



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO GENETICA DEL DESARROLLO Y
FISIOLOGIA MOLECULAR**

**“ Participación del estrés oxidativo en
la muerte celular programada ”**

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

BIOL. LEANDRO DAVID HERNÁNDEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS COVARRUBIAS ROBLES.

Cuernavaca, Morelos.

Septiembre, 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Covarrubias por aceptarme en su laboratorio, por sus enseñanzas, su asesoría siempre disponible y por impulsarme en mi carrera científica.

Al Dr. Gustavo Pedraza y al Dr. Alejandro Zentella por su tiempo y valiosos consejos.

A los integrantes de mi jurado, la Dra. Hilda Lomeli, el Dr. Wilhelm Hansberg, el Dr. Luis Cárdenas y en especial a la Dra. Claudia Díaz por su gran ayuda y consejos para hacer de este, un mejor trabajo de tesis.

A ti Mamá por todo tu amor y ayuda, que siempre me han hecho sentir protegido.

A mi Papá y Abuelos, que a pesar de no estar aquí, siguen exhortándome a ser siempre una mejor persona.

A la Peke, por su amistad, apoyo incondicional y cariño.

A mis amigos, Manuel, Renaud, Niurka, Rodrigo, Raúl, Javier, Toñotaz, Renato, Brenda, Magda, Mayra, Jesús Santa-Olalla, Félix Recillas, Josué, Adrián, Atzimba, Yuri, Cristina, Diana, Cecilia, Héctor, Sergio, Rocío, Sonia, Graciela y Concepción por brindarme su amistad, apoyo y compartir momentos.

A todos los amigos, compañeros y camaradas con los que he convivido en el Instituto de Biotecnología.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
1.- Procesos celulares.....	4
2.- Las bases moleculares de la muerte celular.....	5
2.1.- Muerte celular tipo I: Apoptosis.....	6
<i>Apoptosis extrínseca</i>	9
<i>Sistemas de regulación</i>	10
<i>Moléculas blanco durante la apoptosis</i>	10
2.2.- Muerte celular tipo II: muerte celular autofágica.....	11
2.3.- Muerte celular tipo III: necrosis.....	12
2.4.- Muerte celular durante el desarrollo embrionario.....	13
<i>La formación de la cavidad proamniótica</i>	14
3.- Especies de oxígeno reactivas	17
4.- Sistemas antioxidantes.....	21
5.- Las especies de oxígeno reactivas y la muerte celular.....	24
6.- La catalasa y su participación en la muerte celular programada.....	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
RESULTADOS	32
1.- El patrón de expresión del ARNm de la catalasa se restringe a zonas específicas durante el desarrollo embrionario.....	32
2.- Generación de un ratón deficiente en la catalasa.....	35
3.- Producción de un ratón transgénico para la catalasa.....	39
4.- Sobre-expresión de enzimas antioxidantes en células ES.....	41
4.1.- Las células ES que sobre-expresan la catalasa se protegen del peróxido de hidrógeno.....	42
4.2.- La menadiona promueve la muerte celular a través de un mecanismo independiente de la generación de las	

especies de oxígeno reactivas	43
4.3.- La sobre-expresión de la catalasa citosólica evita la muerte celular programada en el cuerpo embrioide.....	44
4.4.- El peróxido de hidrógeno rescata parcialmente la muerte celular por efecto de la sobre-expresión de catalasa.....	46
4.5.- La sobre-expresión de la superóxido dismutasa en el cuerpo embrioide.....	47
4.6.- Presencia de las especies de oxígeno reactivas en el cuerpo embrioide....	48
4.7.- La participación de las caspasas durante la cavitación del cuerpo embrioide.....	50
4.8.- La función de <i>Aif</i> durante el proceso de cavitación del cuerpo embrioide..	51
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	53
1.- El patrón de expresión de catalasa.....	53
2.- La pérdida de la catalasa.....	54
3.- La ganancia de la catalasa.....	56
4.- La sobre-expresión de la catalasa en las células ES.....	58
5.- La sobre-expresión de la catalasa en el cuerpo embrioide.....	59
CONCLUSIONES.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1.- Purificación de ARN total.....	63
2.- Reacción para hacer ADNc.....	64
3.- Reacción en cadena de la polimerasa.....	64
4.- Gel de actividad para la catalasa.....	65
5.- Hibridación <i>in situ</i>	66
6.- Cultivo celular.....	69
7.- Exposición de las células ES a condiciones que promueven la muerte celular.....	71
8.- Generación de los cuerpos embrioides.....	71
9.- Construcción de vectores.....	72
REFERENCIAS.....	73
APENDICE.....	81

RESÚMEN.

