce apoptosis are either oxidants or stimulators of cellular oxidative metabolism [9]. Accordingly, in several systems, apoptosis can be inhibited by antioxidants and enzymes involved in the catabolism of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide dismutase (SOD) and catalase [10-12]. In addition, Kane et al. [13] have shown that the expression of the antiapoptotic gene *bcl-2*, correlates with a decrease in the amount of ROS. Nevertheless, it has recently been shown that BCL-2 can also protect

from death in hypoxia [14,15], where ROS are not produced, consistent with the idea that oxidative stress acts as a transducing signal rather than being part of the death machinery.

In this work we found that mouse ES cells (AB1 line) are under constitutive oxidative stress, and that a high level in ROS correlated with apoptotic cell death. Embryoid bodies (EB) derived from ES cells underwent apoptosis in response to *all trans*-RA (ATRA), concomitant with a rise in ROS level. In agreement with the role of ROS in cell death, addition of catalase, SOD or phenol increased cell survival. ATRA also induced neuronal differentiation but, in contrast to other reports, EB formation was not required, and 2-mercaptoethanol (2-ME) favored the survival of differentiated cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and survival analysis

Undifferentiated ES cells were maintained on a fibroblastic feeder layer, as described by Robertson [5]. Culture medium was: DMEM complemented with 15% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 μ M 2-ME. To evaluate the role of 2-ME, undifferentiated cells were cultured at 10^5 cells/ml density, without the feeder layer, on 60 mm plates over-night. Plates were washed twice with PBS before removal of 2-ME and, 48 h later, cells were trypsinized (0.25% trypsin) 10 min, resuspended in PBS and trypan blue stained; blue versus white cells were scored. To form EB we followed the protocol previously described [5]. Briefly, ES cells at 10^5 cells/ml density were seeded on a bacterial plate in the presence or absence of 100 nM ATRA (Sigma) during 3 days. The formed cell aggregates were transferred to a graph tissue culture plate (where they attach) in medium without ATRA; a day after, the number of colonies formed, which is proportional to viability, were counted. Antioxidants were added simultaneously with ATRA to the following final concentrations: 100 μ g/ml (380 U/ml) bovine SOD (EC 1.15.1.1; Sigma); 1 mg/ml (25,000 U/ml) bovine catalase (EC 1.11.1.6; Sigma) and 0.005% v/v phenol (Boehringer-Mannheim). SOD was denatured by incubation in boiling water during 30 min. Differentiation was evaluated in cells derived from EB, generated with or without ATRA, after they were cultured attached for several days as described by others [5,6,16].

2.2. DNA fragmentation and nuclei morphology analysis

In all cases DNA was extracted after 2 days of culture as follows. Cells were lysed with Lysis Buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.5% Sarcosyl, 0.5 mg/ml Proteinase K) during 1 h at 50°C. Then, 15 mg/ml RNaseA was added and incubated for 1 h at 50°C. Finally, fragmented DNA was enriched by centrifugation at 13,000 \times g during 20 min. The supernatant was run on a 1.2% agarose gel, transferred to a nylon filter and revealed by hybridization with 32 P-labeled total DNA. For nuclear morphology analysis, unfixed cells were stained with 20 μ g/ml DAPI (Molecular Probes) for 5 min and immediately photographed.

2.3. ROS quantification by DCF

Undifferentiated cells (with or without 2-ME, and with or without ATRA) or 7 days EB (generated with or without ATRA) were cultured on 24-wells plates for 48 h. Wells were washed twice with PBS before adding 1 μ g/ml 2',7'-dichlorofluorescein (Molecular Probes), which is a compound that fluoresces when reacts with

*Corresponding author. Fax: (52) (73) 172388.
E-mail: covs@ibt.unam.mx

Abbreviations: ES, embryonic stem; 2-ME, 2-mercaptoethanol; ATRA, *all trans*-retinoic acid; EB, embryoid bodies; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; DCF, dichlorofluorescein diacetate; RA, retinoic acid.

ROS, such as superoxide, peroxide and hydroxyl radicals. Plates were read on a Cytofluor 2300 plate reader (Millipore) with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm, after 15 min of incubation [13].

2.4. Induction of neuronal differentiation

Undifferentiated cells were seeded directly on tissue culture plates with a defined medium (F12/DMEM, GIBCO; 25 µg/ml insulin; 100 µg/ml transferrin; 20 nM progesterone; 60 µM putrescine; 30 nM sodium selenite) and in the presence of 100 nM ATRA and 100 µM 2-ME. For the immunocytochemistry analysis, cells were fixed in methanol at -20°C for 30 min and washed twice in PBS. The cells were incubated 1 h with a rabbit anti-150 kDa rat neurofilament antibody (Chemicon) diluted 1:400 in 0.1 M TBS (0.1 M Tris; 24.9 mM NaCl; pH 7.6), 0.5% non-fat milk and 1% Triton (TBS/M-T). The following rinses and incubations were performed: 3 rinses (10 min each) with TBS/M-T, 30 min incubation with biotinylated anti-rabbit antibody diluted 1:300 from Vectastain elite ABC kit (Vector Laboratories), 3 rinses (10 min each) with TBS/M-T, 30 min incubation with avidin-biotin complex, 3 rinses (10 min each) with TBS and developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.5 mg/ml) for 8 min.

3. Results

3.1. ES cell death is associated with oxidative stress

2-ME is a common constituent of ES cell culture medium. Since 2-ME is a reducing agent, we reasoned that it is probably needed for survival by keeping the ROS levels low in ES cells. In agreement with this hypothesis, after three days of culture in the absence of 2-ME, 75% of the cells died, as shown in Fig. 1A. This death shared features of apoptosis such as nucleus fragmentation (not shown) and internucleosomal DNA degradation (Fig. 2A). The loss of viability correlated with a significant increase in ROS, as measured by DCF fluorescence (Fig. 3A). These results suggest a relationship between a burst of oxidative stress and the onset of ES cell death.

We also observed ES cell death when we added ATRA during EB formation, a condition in which ES cells undergo stochastic differentiation, even in the presence of 2-ME. The loss of viability in response to ATRA was estimated by the ability to form colonies in a tissue culture plate (Fig. 1B). As can be seen in Fig. 4, many cells looked apoptotic instead of differentiated. Accordingly, internucleosomal DNA degradation (Fig. 2A) and nucleus integrity, as determined by DAPI staining (Fig. 2B), were typical of cells undergoing apoptosis. To establish if ATRA-induced apoptosis is also mediated by oxidative stress, we quantified intracellular levels of ROS by DCF fluorescence. We found a significant accumulation of ROS in the presence of ATRA only when cells were grown as EB, the condition in which cell death was observed (Fig. 3B). To evaluate the contribution of ROS in the progression of cell death, we added enzymes involved in antioxidant pathways, such as SOD and catalase, to ATRA-treated cultures. At the third day, more colonies formed, than in cultures treated with ATRA alone, when SOD, catalase or SOD plus catalase were added (Fig. 1B). Addition of phenol to cultures treated with ATRA also increased the number of colonies formed (Fig. 1B).

In order to determine whether ATRA-induced death depends on events occurring during EB formation, ATRA was added to cells seeded directly in a tissue culture plate. In this condition, cells proliferated and formed colonies instead of dying (Fig. 5A); as expected, an increase in ROS was not observed (Fig. 2B). Therefore, ATRA is able to induce apoptosis only in cells that have formed or are forming EBs. The inability of undifferentiated ES cells to undergo ATRA-induced death was not due to the lack of response to ATRA; induction of neuronal differentiation by ATRA (described below), and the activation of ATRA responsive genes, such as the tissue non-specific alkaline phosphatase gene (Escalante-Alcalde observation), were observed.

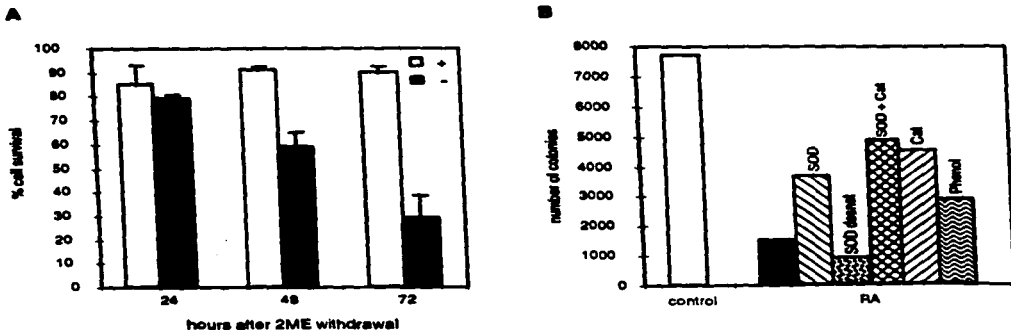


Fig. 1. Viability of ES cell in either the absence of 2-ME or the presence of ATRA. (A) Loss of viability by 2-ME withdrawal. Viability was determined by trypan blue exclusion; cells were grown with (+) or without 2-ME (-). The percentage of live cells with respect to the total number of cells is represented; a mean of 4 independent experiments is shown (error bars represent the standard deviation). (B) Loss of viability in the presence of ATRA during EB formation. Viability was determined at the third day of culture by the ability of EB cells to form colonies, which is proportional to the number of live cells. EB were grown in the absence (control) or presence of ATRA (RA), plus the indicated antioxidant: SOD, 100 µg/ml bovine SOD; SOD desnat, 100 µg/ml boiled bovine SOD; SOD+Cat, 100 µg/ml bovine SOD plus 1 mg/ml bovine catalase; Cat, 1 mg/ml bovine catalase; Phenol, 0.0075% v/v phenol. The average of two independent experiments is shown.

3.2. RA induces neuronal differentiation from undifferentiated ES cells

It has been reported that EC as well as ES cells can differentiate to neurons, when EB are treated with ATRA [5,16]. Using these conditions we were not able to see cells with neuron morphology. In addition, in cultures of undifferentiated ES cells (i.e. without the formation of EBs) treated with ATRA in the presence of serum, cells with differentiated morphology were not observed (Fig. 5A). Then, we decided to culture undifferentiated ES cells in a defined medium supplemented with ATRA and 2-ME for 2-5 days. In this latter condition, a mean of 15 neuron-like cells per mm², immunopositive for neurofilament-M protein, were observed (Fig. 5B); these immunopositive cells were not observed in the absence of 2-ME (Fig. 5C). Therefore, serum inhibits differentiation in our system, and 2-ME may serve as a survival factor for the neurons obtained.