La muerte celular programada es un proceso fundamental que es requerido para el desarrollo embrionario. Juega un papel importante en la morfogénesis, la homeostasis de los tejidos y la remoción de estructuras transitorias. Las especies de oxígeno reactivas (EOR) son activadores potentes de la muerte celular por lo que en este estudio evaluamos la participación de catalasa, una enzima encargada de eliminar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en la muerte celular. Inicialmente determinamos el patrón de expresión de catalasa durante el desarrollo embrionario del ratón. Encontramos que se expresa en los estadios de 7 a 15.5 días post-coito, Esta expresión se da de manera constitutiva para más tarde restringirse a la extremidad en desarrollo y la región cefálica. En estos lugares podría estar promoviendo sobrevivencia celular a través de evitar la elevación de las EOR. Por lo que realizamos la mutación de catalasa en ratón resultando no tener un efecto durante el desarrollo embrionario y aparentemente tampoco en la vida adulta. En un intento por tratar de aumentar la actividad antioxidante durante el desarrollo embrionario, es que generamos un ratón transgénico que sobre-expresa catalasa, desafortunadamente su expresión se restringió a solo dos órganos, limitando su acción. La formación de la cavidad proamniótica es el primer evento de muerte celular abundante durante el desarrollo embrionario en mamíferos. El cuerpo embriode (CE) se forma a partir de la diferenciación de células madre embrionarias (ES) y se utiliza como un modelo para estudiar la muerte celular y cavitación. Para evaluar la participación de las EOR en el proceso de cavitación, sobre-expresamos la catalasa en las células ES (ES-Cat⁺). De varios agentes que promueven la muerte celular, solo del H_2O_2 son capaces de protegerse las células ES-Cat⁺. La menadiona, un agente pro-oxidante, es capaz de generar muerte celular independiente de la producción de EOR. Los CE derivados de la línea ES-Cat⁺ presentan una disminución importante en la muerte celular y en la cavitación, sin que esto influya en el proceso de diferenciación. La sobre-expresión de la superóxido dismutasa no afectó el desarrollo del CE. Previo a la muerte celular existe un aumento de las EOR en las células centrales del CE, mismo que se deriva de la cadena respiratoria mitocondrial. En este trabajo demostramos que las caspasas, proteasas requeridas en la apoptosis, son indispensables para la cavitación del CE y que el factor inductor de apoptosis (*Aif*), a pesar de participar, no es esencial para este proceso. Tanto la activación de las caspasas como la activación de *Aif* dependen de la producción de EOR. Considerando estos resultados, podemos concluir que la generación de las EOR es un fenómeno activo que promueve muerte celular durante la cavitación de CE y sugerimos que pudiera ser un factor importante para la formación de la cavidad proamniótica *in vivo*.

sugerimos que pudiera ser un factor importante para la formación de la cavidad proamniótica *in vivo*.

ABSTRACT.

Programmed cell death (PCD) is a fundamental process required for proper animal development playing an important role in morphogenesis, tissue homeostasis and removal of transitory structures. Reactive oxygen species (ROS) are potent activators of cell death thus, in the present work we evaluated the participation of catalase, one enzyme required for hydrogen peroxide removal in cell death. We determined the pattern of catalase expression during mouse development, finding expression at 7 to 15.5 dpc, initially constitutive manner and thereafter restricted to the limbs and cephalic zones, such places in which could be promoting cell survival through the ROS scavenger activity. We perform catalase mutation in mice with no consequences during development and apparently also in the adult life. Trying to increase the antioxidant levels we generate a transgenic mice overexpressing catalase, however the expression was restricted only to heart and liver tissue. Proamniotic cavity formation is the first instance of abundant PCD and cavitation during mammalian development. Embryoid bodies (EBs), which are derived from differentiating mouse embryonic stem cells (ES), are widely used model systems suitable for molecular studies on cell death and cavitation. To evaluate the ROS role in the cavitation process, we overexpress catalase in ES cells (ES-Cat⁺). From several cell death promoter agents, only hydrogen peroxide (H₂O₂) was resistant ES-Cat⁺. In ES-Cat⁺ menadione is capable to generate cell death independently of ROS production. ES-Cat⁺ derived EBs show an important reduction in cell death and cavitation, without influence on differentiation process. However, the SOD overexpression have no effect in the EB development. Before cell death begins there is an increase in ROS levels in the central cells of EB, which is derived from mitochondrial respiratory chain. In the present work we show that caspases, proteases required for the apoptotic process, are essential for embryoid body cavitation and *Aif* (apoptotic inducible factor) participate, but is not required for this event. The caspase activation and the *Aif* translocation are promoted by ROS production. Therefore, we conclude that ROS generation is an active process that promote cell death during the EB cavitation and suggests that could be important in the proamniotic cavity formation *in vivo*.