4. Discussion

In the present work we observed in ES cells a relationship between a burst in oxidative stress and the onset of apoptotic death, either by simple removal of 2-ME from the medium, or by addition of ATRA during EB formation. Gramzinski et al. (1990) have shown that certain embryonic carcinoma cell lines injected in the blastocoelum die by oxidative stress, and that catalase is able to protect them [12]. This latter result is relevant, since ES cells are derived from the inner cell mass and, therefore, the line used in the present report may represent a cell population of the blastocyst sensitive to oxidative stress. However, the role of oxidative stress in ES cell death must result from a combination of factors, as we have not been able to reproducibly protect ES cells with other antioxidants (e.g. phe-



Fig. 2. ES cell death shares features of apoptosis. (A) Internucleosomal DNA degradation. UD, undifferentiated cells; 1, DNA from undifferentiated control cells; 2, DNA from undifferentiated cells grown in the absence of 2-ME; EB, embryoid bodies; 3, DNA from EB grown in the absence of ATRA; 4, DNA from EB grown in the presence of ATRA. Lambda DNA digested with *HindIII* was used as a molecular weight marker; only relevant sizes are shown (a, 2027 bp; b, 564 bp). The arrow indicates the origin of electrophoretic migration. (B) Nucleus morphology after staining with DAPI of EB cells treated with (+RA) or without ATRA (-RA).

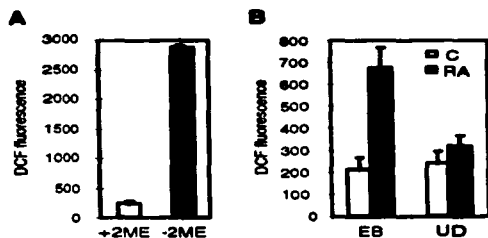


Fig. 3. Onset of cell death correlates with an increase in oxidative stress. (A) 2-ME prevents a burst of ROS in undifferentiated cells. (B) ATRA induces oxidative stress in EB cells (EB), but not in undifferentiated cells (UD). Cells were grown in the absence of ATRA (C) or in the presence of ATRA (RA); fluorescence units are arbitrary. The mean of 2 independent experiments done by quadruplicate are shown (error bars represent the standard deviation).

nol, tyrosine, N-acetyl-cysteine, glutathione, dithiothreitol). Intracellular iron concentration is one of such factors which 2-ME may affect reducing the iron regulatory protein [17].

4.1. ATRA as activator of oxidative stress

Although several reports have shown the ability of retinoic acid (RA) to induce apoptosis, there is no precedent for the activation of oxidative stress in these systems. Zhang et al. [8] have shown that gene expression of tissue transglutaminase, an enzyme thought to keep the integrity of cell membranes during apoptosis, is activated by RA. However, the relevance of this data is questionable, as it is unlikely that this enzyme acts at the activation step of apoptosis. Recently, repression was suggested as the mechanism by which RA induces cell death [18]. If the latter hypothesis is true, it would be possible that genes coding for enzymes such as SOD or catalase are targets of RA repression. It is also possible that ATRA-induced death could be due to the induction of differentiation, such as the new phenotypes now require specific survival factors. Nevertheless, this latter hypothesis is unlikely because observed cell death occurred in the presence of serum (15% v/v).

EB formation induces initially the differentiation of two major cell types: the outer layer of endoderm, and the inner cells of ectoderm. During cavitation, ectoderm further differentiate to a pseudostratified epithelial layer. At the present time, we do not know which of these two cell types are affected by ATRA. Recently, Coucouvanis and Martin [19] showed that a signal which promotes ectodermic cell death is produced by the endoderm, and that the survival of the ectodermic inner layer depends on interactions with the extracellular matrix (i.e. the basal lamina). The cell population affected by ATRA in our experiments should be different from the one involved in cavitation, as morphology of ATRA-treated EBs were largely altered showing an abnormal basal lamina (data not shown).

Generation of oxidative stress through an ATRA signaling pathway may be a mechanism used during development to activate cell death. Digit formation in amniotes is an example where areas of cell death are well defined (called 'necrotic

zones²). ATRA increases the necrotic zones when applied to embryos [1] and, recently, it has been shown that ATRA induces cell death in explants of the interdigital region [20]. In agreement with our hypothesis, ATRA induces a subtle increase in ROS levels in primary cultures of limb cells (Salas-Vidal observation). Also, we have observed oxidative stress in the interdigits *in vivo*, as well as inhibition of interdigital cell death when limb explants were cultured in the presence of antioxidants (Salas-Vidal et al., submitted for publication).

4.2. Neuronal differentiation by ATRA

In general, it has been proposed that to efficiently activate cell differentiation from ES cells it is necessary first to form EB. Then, EB can differentiate further within certain lineages by treatment with specific growth factors or substances such as DMSO or ATRA. Neuronal differentiation has been obtained using this protocol from ATRA treated EB of EC [6] or ES cells [16]. In contrast with these reports, we were able to induce neuronal differentiation from ES cells without the need of EB formation. Our success was due to the removal of serum and the addition of 2-ME in the differentiation medium. Serum was likely inhibiting differentiation by promoting proliferation, as it has been shown in other systems [21]. 2-

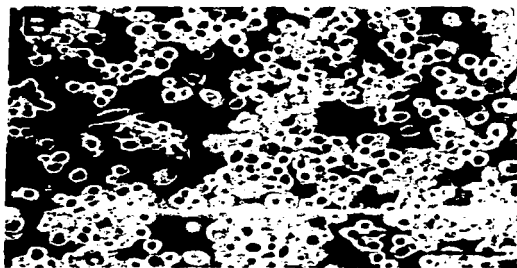
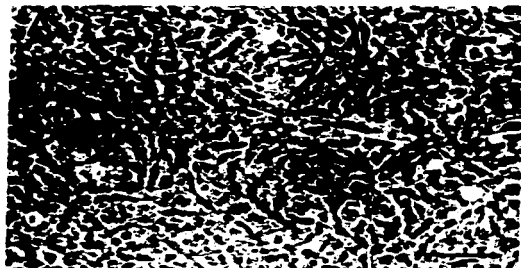


Fig. 4. Morphology of EB cells after seeding in a tissue culture plate. (A) EB formed in the absence of ATRA; (B) EB formed in the presence of ATRA. Refringent cells (a feature typical of apoptosis) appear only in the presence of ATRA. Bar = 50 μ m.

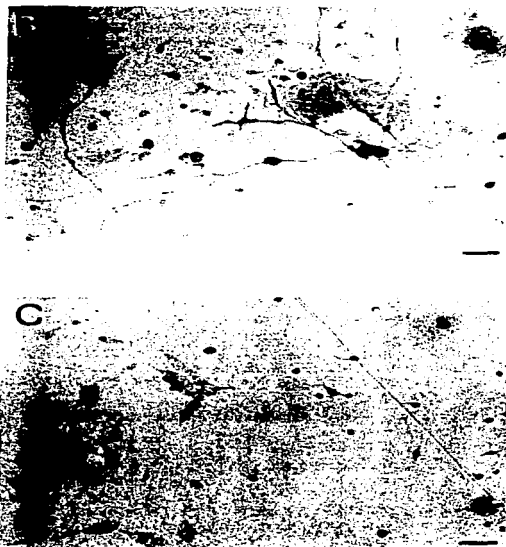
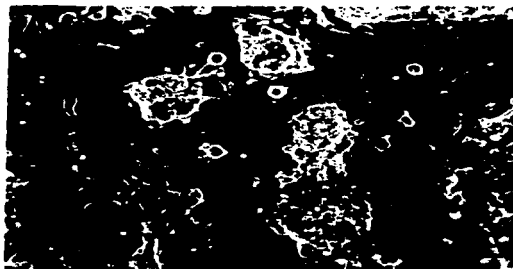


Fig. 5. ATRA-induced neuronal differentiation from undifferentiated ES cells. (A) Appearance of culture treated with ATRA in the presence of fetal bovine serum. In this condition cells survive and proliferate, but differentiated cells were not observed. (B) Neuron-like cells induced by ATRA in the absence of serum and the presence of 2-ME. Immuno-positive for neurofilament-M protein cells were analyzed by light bright microscopy. (C) Absence of immuno-positive cells for neurofilament-M protein in cultures treated with ATRA, without 2-ME in the medium. Bar = 50 μ m.

ME, on the other hand, could be substituting specific survival factors for the neurons obtained, perhaps through its reducing activity. The role of oxidative stress on death of neurons deprived of survival growth factors has been demonstrated in other systems [22,23]; specifically, 2-ME has been shown to support the survival and maturation of fetal mouse neurons [23]. The ability to induce neuron differentiation by simply adding ATRA directly to undifferentiated ES cells should be very useful, as it provides a short time-consuming experimental system for studies, such as the molecular analysis of neurogenesis, or the pre-screening of mutants affecting neuronal differentiation produced by gene-trap in ES cells.

In summary, we found that ATRA can elicit different responses in ES cells. ES cells die when ATRA is added during EB formation, but differentiate to neurons if added directly to undifferentiated cells. Apoptosis induced by ATRA may operate by a mechanism activated by ROS, as suggested not only by their presence, but also because ROS removal by SOD, catalase or phenol resulted in increased viability. Our system will be useful to determine the receptors involved and the mechanism by which ATRA alter ROS levels.

Acknowledgements: We thank to Drs. Hilda Lomeli, Alejandro Zentella and Nina Pastor for the critical reading and discussion of this manuscript. The present work was supported by PADEP-UNAM (030401) and PAPIID/DGAPA-UNAM (IN-202995).

References

- [1] Alles, A.J. and Sulik, K.K. (1989) *Teratology* 40, 163-171.
- [2] Tickle, C., Alberts, B. and Lee, J. (1982) *Nature* 296, 564-566.
- [3] Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. and Jessell, T.M. (1991) *Cell* 64, 635-647.
- [4] Nagy, L., Thomazy, V.A., Shipley, G.L., Fesus, L., Lamph, W., Heyman, R.A., Chandraratna, R.A. and Davies, P.J. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 3540-3551.
- [5] Robertson, E.J. (1987) in *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*, (Robertson, E.J. Ed.) Embryo derived stem cells, pp. 104-108, IRL Press, Oxford-Washington, DC.
- [6] McBurney, M.W. (1993) *Int. J. Dev. Biol.* 37, 135-140.
- [7] Linney, E. (1992) *Current Topics in Dev. Biol.* 27, 309-349.
- [8] Zhang, L.X., Mills, K.J., Dawson, M.I., Collins, S. J. and Jetten, A.M. (1993) *J. Biol. Chem.* 270, 6022-6029.
- [9] Butke, T. M. and Sandstrom, P.A. (1994) *Immunology Today* 15, 7-10.
- [10] Chang, D.J., Rongold, G.M. and Heller, R.A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 538-546.
- [11] Wong, G.H., Elwell, J.H., Oberley, L.W. and Goeddel, D. V. (1989) *Cell* 58, 923-931.
- [12] Gramzinski, R.A., Farchment, R.E. and Pierce, G.B. (1990) *Differentiation* 43, 59-65.
- [13] Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R. Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T. and Bredesen, D. (1993) *Science* 262, 1274-1277.
- [14] Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1995) *Nature* 374, 811-813.
- [15] Jacobson, M. and Raff, M.C. (1995) *Nature* 374, 814-816.
- [16] Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E. and Gottlieb, D.I. (1995) *Dev. Biol.* 168, 342-357.
- [17] Mullner, E.W., Rothenberger, S., Muller, A.M. and Kuhn, L.C. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 597-605.
- [18] Heimberg, A., Auphan, N., Caillies, C. and Karin, M. (1995) *EMBO J.* 14, 452-460.
- [19] Coucouvanis, E. and Martin, G.R. (1995) *Cell* 83, 279-287.
- [20] Lee, K.K., Yung, W.T., Kung, J.L., Ng, J.L. and Chean, K.S. (1994) *Dev. Dyn.* 201, 297-309.
- [21] Lassar, A.B., Skapek, S.X. and Novitch, B. (1994) *Curr. Op. Cell Biol.* 6, 788-794.
- [22] Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L., Johnson, E. M. (1995) *Neuron* 14, 303-315.
- [23] Hori, K., Katayama, M., Sato, N., Ishii, K., Waga, S. and Yodoi, J. (1994) *Brain Res.* 652, 304-310.

PUBLICACION 3

(Sometido a Experimental Cell Research)

Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death

Enrique Salas-Vidal, Hilda Lomelf, Susana Castro-Obregón, Rodrigo Cuervo, Diana Escalante-Alcalde and Luis Covarrubias*

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

Running title: ROS in the control of mouse embryonic cell death

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

**Dr. Luis Covarrubias
Departamento de Genética y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología/ UNAM
AP 510-3
Cuernavaca, Mor. 62271
MEXICO**

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

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

Cell death is a ubiquitous biological phenomenon that naturally occurs during development, T and B cell negative selection and normal cell turnover in the adult organism (Schwartzman and Cidlowski, 1993). This naturally occurring cell elimination depends on a latent program for which a variety of signals have evolved to counteract the "death fate" (Raff *et al.*, 1993). The extracellular milieu (*i.e.* diffusible factors, cell-cell contact or extracellular matrix) have a decisive role, contributing with survival factors or determining the internal cell state which establish the degree of sensitivity to a given death stimulus.

One of the mechanisms thought to trigger programmed cell death is the accumulation of reactive oxygen species (ROS) (McConkey and Orrenius, 1988). The increase in ROS levels has been correlated with cell death which is caused by growth factor deprivation (Greenlund *et al.*, 1995), or by killing signals such as the tumor necrosis factor (Goossens *et al.*, 1995). Accordingly, the addition of antioxidants (Matthews *et al.*, 1987) or the overexpression of superoxide dismutase (Greenlund *et al.*, 1995) have proved to protect from cell death in different systems. In fact, cell death can be induced by treating cells with low concentrations of hydrogen peroxide (Lennon *et al.*, 1991) and role of ROS, in particular superoxide, have been established in several animal diseases (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996; Morel *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1995; Busciglio and Yanker, 1995). It is important to note that, since cell death can occur in the absence of ROS (Jacobson and Raff, 1995; Shimizu *et al.*, 1995), it is unlikely that generation of oxidative stress is an essential event of the execution phase of death mechanism; rather, ROS may act in the activation phase, transducing signals from the extracellular environment. (Jacobson, 1996).

Programmed cell death plays an essential role during the morphogenesis of a large number of embryony structures (Glucksmann, 1951; Saunders, 1966). A classic

example are the so called "necrotic zones" described in developing limbs. Among these areas of cell death, those that define the interdigits are the most obvious. Candidate factors playing a role in interdigital cell death have been inferred from their expression pattern. For instance, the retinoic acid receptor- β (Mendelsohn *et al.*, 1992), the homeo box containing genes *msx1* (*Hox-7*) and *msx2* (*Hox-8*) (Coelho *et al.*, 1991; Coelho *et al.*, 1993), and several members of the bone morphogenetic protein (BMP) gene family (Francis *et al.*, 1994) are all expressed in the interdigital regions at the time cell death is taking place. Recently, it was shown that a dominant negative mutant of the type I BMP receptor is able to greatly reduce interdigital cell death and web regression (Zou and Niswander, 1996). However, for most of the molecules mentioned above there is no direct indication about their participation in the regulation of the cell death process.

In order to gain further insight into the possible mechanisms that trigger cell death during mouse development, we examined *in vitro* the effect of different antioxidants on mouse limb morphogenesis. We found that normal digit individualization can take place in our *in vitro* organ culture system, but can be blocked by the treatment with antioxidants. The lack of digit individualization correlated with a decrease in the number of dying cells, although two of the antioxidant tested (phenol and DMSO) also seemed to slow down the phagocytic stage of programmed cell death. Interdigits of antioxidant treated limbs stained for the chondrogenic markers peanut agglutinin and alcian blue. This suggests that surviving cells are able to initiate chondrogenesis. In agreement with the participation of oxidative stress in the control of cell death, levels of ROS were higher in the interdigital tissue, and other limb regions undergoing cell death, than in digits. More importantly, we observed that high ROS levels coincided with many embryo regions undergoing cell death. Therefore, the present study provides the first evidence suggesting that cell elimination during embryo morphogenesis could frequently be mediated by ROS.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mouse strain CD-1 was used in this study. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation at 12.5, 13.5 or 14.5 day *post coitum* (d.p.c; day 0.5 of conception was the day at which vaginal plug was found). The embryos were removed, and the dissected fore- and hind-limbs (in L15 medium; Microlab, México) were classified according to the limb bud staging system of Wanek *et al.* (1989).

this is not a procedure approved by NIH!

Limb culture

The protocol used to culture embryonic limbs was based on the one used by Taketo and Koide (1981) to culture embryonic gonads. Briefly, the staged mouse embryo limbs were cultured on 0.45 μm pore Durapore membrane filters (Millipore) floating on McCoy's 5a modified medium (Microlab, Mexico) without serum and supplemented with 200 U/ml of penicillin G sodium, 200 mg/ml streptomycin sulfate and 2 μM glutamine (GIBCO, USA). Water-saturated phenol (Boehringer-Mannheim), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA) or 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDHF-DA, Molecular Probes, USA) were added to the media just before culture. Cultures were maintained at intervals of 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hr in a humidified 5% CO_2 -95% atmospheric air incubator at 37°C.

FCS?

Analysis of cell death

Vital dye stainings. Regions of cell death of freshly dissected or *in vitro* cultured embryonic tissues, were visualized by staining with acridine orange (AO; Sigma, USA) as described by Abrahams *et al.* (1993). Briefly, the tissues were rinsed in phosphate buffered saline (PBS: 0.02% KH_2PO_4 , 0.115 Na_2HPO_4 , 0.8% NaCl, 0.02% KCl, pH7.4).

what a formulation!

and stained with 5 µg/ml of AO in PBS for 30 min at 37°C, and observed under standard fluorescence microscopy to visualize the regions undergoing cell death. For more detailed studies, the tissues were analyzed by confocal microscopy as described below. Alternatively, tissues were stained with 2.5 mg/ml propidium iodide (PdI) in PBS for 30 min at 37°C (Nicoletti *et al.*, 1991). This latter staining was especially useful for the double staining with the fluorogenic redox sensitive dye (see below).

Detection of DNA fragmentation. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL; Gavrieli *et al.*, 1992) method for detection of fragmented DNA using fluorescinated dUTP (Boehringer-Mannheim, Germany) was performed in 4% paraformaldehyde fixed-paraffin embedded 10 µm serial sections of complete forelimbs, according to the manufacturer. The complete series were analyzed and photographed (X100 magnification). Representative prints were selected.

Cartilage histochemistry

Staining with the precartilaginous indicator peanut agglutinin was performed as described by Hurler *et al.* (1989). Briefly, tissues were fixed in acetic acid:ethanol (1:1) for 1 hr at 4°C and, following dehydration, embedded in paraffin over-night. Deparaffinized 16 µm sections were then incubated for 30 min in the dark with fluorescein isothiocyanate-coupled peanut agglutinin (Vector Laboratories, USA) at a concentration of 20 µg/ml in 10 mM HEPES, pH 7.5, 0.15 M NaCl. The slides were then washed in PBS, mounted in 50% glycerol in PBS and visualized by confocal microscopy.

Skeletal preparations were made following the procedure described by Wallin *et al.* (1994), with some modifications to make the staining specific for highly sulfated proteoglycans, characteristic of cartilage (Lev and Spicer, 1964; Leonard *et al.*, 1989). Briefly, limbs were fixed in 99% ethanol for 24 hr, then incubated in the postfixing solution (3% acetic acid, adjusted to pH 1.0 with HCl) overnight, and finally in the staining solution (0.5% alcian blue in postfixing solution) at 37°C for 24 hr. Samples were

washed in the postfixing solution over-night and then rinsed in water and cleared with 1% potassium hydroxide and 20% glycerol in water at room temperature. For long term storage, specimens were sequentially transferred into 50%, 80%, and 100% glycerol.