ABREVIATURAS

ES	Células madre embriónicas
STO	Línea celular fibroblástica empleada para el cultivo de las células ES
CE	Cuerpo embrioide
MCP	Muerte celular programada
EOR	Especies de oxígeno reactivas
SOD	Superóxido dismutasa
β -ME	β -mercaptoetanol
DPI	Iodonio de difenilo
DHE	Dihidroetidio
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio
DCF-DA	Diclorofluoreceín-diacetato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
Kb	Kilopares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Transcripción reversa asociada a la PCR
dpc	Días post-coito
TA	Temperatura ambiente.

INTRODUCCIÓN.

1.- Procesos celulares.

Durante la historia de nuestro planeta se originó progresivamente una gran complejidad de vida, desde organismos unicelulares donde una sola célula realiza todas las funciones vitales hasta aquellos pluricelulares en los cuales existe una división funcional a través de poseer órganos con células especializadas. Necesidades vitales como la alimentación, digestión, respiración, reproducción, movimiento y de tipo sensorial se han satisfecho a través de crear procesos coordinados a nivel celular, tisular, sistemas de órganos y de comportamiento. La adaptación de un individuo a su medio ambiente se debe al hecho de poseer sistemas de órganos, un tamaño y forma que le permiten utilizar de manera eficiente un nicho ecológico en particular; por lo que los procesos celulares que controlan la creación, crecimiento y desarrollo de órganos, así como el tamaño y forma del individuo son de suma importancia para la supervivencia de los organismos metazoarios.

Los principales procesos que se llevan a cabo para especificar el destino celular son la proliferación, diferenciación, migración, senescencia, quiescencia y muerte celular. Estos procesos suelen verse como una respuesta o consecuencia de la acción de diferentes estímulos y de la manera en como la célula los interpreta en un momento determinado. Las moléculas señalizadoras así como las interacciones entre células o con la matriz extracelular, son algunas de las señales externas que decodifica la célula. Dentro de la información inherente a la célula se encuentran el genotipo, el linaje, la fase del ciclo celular, el estado metabólico, de diferenciación y estado redox. Así, la acción coordinada de estos procesos (la información externa, interna y respuesta celular), permiten mantener una adecuada homeostasis del organismo.

Un proceso que durante los últimos 20 años ha recibido especial atención ha sido la muerte celular, aunque desde inicios del siglo XIX diversos anatomistas la habían observado y caracterizado durante la formación de las estructuras transitorias como la notocordia, la regresión de la cola del renacuajo y en la metamorfosis de los insectos (Lockshin 2001). Fue hasta mediados del siglo XIX que Jhon Kerr, Andrew Willye y A.R. Currie nombraron apoptosis (del griego apo-TEO-sis), que se refiere a la caída de las hojas en otoño. a un tipo de muerte en donde las células se encogían, y aunque los organelos permanecían intactos, presentaba condensación de la cromatina y fragmentación de las membranas nuclear y celular. Estas características la diferenciaban

de la ya entonces conocida necrosis, en la cual, un daño externo provoca que las células se hinchen y fraccionen, generando una respuesta inflamatoria (Kerr 1972). Así fue como de manera inicial surgió una clasificación de la muerte celular fundamentada en características puramente morfológicas.

2.- Las bases moleculares de la muerte celular.

En 1977 H. Robert Horvitz y colaboradores, estudiando al nematodo *Caenorabditis elegans*, encontraron que de las 1090 células que se forman durante su desarrollo embrionario siempre se eliminan 131 en la misma posición mediante un mecanismo que dadas ciertas características morfológicas parecía ser apoptosis. Por lo anterior, a este tipo de muerte celular se le denominó muerte celular programada (MCP), ya que ocurre de manera predecible tanto en el tiempo como en el espacio (Ellis 1991). Horvitz realizó estudios de mutagénesis en *C. elegans* con el fin de establecer cuales eran los genes importantes en la regulación de la muerte de estas 131 células. De la multitud de genes aislados, tres fueron los más destacados: *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*. Se demostró que *ced-3* y *ced-4* son absolutamente necesarios para que la muerte celular ocurra, mientras que *ced-9* se requiere para la supervivencia de las células que normalmente no mueren (Horvitz 1999).

La MCP es un fenómeno que se ha encontrado en casi todos los tejidos analizados de los vertebrados. También se ha identificado en diversos organismos como la *Hydra* (Fujisawa 1984), en *Dyctiostelium discoideum* (Olie 1998), en el erizo de mar (Yuce 2001), durante la metamorfosis de *Drosophila melanogaster* (Steller 2008), de *Manduca sexta* (Lockshin 1965), en las plantas (Reape 2008), en el tripanosoma, (Ameisen 1995), e incluso durante la formación de los gametos en *Volvox*, uno de los organismos pluricelulares mas simples (Kirk 1994). Se encontraron homólogos para varios de los genes identificados por Horvitz en *C. elegans*, lo cual sugiere un mecanismo conservado filogenéticamente. Con estos resultados se demostró que la MCP es un proceso activo que requiere de una maquinaria celular para su correcto funcionamiento, sentando así sus bases moleculares.