In situ detection of ROS

For ROS detection, limb buds or complete embryos at different stages of development were incubated with the ROS sensitive dyes immersed or floated on a Nucleopore polycarbonate filter (Costar, USA) under tissue culture conditions. We used the tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA] at 50 µg/ml (in McCoy's 5a modified medium), for the detection of intracellularly-generated superoxide (Burdon *et al.*, 1993); 2 to 8 hr of staining was required. The fluorogenic compounds DCDHF-DA and C-DCDHF-DA [2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate and 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate bis(acetoxymethyl)ester; respectively; Molecular Probes, USA] at 1 µg/ml (in PBS) were used for ROS detection, with similar results; 45 min of staining was optimal for the lowest background.

Confocal laser scanning microscopy

Developing limbs were imaged with the Bio-Rad MRC-600 confocal laser scanning system equipped with a krypton/argon laser and coupled to an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) with PlanNeofluar X5 (aperture 0.15), X10 (aperture 0.30) and X20 (aperture 0.5) objectives. AO or DCDHF-DA stained tissues were excited with blue light (488 nm), and the red high sensitivity filter was employed for AO fluorescence detection, or the blue high sensitivity filter for DCDHF-DA fluorescence detection. The pinhole aperture was maintained at 0.3. Serial optical sections were produced at 15 µm (X5 and X10) or 6 µm (X20). To analyze whether oxidative stress and cell death occur in the same cell at the same time, double staining with DCDHF-DA and PdI was carried

out and analyzed by confocal microscopy using the K1-K2 set of filters, and merging the images from the two dyes (DCDHF-DA in green, and PdI in red).

Light and electron microscopy

Tissues were fixed in Karnovsky's aldehyde solution (Karnovsky, 1965), postfixed with 1% OsO₄ in Zetterqvist's buffer (Zetterqvist, 1956) and embedded in EPON 812. Semithin sections (1μm) were stained with toluidine blue. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and viewed in a Zeiss electron microscope (EM900).

Image analysis

Confocal images were displayed on a Power Macintosh computer using the public domain NIH IMAGE 1.6 program (developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) and saved in TIFF format. Then, these images were displayed on Adobe Photoshop (version 3.02), the contours were delineated (continuous line for the image of limbs cultured for 24h in control media, and dotted lines for treatments or other lengths of time of tissue culture in control media). Images of interest (with dotted line contour) were overlaid on the image of limbs cultured for 24hr in control media (continuous line contour), and the overlying image opacity was reduced to 50%. Overlying image was then rotated and moved vertically and horizontally until wrist and middle digit were aligned with underlying image.

RESULTS

Antioxidants prevents interdigital cell death

Mouse embryo fingers and toes are initially connected by soft tissue. In the mouse, the interdigital tissue begins to degenerate at 13 d.*pc* and digit separation is completed by 14 d.*pc* (Waneck *et al.*, 1989; Martin, 1990). Cell death in this region proceeds through a mechanism with characteristics of apoptosis (Zakeri *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1995). We have cultured dissected fore- or hind-limbs just when interdigital regression has started [limb stages 9-10 (S9-S10), according to Waneck *et al.*, (1989); Mori *et al.*, 1995]. *In vitro*, interdigital web and skeleton develops as *in vivo* though at a slower rate (Salas-Vidal *et al.*, in preparation). Limbs cultured for 96 hr, for instance, exhibit both well-defined individualized digits and all skeletal elements (*i.e.* stage 12-13; data not shown). As expected, intense acridine orange (AO) staining, an indicator of apoptosis (Abrahams *et al.*, 1993), was restricted primarily to the interdigital regions, as well as the anterior and posterior margins of hand plate, throughout the *in vitro* limb development (Fig. 1). It is important to mention that during digit individualization, prospective digits grow and appear to separate from each other at the time web regression is taking place (Waneck *et al.*, 1989; Salas-Vidal *et al.*, in preparation). In our culture conditions digits separated as *in vivo* but growth was not observed (Fig. 2, top panel) therefore, *in vitro*, digit individualization is mainly due to web regression.

To investigate if oxidative stress plays a role in the interdigital regression, embryonic limbs were cultured with a variety of antioxidants [*e.g.* 2-mercaptoethanol, N-acetylcystein, dithiothreitol, phenol, dimethyl sulfoxide (DMSO)]. The best results were obtained with phenol or DMSO which clearly prevented web regression and digit individualization and, as detected by AO staining (Fig. 1) and TUNEL (Fig. 3), decreased the number of dying cells in the interdigital regions. The strength of the effect by these

two compounds was dose-dependent on both interdigital cell death (Fig. 1 and Fig. 3) and web regression (Fig. 2), suggesting that the antioxidants act directly on these processes. Note that even at the lowest dose tested, regression was reduced after 24 hr of treatment and was accompanied by less separated prospective digits, in close similarity to the stage reached by limbs cultured for 6 hr in control medium (Fig. 2, top panel). At the highest dose shown, phenol- or DMSO-treated limbs revealed a distinct zone of cell death at the tip of digits since 12 hr in culture, and an unspecific increase in cell death was especially observed after 24 hr in culture (Fig. 1). This observations could result from activation of the death program as a consequence of a redox imbalance caused by the antioxidants, especially in rapidly growing regions such as the tip of digits.

We also found that DCDHF-DA, a reagent that is known to react with ROS (see below,) was also capable of inhibiting interdigital cell death (Fig. 1 and Fig. 3) and web regression (Fig. 2) with a dose-dependent pattern. These data are indicative of a role of ROS in interdigital cell death. In general, lower unspecific effects on cell death were seen with this reagent compared to phenol or DMSO, although the effect on tip of digits was still observed at the highest dose tested.

Histological analysis on semithin sections stained with toluidine blue and electron microscopy preparations showed no general damage to tissues by antioxidants at the low and intermediate doses and up to 24 hr in culture, for DMSO and phenol, and up to 12 hr for DCDHF-DA (Fig. 4). Specifically, apical, dorsal and ventral epithelium were not apparently affected by antioxidants. However, many apoptotic bodies not contained in phagocytes were apparent after 6 hr of treatment with DMSO (Fig. 4C) or phenol (not shown) or but their number largely decreased after 24 hr (Fig. 4D); as shown in Fig. 3, these apoptotic bodies were not detected with the TUNEL technique indicating that DNA was completely degraded and, therefore probably represented "aged" apoptotic bodies. These results suggest that phenol and DMSO retarded, in addition to reduce the interdigital cell death, the phagocytic process encharged of removing the apoptotic bodies

present previous to the addition of antioxidants. With DCDHF-DA dying cells or "aged" apoptotic bodies were not detected, although signs of activation of cell death by this antioxidants were seen from 12 hr in culture (Fig. 4F); tissue architecture was obviously abnormal after 24 hr of culture with this antioxidant (not shown). Therefore, within the first half of treatment, it seems that DCDHF-DA has its major effect on preventing cell death with not detectable effects on phagocytosis. At the highest doses of phenol and DMSO, and especially after 24 hr in culture, cells in the interdigital tissue of treated limbs were more scattered, probably due to the deposition of extracellular matrix in agreement with the alcian blue staining pattern observed (see below); epithelium was not lost with these two reagents at any of the concentrations tested.

When antioxidants, including DCDFH-DA, were removed after 6 hr (Fig. 5) of treatment, the time at which an obvious decrease in dying cells was observed, interdigital regression was re-started; therefore, an irreversible damage to cell components did not occur.

Interdigits express chondrogenic markers

After 12 hr of culture, skeletal development was not largely affected by phenol or DMSO (Fig. 6). However, in limbs cultured with antioxidants for long periods (*i.e.* 96 hr), all skeletal elements were formed except the most distal phalanges (not shown). This effect could be related to the induced cell death observed at the tip of digits described above. Interestingly, staining with fluorescinated-peanut agglutinin (Fig. 7) and alcian blue (Fig. 6), both cartilage indicators, detected, in addition to digits, the interdigital areas of limbs that were treated with DMSO or phenol for 12 hr; this effect was seen with the intermediate and high doses of phenol and DMSO, and only with the highest dose of DCDHF-DA (not shown), in good correlation with the scattered pattern of interdigital

cells in treated limbs. The same results were obtained in limbs treated for 24 hr, but not in those treated for 6 hr (data not shown). These results are indicative of the chondrogenic potential of surviving cells at this location. However, *in situ* hybridization with an oligonucleotide probe for collagen type II, another chondrogenic marker, did not detect expression in other areas than phalanges and metacarpal elements (data not shown). As mentioned above, the apical epithelium was not affected by DMSO and phenol; therefore, chondrogenesis and cell survival were not due to the lack of this cell type as it has been reported earlier (Hurle and Gafian, 1986); in the case of DCDHF-DA treatments at the highest dose, damage to epithelium could be related to its chondrogenic effect. Lack of the characteristic chondrogenic condensations at interdigits of treated limbs (Fig. 4) could be responsible of incomplete chondrogenesis.

Higher ROS levels are found in the interdigital zones

Antioxidants could prevent interdigital cell death by either decreasing ROS concentration, or by protecting intracellular targets from the action of ROS. In both cases it should be expected higher ROS levels in interdigits than in digits. To determine ROS levels *in situ*, we used two redox sensitive dyes: 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and DCDHF-DA. The first preferentially detects superoxide (Rice-Evans *et al.*, 1991), whereas the second detects several ROS (Haugland, 1996; Greenlund *et al.*, 1995). (Freshly dissected limbs stained with either of these reagents revealed interdigits, as well as anterior and posterior margins of hand plate, as regions of the limb with a notably higher ROS level (Fig 8). Importantly, during *in vivo* limb development, the appearance of cells with high levels of ROS closely followed the pattern observed for AO, although fewer cells were detected (Fig. 8B). In antioxidant-treated limbs, these reagents were not able to detect an obvious decrease in interdigital

ROS levels (data not shown). This suggests that DMSO and phenol, not expected to act as ROS scavengers, are probably protecting from the action of ROS rather than decreasing their concentration. These results support the participation of oxidative stress in interdigital cell death.

Programmed cell death proceeds gradually through different stages up to the phagocytosis by neighboring cells. To determine whether or not cells under oxidative stress are at a different stage of apoptosis than those stained with AO or propidium iodide (PdI; another compound which preferentially stains dying cells), we performed a double staining with MTT and AO, or DCDHF-DA and PdI. We found that of the cells stained with MTT *in toto* or in squashed limbs, only 13% to 16% stained also with AO (Table 1). Double staining with DCDHF-DA and PdI was analyzed by confocal microscopy. The merging of images obtained with each dye shows that very few cells were stained with both DCDHF-DA and PdI (Fig. 9A; Table 1). Therefore, ROS probes and AO or PdI detect a different stage during the course of apoptosis (see Discussion).

ROS levels are higher in embryo regions that undergo cell death

Cell death is essential during the morphogenesis of a large number of embryonic structures. In order to assess how extensive the role of oxidative stress could be in developmental cell death, we probed whole mid-gestation embryos with MTT or DCDHF-DA and compared the resulting staining patterns with those structures undergoing cell death (visualized by AO staining). Overlapping AO and DCDHF-DA or MTT staining patterns were found in the fusion line of the developing palate and sternum, as well as in structures such as the developing eye and ear (Fig. 10). Similar results were obtained in other regions (data not shown), including the junctional zone between neural and surface ectoderm (8.5 d.p.c), the groove between lateral nasal process

and maxillary component of first branchial arch (10.5 d.*pc*), and the developing follicles of vibrissae and the tip of tail (13.5-14.5 d.*pc*). Furthermore, staining of the fusion line of the developing palate with PdI and DCDHF-DA showed, in concordance with the results obtained in interdigital regions, a low percentage of doubly stained cells (Fig. 9B). Of all analyzed regions, only the fusion line of the neural folds (8.5 d.*pc*) and the branchial arches (10.5 d.*pc*), which showed clear AO staining, have not stained with either MTT or DCDHF-DA. These results indicate that oxidative stress is a broadly occurring event in many areas of the embryo where cell death takes place.

DISCUSSION

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

Since neutrophils, a major class of phagocytes, are known to undergo oxidative burst when they are activated (Morel *et al.*, 1991; Rice-Evans *et al.*, 1991) it is possible that cells with high concentration of ROS, and sensitive to antioxidants, represent the phagocytes encharged of eliminatig the apoptotic bodies. It has been determined by electron-microscopy (Hammar and Mottet, 1971, and our own data) and by immunohistochemistry (Rotello *et al.*, 1994) that most macrophages at interdigits are associated with apoptotic bodies. Then, it should be expected that most cells with high concentration of ROS would stain with the cell death indicators. In contrast, we have

determined that of the cells stained with the ROS probes only a low percentage stained also with the cell death indicators (Fig. 9 and Table 1). Therefore, although some cells with high concentration of ROS could be phagocytes, most of them are not; actually, some of the cells doubly stained with Pdl and DCDHF-DA have the appearance of macrophages (Fig 9). Specific immunohistochemistry for phagocytes in combination with ROS detection should confirm this conclusion. In addition, if the phagocytosis stage were blocked by antioxidants, accumulation of apoptotic cells should be noted. Phenol and DMSO, but not DCDHF-DA, may have affected phagocyte function in our experiments as apoptotic bodies (many isolated) were detected in semithin sections stained with toluidine blue after 6 hr of treatment (Fig. 4). These apoptotic bodies were probably derived from cells that were dying at the beginning of treatment, as intracellular integrity of most of them was completely lost and they were not detected by the TUNEL technique (Fig. 3). Nonetheless, accumulation did not occur and new apoptotic bodies were not detected during the course of treatment with phenol or DMSO (low and intermediate doses) indicating that they also blocked cell death. Inhibition of phagocytosis do not block cell death as it has been determined in *Caenorabhditis elegans* mutants (Hedgecock *et al.*, 1983) and directly in the interdigital tissue of limbs treated with cytochalasin B (Kieny and Sengel, 1974)

Antioxidant effects on limb development

Janus green has long been known for its effects on chick embryo development when injected into the amniotic cavity (Saunders, 1966; Pautou, 1976; Fernandez-Teran and Hurlé, 1984). In particular it causes malformations of hindlimb. These malformations have been reported to occur in roughly two distinct phases (Pautou, 1976). The first phase, which is early and fast, reduces interdigital cell death and web regression, thus

causing syndactyly (*i.e.* non-individualized digits). The second phase, which is late, blocks the apical growth at the toes which in turn provokes hypophalangy (*i.e.* reduction in the number of phalanges). Our results with phenol, DMSO and DCDHF-DA are strikingly similar. After 6 hr of tissue culture, we observed the early effect with the obvious reduction in interdigital cell death and consequently syndactyly (Fig 1 and 2, Table 1). The late phase (*i.e.* hypophalangy) was evident after 96 hr of culture and due to the lack of phalange 3 (data not shown). We interpreted the lack of phalange 3 as a result of the cell death detected at the tip of digits starting from 12 hr of culture (Fig. 1).

Why the similarity between our results and those using Janus green? Janus green is a vital dye which is known to be redox sensitive (Bowen and Bowen, 1990). Furthermore, Janus green has been previously used to observe redox gradients in the developing sea urching embryos (Horstadius, 1952). Therefore, it is possible that Janus green has antioxidant effects (*e.g.* reducing ROS concentration or blocking their effects), suggesting that the generation of oxidative stress or its effects can be blocked *in vivo* as we have observed *in vitro*.

Chondrogenic fate of interdigital surviving cells

The major components of extracellular matrix known to be synthesized by cartilage are collagens (such as type II) and proteoglycans (Chen *et al.*, 1995). Expression of their mRNAs or deposition of their products have been widely used as markers for the detection of chondrogenesis (Hurle, *et al.*, 1989; Fernandez-Teran and Hurle, 1984). We detected two of those markers: highly sulphatated proteoglycans (alcian blue) or Gal8-3Gal-Nac (peanut-agglutinin). Alcian blue staining is the most frequently used indicator of chondrogenesis, and has even been used to quantify the process; this compound can recognize different extracellular matrix components, however, under the condition

assayed here (e.g. pH 1.0), highly sulphatated proteglycans are the only species detected (Lev and Spicer 1964). On the other hand, in the developing embryo, Gal β -3Gal-Nac is preferentially expressed in the posterior sclerotome and in developing cartilaginous structures (Lotan *et al.*, 1975) Therefore, the expression of chondrogenic markers at interdigits of antioxidant treated limbs could be revealing the chondrogenic potential of interdigital cells naturally committed to die. Accordingly, chondrogenesis has been observed in explant cultures of interdigital tissue (Lee *et al.*, 1994) and in chick limb interdigits with the epithelium removed (Hurle and Gafan, 1986). Interestingly, when Janus green is administrated in the amniotic cavity, chondrogenesis is also observed at the interdigits (Fernandez-Teran and Hurle, 1984). Nonetheless in our experiments chondrogenesis at interdigits was not completed as inferred from the lack of expression of collagen II mRNA. It is possible that, additional conditions such as critical cell mass (Fig. 4; Cotrill *et al.*, 1987; Hurle *et al.*, 1989) or paracrine and autocrine factors (Erlebacher *et al.*, 1995), not present in the interdigital areas, are needed to form a mature cartilage. Alternatively, an inhibiting activity from interdigits could block late phases of chondrogenesis; it has been hypothesized that interdigital ectoderm, which remained with antioxidant treatments (Fig. 4), inhibits chondrogenesis (Hurle and Ganan, 1986; Hurle, *et al.*, 1989; Solorsh *et al.*, 1981)

In *Caenorabhditis elegans*, mutants in *ced-3* or *ced-4* allow the survival of cells naturally committed to die (Ellis and Horvitz, 1986). These surviving cells differentiate to the phenotypes predicted from the lineage they belong. Differentiation has also been observed in other systems when cell death is prevented (Fairbairn *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1993). Therefore, it is possible that, before digit definition and interdigital tissue regression, some mesenchymal cells of digits and interdigits are equivalent. Interdigital cell death could result from the action of signals that promote survival of digital cells, signals that allow the death program to proceed in interdigital cells, or both. However antioxidants, in addition to prevent cell death, also seem to have further effects on

initiation of chondrogenesis, since DCDHF-DA at the intermediate dose, which blocked cell death almost completely, did not display these chondrogenic markers; effects of DMSO on differentiation have been reported earlier. Accordingly, chondrogenesis was not observed at interdigits when cell death was blocked by the negative-dominant mutant of type I BMP receptor (Zou and Niswander *et al.*, 1996), suggesting that prevention of cell death is not sufficient to allow interdigital cells to initiate differentiation.

Role of ROS in developmental cell death

The apoptotic process can be divided into the activation and the execution phases. It is in the execution phase when genes such as the *Ice* and the *bcl-2* family members act. Since programmed cell death has been shown to occur in the absence of ROS and the anti-apoptotic BCL-2 protein can still be protective (Jacobson and Raff, 1995; Shimizu, *et al.*, 1995), it seems that generation of oxidative stress is not an essential event for the execution phase of death program. An alternative possibility is that ROS act as a transducing signal which could be used in certain cases for the activation phase of death program (Jacobson, 1996). In agreement with this role, it was recently shown that during neuronal death caused by nerve growth factor deprivation, rise in ROS levels was transitory previous to the onset of cell death, and superoxide dismutase prevented death only at early stages of apoptosis (Greenlund *et al.*, 1995).

In interdigits, although the staining patterns with ROS probes and AO at different stages of limb development are similar (Fig. 8), very few cells doubly stained with MTT and AO or C-DCDHF-DA and PdI (Fig. 9 and Table 1). At least for PdI, which detects changes in plasma membrane permeability and accumulates bound to DNA, it is expected that the fluorescent signal last up to the end of apoptosis when cell components are degraded. Considering the generation of oxidative stress as a transitory event, if cells

stained with PdI overlapped to those stained with the ROS probes, it would mean that either change in membrane permeability and increase in ROS concentration are events occurring in parallel or that the latter is a consequence of the former. Therefore, the observed non-overlapping staining suggests that the increase in ROS concentration is transitory and early (at least previous to the changes in plasma membrane permeability), as expected for a transducer that plays a role in the activation phase of apoptosis. Supporting this hypothesis, fewer cells were stained with ROS probes than with AO. Furthermore, cells with higher ROS levels were generally located close to the apical ectodermal ridge (AER) (Fig. 8), where cell death seems to start (Saunders *et al.*, 1962; Salas-Vidal *et al.*, in preparation). It is possible to imagine that signals from the AER (see below) are secreted such as to promote cell death at the interdigits through generating, directly or indirectly, oxidative stress. Despite what is described above, further work is needed to establish if ROS act as a transducing signal but, if oxidative stress is a secondary event, increases in ROS should still be relevant, perhaps acting as a reinforcing signal for the efficient progress of the death program in developing cells.

In the developing limb, *bcl-2* expression is restricted to the digits (Novak and Korsmeyer, 1994), hence the relatively low level of ROS observed in this region could result from the antioxidant activity proposed for BCL-2 (Kane *et al.*, 1993). If this is the case, all cells underneath the AER could be responding to the death signal, but BCL-2 would prevent death allowing digit formation. In agreement with this hypothesis, we have recently detected higher peroxidase activity in digits than in interdigits (Lomelf *et al.*, in preparation).

Is there a single mechanism for the activation of developmental cell death?

Since ROS do not seem to be a component of death machinery, our findings, showing that many regions of the mouse embryo that are undergoing cell death coincided with those under oxidative stress, are striking (Fig. 10). Generation of oxidative stress is not a general characteristic of programmed cell death, as protective effect of antioxidants has not been observed in some cell death paradigms (Hug, *et al.*, 1994; Busciglio and Yanker, 1995). In addition, alternative transducing signals have been proposed (Rajotte *et al.*, 1992; Obeid and Hannun, 1996). In this context, our data indicate that the generation of oxidative stress is a recurrent event during mouse development and ROS may be a major signal used to trigger embryonic cell death.

Parchment and Pierce obtained for the first time indirect data that suggest a possible role of oxidative stress in the process of cell elimination at interdigits, and those with trophectodermal potential in the inner cell mass (for an overview of their data, see Parchment, 1993). According to their view, polyamines would be secreted by killing cells, which in turn would be catabolized by an extracellular amine-oxidase producing hydrogen peroxide as a metabolite. Hydrogen peroxide then would "murder" sensitive cells. They propose that this model could be applied to the death of different cell types. Although our data are in agreement with the role of oxidative stress in cell death, they do not give indications on the origin of the increase in ROS concentration. Therefore, it should yet be considered a possibility that rise in ROS level is a process initiated inside the cell committed to die.

A common mechanism for embryonic cell death was also previously suggested from the expression of *lacZ* in many regions undergoing cell death of transgenic embryos containing the *fos* promoter-*lacZ* fusion gene (Smeyne *et al.*, 1993). Since *fos* expression is up-regulated by oxidative stress (Shibanuma *et al.*, 1990; Cerutti *et al.*, 1989), it is possible that within the *fos* promoter fragment used in the aforementioned transgenic mice, there are ROS responsive elements that cause the observed *lacZ* expression pattern.

RA receptor- β expression by interdigital cells (Mendelsohn *et al.*, 1992) suggests that RA could participate in triggering the death process. Accordingly, RA can activate cell death in cultured interdigit explants (Lee *et al.*, 1994). Recently, we reported that RA activates cell death of embryo body cells, which correlates with a significant increase in ROS levels and can be prevented by several antioxidants (Castro-Obregon and Covarrubias, 1996). We have also observed a subtle increase in ROS levels in primary cultures of limb cells treated with RA (Salas-Vidal, unpublished results). Therefore, since RA seems to be synthesized by AER (Zgombic-Knigh *et al.*, 1994), it could be the signal responsible for generating oxidative stress, and consequently cell death.

Production and/or accumulation of ROS was first found to be a characteristic of the aging process. Now recent evidence shows that generation of oxidative stress participates in different cellular processes. The data presented in this study are indicative of a very early ROS function during animal life, predominantly in cell death. Therefore, natural and pathological cell death can be initiated by ROS. Remarkably, ROS in plants are also involved in the initiation of cell death (Jabs *et al.*, 1996) suggesting that mechanisms of activation are conserved in these two kingdoms.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Abrahams, J.M., White, C., Fessler, L.I., and Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Bowen, I.D. and Bowen, S. (1990). "Programmed cell death in tumours and tissues". Chapman and Hall, University Press, Cambridge. U.K
- Burdon, R.H.; Gill, V., and Rice-Evans, C.S.O. (1993). Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 369-380.
- Busciglio, J., and Yankner, B.A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* **378**, 776-779.
- Castro-Obregon, S., and Cobarrubias, L. (1996). Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation. *FEBS Lett.* **381**, 93-97.
- Cerutti, P., Larsson, R., Krupitza, G., Muehlemitter, D., Crawford, D., and Amstad, P. (1989). Pathophysiological mechanisms of active oxygen. *Mutat. Res.* **214**, 81-88.
- Chen, Q., Johnson, D.M., Haudenschild, D.R., and Goetinck (1995). Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev. Biol.* **172**, 293-306.
- Coelho, C.N.D., Sumoy, L., Rodgers, B.J., Davidson, D.R., Hill, R.E., Upholt, W.B., and Koshier, R.A. (1991). Expression of the chicken homeobox-containing gene GHox-8 during embryonic chick limb development. *Mech. Dev.* **34**, 143-154.
- Coelho, C.N.D., Upholt, W.B., and Koshier, R.A. (1993). The expression pattern of the chicken homeobox-containing gene GHox-7 in the developing polydactylous limb buds suggests its involvement in the apical ectodermal ridge-directed outgrowth of limb mesoderm and in programmed cell death. *Differentiation* **52**, 129-137.
- Cottrill, C.P., Archer, C.W., and Wolpert, L. (1987). Cell sorting and chondrogenic aggregate formation in micromass culture. *Dev. Biol.* **122**, 503-515.

- Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E., and Derynck, R. (1995). Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**, 371-378.
- Fairbairn, L.J., Cowling, G.J., Reipert, B.M., and Dexter, T.M. (1993). Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* **74**, 823-832.
- Fernandez-Teran, M.A., and Hurlle, J.M. (1984). Syndactyly induced by Janus green B in the embryonic chick leg bud: a reexamination. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **84**, 159-175.
- Francis, P.H., Richardson, M.K., Brickell, P.M., and Tickle, C. (1994) Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209-218.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493-501.
- Glucksmann, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59-86.
- Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8115-8119.
- Greenlund, L.J.S., Deckwerth, T.L., and Johnson Jr., E.M. (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* **14**, 303-315.
- Hammar, S.P., and Mottet, N.K. (1971) Tetrazolium salt electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J. Cell Sci.* **8**, 229-251.

- Haugland, R.P. (ed.) (1996). Handbook of fluorescence probes and research chemicals. Sixth ed. Molecular Probes. Eugene, Or. USA.
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., and Thomson, J.N. (1983). Mutations affecting programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **220**, 1277-1279.
- Horstadius, S. (1952). Induction and inhibition of reduction gradients by the micromeres in the sea urching egg. *J. Exp. Zool.* **120**, 421-436.
- Howard, M.K., Burke, L.C., Mailhos, C., Pizzey, A., Gilbert, C.S., Lawson, W.D., Collins, M.K.L., Thomas, N.S.B., and Latchman, D.S. (1993). Cell cycle arrest of proliferating neuronal cells by serum deprivation can result in either apoptosis or differentiation. *J. Neurochem.* **60**, 1783-1791.
- Hug, H., Enari, M., and Nagata, S. (1994). No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett.* **351**, 311-313.
- Hurle, J.M., and Gafan, Y. (1986). Interdigital tissue chondrogenesis induced by surgical removal of the ectoderm in the embryonic chick leg bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **94**, 231-244.
- Hurle, J.M., Gafan, Y., and Macias, D. (1989). Experimental analysis of the *in vivo* chondrogenic potential of the interdigital mesenchyme of the chick leg bud subjected to local ectodermal removal. *Dev. Biol.* **132**, 368-374.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., and Dangl, J.L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853-1856.
- Jacobson, M.D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83-86.
- Jacobson, M.D., and Raff, M.C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* **374**, 814-816.

- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., and Bredezen, D. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274-1277.
- Karnovsky, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **27**, 137A.
- Kieny, M., and Sengel, P. (1974). La nécrose morphogène interdigitale chez l'embryon de poulet: effet de la cytochalasine B. *Année Biol.* **13**, 57-68.
- Lee, K.K., Li, F.C., Yung, W.T., Kung, J.L., Ng, J.L., and Cheah, K.S. (1994). Influence of digits, ectoderm and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital in culture. *Dev. Dyn.* **201**, 297-309.
- Lennon, S.V., Martin, S.J., and Cotter, T.G. (1991). Dose dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* **24**, 203-214.
- Leonard, C.M., Bergman, M., Frenz, D.A., Macreery, L.A., and Newman, S.A. (1989). Abnormal ambient glucose levels inhibit proteoglycan core protein gene expression and reduce proteoglycan accumulation during chondrogenesis: Possible mechanism for teratogenic effects of maternal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 10113-10117.
- Lev, R., and Spicer, S.S. (1964). Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 309.
- Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D., and Sharon, N. (1975). The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.* **250**, 8518-8523.
- Matthews, N., Neale, M.L., Jackson, S.K., and Stark, J.M. (1987). Tumor cell killing by tumor necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology*, **62**, 153-155.

- Martin, P. (1990). Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int. J. Dev. Biol.* **34**, 323-336.
- McConkey, D.J., and Orrenius, S. (1988). Signal transduction pathways to apoptosis. *T. Cell. Biol.* **4**, 370-375.
- Mendelsohn, C., Ruberte, E., and Chambon, P. (1992) Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev. Biol.* **152**, 50-61.
- Morel, F., Doussiere, J., and Vignais, P.V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **201**, 523-546.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., and Shiota, K. (1995) Programmed cell death in the interdigital tissue. *Anat. Rec.* **242**, 103-110.
- Nicoletti, L., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271-279.
- Novak, D.V., and Korsmeyer, S.J. (1994). Bcl-2 protein expression during murine development. *Am. J. Pathol.* **145**, 61-73.
- Obeid, L., and Hannun, Y.A. (1995). Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J. Cell Biochem.* **58**, 191-198.
- Parchment, R.E. (1993). The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxirradicals and histogenesis in the embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 75-83.
- Pautou, M.-P. (1976). La morphogénèse du pied de l'embryon de poulet étudiée à l'aide de malformations provoquées par le vert Janus. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **35**, 649-665.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Nature* **262**, 695-700.

- Rajotte, D., Haddad, P., Haman, A., Cragoe, E.J., and Hoang, T. (1992) Role of protein kinase C and the Na^+/H^+ antiporter in supression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J. Biol. Chem.* **267**, 9980-9987.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., and Symons, M.C.R. (1991) "Techniques in Free Radical Research". Elsevier Science Publishers BV Amsterdam.
- Rotello, R.J., Fernandez, P-A., and Yuan, J. (1994). Anti-apogens and anti-engulfens: Monoclonal antibodies reveal specific antigens on apoptotic and engulfment cells during chicken embryonic development. *Development*, **120**, 1421-1431.
- Saunders, J.W. (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604-612.
- Saunders, J.W., Gasseling, M.T., and Saunders, L.C. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev. Biol.* **5**, 147-178.
- Schwartzman, R., and Cidlowski, J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.* **14**, 133-151.
- Shibanuma, M., Kuroki, T., and Nose, K. (1990). Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. *Oncogene* **5**, 1025-1032.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1995). Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* **374**, 811-813.
- Smeyne, R.J., Vendrel, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T., and Morgan, J.I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* **363**, 166-169.
- Solursh, M., Singley, C.T., and Reiter, R.S. (1981). The influence of epithelia on cartilage and loose connective tissue formation by limb mesenchyme cultures. *Dev. Biol.* **86**, 471-482.

- Taketo, T., and Koide, S.S. (1981). *In vitro* development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* **84**: 61-66.
- Wallin, J., Wilting, J., Kosei, H.; Fritsch, R., Christ, B., and Balling, R. (1994). The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* **120**,1109-1121.
- Wanek, N., Muneoka, K. Holler-Dinsmore, G.; Burton, R., and Byant, S.V. (1989). A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* **249**, 41-49.
- Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J., Lee, M.K., Valentine, J.S., and Bredesen, D.E. (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**, 515-518.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**, 1105-1116.
- Zakeri, Z., Quaglino, D., and Ahuja, H.S. (1994). Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammetoe mutant. *Dev. Biol.* **165**, 294-297.
- Zetterqvist, H (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph.D. Thesis Karolinska Institutet. Stockholm, Sweden.
- Zgombic-Knigh, M., Satre, M.A., and Duester, G. (1994). Differential activity of the promoter for the human alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene ADH3 in neural tube of transgenic mouse embryos. *J. Biol. Chem.* **269**, 6790-6795.
- Zou, H., and Niswander, L. (1996). Requirement for BMPsignaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.

TABLE

TABLE 1
ANALYSIS OF DOUBLY STAINED CELLS WITH THE ROS PROBES AND CELL DEATH
INDICATORS

Total # of stained cells # (CD)	# of doubly stained cells # (RP)	# of doubly stained cells # (CD/RP)	% of RP stained cells doubly stained	% of CD stained cells doubly stained
<i>-In toto :</i>				
ND (AO)	116 (MTT)	15 (AO/MTT)	13%	ND
719 (PdI)	260 (DCF)	43 (PdI/DCF)	17%	6%
<i>-In squashed:</i>				
ND (AO)	220 (MTT)	35 (AO/MTT)	16%	ND

Note: ND = not determined. CD = cell death indicators (AO or PdI). RP = ROS probes [MTT or DCF (= DCDHF-DA)].

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Effect of antioxidants on interdigital tissue regression and cell death. Forelimbs were cultured for 6 hr (6h), 12 hr (12h) and 24 hr (24h) *in vitro* in control medium and in the presence of phenol, dimethyl sulfoxide (DMSO) or DCDHF-DA (DCF), at the dose indicated. Confocal images, ventral view, of AO stained tissues are shown. Isolated mouse forelimbs (S9-S10) cultured on control medium showed a normal development although retarded compared to *in vivo*. Addition of phenol, DMSO or DCDHF-DA to the medium reduced regression (see also Fig. 2) and cell death (indicated by AO staining) in interdigital tissue. Bar = 500 μ m.

FIG 2. Image analysis of interdigital regression of forelimbs cultured *in vitro*. The images of forelimbs just before culture (0h) and cultured for 6 hr or 12 hr in control medium (top panel, dotted lines), and those of forelimbs cultured for 24 hr in the presence of phenol, dimethyl sulfoxide (DMSO) or DCDHF-DA (DCF) at the concentration indicated (bottom panel, dotted lines) were overlaid on the image of a forelimb cultured for 24 hr in control medium (continuous lines) as described in Materials and Methods. Image overimpositions of limbs cultured in control medium show that most interdigital regression takes place from 6 hr to 24 hr of tissue culture. Image overimpositions of limbs treated with antioxidants for 24 hr on the image of a limb cultured for 24 hr in control medium show that even at the lowest concentrations assayed interdigital regression was reduced and prospective digits appear less separated. Note that digit growth did not occur in our culture conditions (top panel).

FIG. 3. Cytochemical labeling of fragmented DNA of cultured forelimbs. The TUNEL technique was performed on 10 μ m serial sections from complete forelimbs cultured for 6 hr in the presence or absence of antioxidants; representative sections were selected and

photographed (X100). (A) Sections of limbs cultured in control medium showed intense TUNEL staining at interdigital zones (IZ) and anterior and posterior margins of hand plate (not shown). Sections of limbs treated with 0.075% phenol (B), 3% DMSO (C), and DCDHF-DA at 0.03 mg/ml (D), 0.06 mg/ml (E) and 0.1 mg/ml (F) showed a marked reduction of TUNEL staining..

FIG. 4 Figure 4. Histological and cytological analysis of cultured limbs in the absence and presence of antioxidants. Stage 9 forelimbs were cultured in control medium (A, B), 3% DMSO (C, D) or 0.06 mg/ml DCDHF-DA (E,F), for 6 hr (A, C, E), 12 hr (F) and 24 hr (B, D), and limbs processed for high resolution microscopy. Representative semithin and thin cross sections obtained from the distal region of the handplate are shown (400X magnification; insets, 13000X). Observe that, after 6 hrs of culture in control medium (A), apoptotic bodies (round dark spots) were apparently included in fagocitic cells (arrow), whereas when treated with DMSO (C) or phenol (not shown), they appeared in the extracellular space (arrow); location of apoptotic bodies was confirmed by electron microscopy (*, insets). In general, the external apoptotic bodies found in DMSO treated limbs were in an advanced degree of condensation and, in a few cases, structures resembling the nuclear envelope were observed (C, inset). Later in culture (24 hr) with control medium (B), apoptotic bodies were not detected and regression was almost completed; in the presence of DMSO (D) very few apoptotic bodies were detected and regression was limited. In contrast with the observations in sections from DMSO treated limbs, sections of limbs treated with DCDHF-DA for 6 hr (E) show healthy interdigital cells and the absence of apoptotic bodies in the interdigital region. However, after 12 hours of culture (F) cells with condensed chromatin (arrows) were found in the interdigital zone that remains unregressed. After this time tissue abnormalities became evident (not shown).

FIG 5. Reversibility of antioxidant effect . Limbs were cultured in control medium and in the presence of 0.075% phenol, 3% DMSO or 0.03 mg/ml DCDHF-DA. After 6h, time at which cell death was obviously reduced by antioxidants, media was replaced with either fresh media (control and T1) or medium with the corresponding antioxidant (T2). Interdigital regression of limbs of the T1 group was very similar to the control one, whereas limbs of the T2 group showed limited regression.

FIG. 6. Alcian blue staining of interdigital tissue after treatment with antioxidants. Skeletal development was followed by staining with the cartilage dye alcian blue and alizarin red. Freshly dissected S9-S10 forelimbs, just before culture, did not show any staining with alcian blue at interdigits (A). After 12 hr of culture in control medium, interdigital regression proceeds as described in Fig. 1 and alcian blue staining was confined to digits (B). Limb development in the presence of phenol (C) or DMSO (D) resulted in the ectopic staining with alcian blue of interdigits. Alizarin red staining was not detected in any limb region even after 96 hr of culture. X40.

FIG. 7. Peanut agglutinin staining of interdigital tissue after treatment with antioxidants. Peanut agglutinin was used as an indicator of chondrogenic differentiation. Confocal images of longitudinal or cross sections stained with fluorescinated peanut agglutinin of forelimbs cultured for 12 hr in control medium (A) or treated with DMSO (B) are shown. Observe the clear signal for peanut agglutinin in interdigits of treated limbs but not in those cultured in control medium. Upper bar = 250 μ m, lower bar = 100 μ m.

FIG 8. *In situ* detection of ROS at interdigits. (A) Interdigital tissue of S11 forelimbs showed an intense staining with the ROS sensitive dyes DCDHF-DA (green) and MTT

(purple) coincidentally with the regions staining with AO (red); X100. (B) Ventral view of forelimbs at different developmental stages stained with AO (red) or C-DCDHF-DA (green). Observe the resemblance in the pattern of AO and DCDHF-DA at the different developmental stages selected. X50.

FIG 9. Interdigital area and fusion line of developing palate doubly stained with a ROS probe and a cell death indicator. Developing limbs and palates were simultaneously stained for ROS, with DCDHF-DA, and for cell death, with PdI, at the the time cell death is taking place. A representative confocal image of each structure after staining is shown. (A) S11 forelimb interdigital zone (bar = 100 μm). (B) Palatal shelves fusion line (bar = 250 μm). Cells stained with DCDHF-DA and PdI are seen in green and red, respectively; the overlapping staining pattern appears in yellow.

FIG 10. *In situ* detection of ROS in developing embryos and its relationship with naturally occurring sites of cell death. Cell death was detected by AO staining (A, D, G, I) and ROS accumulation visualized by staining with DCDHF-DA (B, E) or MTT (C, F, H, J). Observe the similar staining pattern obtained with AO as compared with that obtained with MTT or DCDHF-DA in: the sternum fusion line (SFL) of 13.5 d.*pc* embryos (A-C), along the palatal shelves fusion line (PSFL) and the prominent rugae (PR) of 14.5 d.*pc* embryos (D-F), in the 9.5 d.*pc* otic vesicle (G, H), and in the 10.5 d.*pc* developing eye (I, J). Microscope magnifications for photographs shown were: developing sternum and palate, X50; otic vesicle, X100; developing eye, X200.

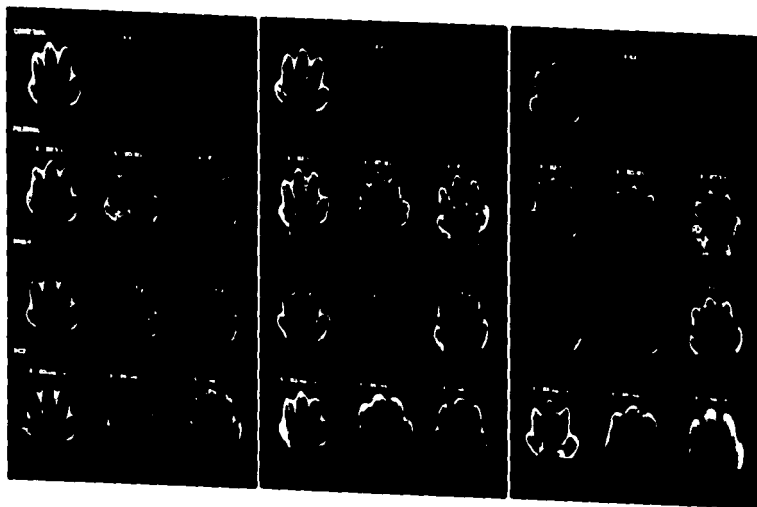


Fig. 1

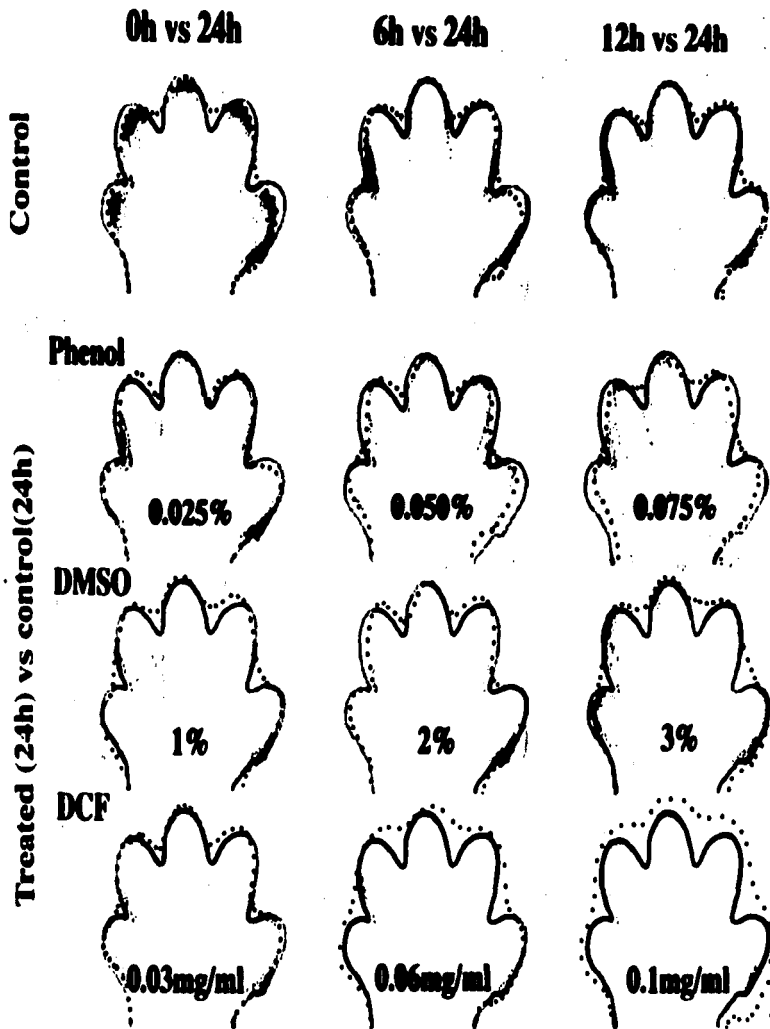


Fig. 2

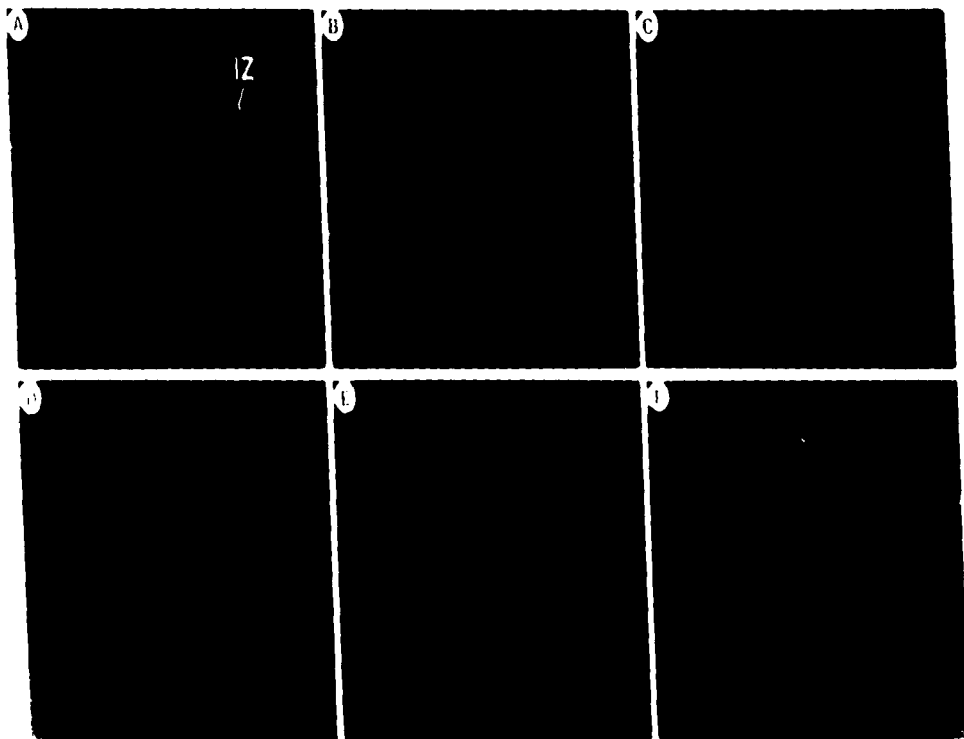


Fig. 3

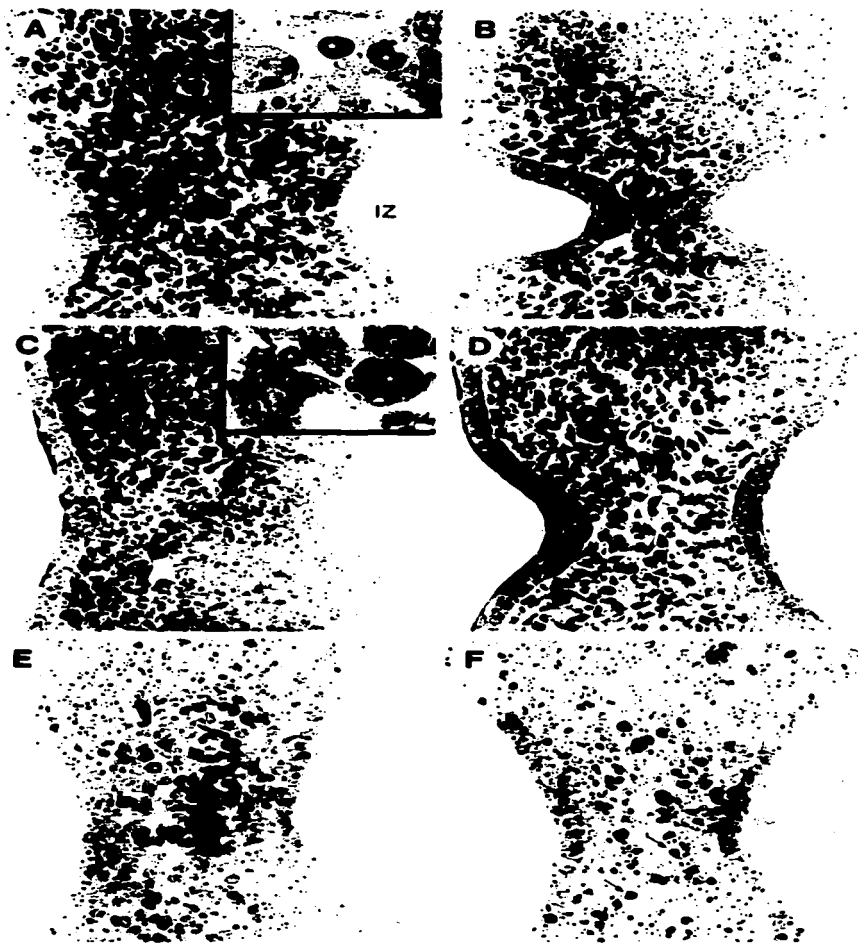


Fig. 4



Fig-5



Fig-6

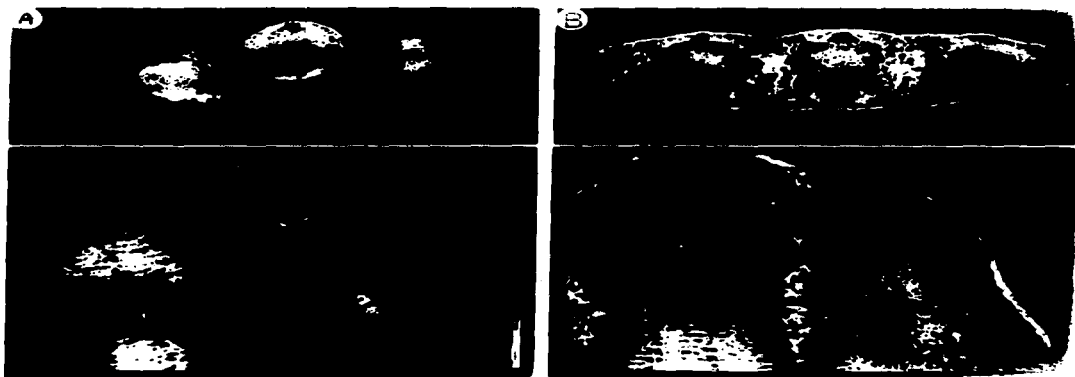
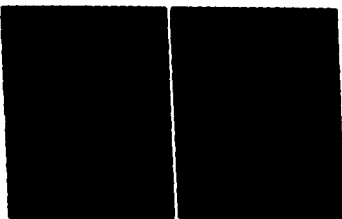


FIG. 7

A



S 0	S 1	S 2	S 12