Apoptosis es el mecanismo principal por el cual se lleva a cabo la muerte celular programada. Sin embargo en algunos casos no se presentan todas las características apoptóticas. Se han descrito diferentes tipos de muerte celular que consideran criterios morfológicos, moleculares o de carácter, esto es de tipo

programado, accidental, fisiológico o patológico. Por lo diverso de estas clasificaciones surgió el llamado comité de nomenclatura sobre la muerte celular o NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death). El NCCD clasifica los diversos tipos de muerte celular en: muerte celular tipo I o apoptosis, muerte celular autofágica o tipo II y muerte necrótica o de tipo III (Tabla I). Esta clasificación podría parecer estricta ya que se han encontrado casos en los cuales se presentan características nuevas y otros en los que los límites entre estos tipos de muerte se vuelven difusos. El propio NCCD acepta sus deficiencias y señala que casos descritos de muerte celular como del tipo lisosomal, catástrofe mitótica, anoikis, excitotoxicidad, degeneración Walleriana, cornificación, eritropoyesis y plaquetogénesis están en espera de una caracterización a nivel molecular para que puedan ser incluidos como una categoría aparte en esta clasificación y exhortan a los investigadores a no emitir términos nuevos que generen confusión (Melino 2005). Por lo anterior, siguiendo la clasificación propuesta por este comité, describiremos brevemente los tres tipos de muerte celular.

TABLA I. Tipos de muerte celular aceptados por el NCCD.

Tipo de muerte	Características
Tipo I Apoptosis	Encogimiento celular Pérdida de la adhesión con el sustrato Dilatación del retículo endoplásmico Desensamblaje de la membrana nuclear Desintegración celular en los llamados cuerpos apoptóticos Activación de caspasas y nucleasas Condensación y corte de la cromatina en multímeros de 200 pb Fagocitosis de cuerpos apoptóticos por células vecinas
Tipo II Autofagia	Secuestro de material citoplasmático y organelos en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas Degradación de componentes por vía lisosomal Independiente de caspasas
Tipo III Necrosis	Dilatación de organelos y su agrupación alrededor del núcleo Rápida disfunción mitocondrial Colpaso energético: caída de NAD ⁺ Activación de calpains y catepsinas Ruptura lisosomal y de la membrana plasmática No existe fragmentación nuclear pero sí del ADN

2.1.- Muerte celular de tipo I: Apoptosis.

La apoptosis se ha subdividido en dos categorías: la extrínseca, caracterizada por ser activada vía la unión de varios ligandos a sus receptores membranales, y la intrínseca, cuya activación promueve ciertos eventos que ocurren en la mitocondria.

En la muerte apoptótica intrínseca se desencadena la activación de factores pro-apoptóticos de la familia de *bcl-2*. De una larga familia de proteínas que participan en apoptosis, *bcl-2* fue el primer miembro aislado y que inicialmente se caracterizó como oncogén por el hecho de expresarse anómalamente en un linfoma debido a un rompimiento cromosomal. *bcl-2*, que mas tarde resultó ser el homólogo funcional de *ced-9* en *C. elegans* (Tabla II), a diferencia de otros oncogenes no posee actividad proliferativa, sino que su efecto es a través de bloquear la muerte celular y de esta manera promover el desarrollo del linfoma (Macdonell 1989). A la fecha, la familia de *bcl-2* está compuesta por 19 miembros que se agrupan en tres clases dependiendo del dominio BH (**B**cl-2 **h**omology domain) que contengan. Existen cuatro dominios BH (BH1, BH2, BH3 y BH4) y están todos presentes en los miembros anti-apoptóticos como: *bcl-2*, *bcl-XL*, *mcl-1*, *bcl-W*, *bfl-1* y *bcl-B*. En la segunda categoría están *bax*, *bak* y *bok*, que funcionan como proteínas pro-apoptóticas y carecen del dominio BH4.

Las proteínas *bid*, *bim*, *puma*, *bad*, *noxa*, *hrk*, *bik*, *bmf*, *bcl-G* y *spike* solo poseen el dominio BH3 (miembros solo-BH3), y funcionan también como factores apoptogénicos. Todos los miembros de la familia de *bcl-2* pueden formar dímeros a través del dominio BH3 y es por esta interacción que proteínas solo-BH3 ejercen su efecto antagonista sobre aquellos miembros anti-apoptóticos. En base a estudios de pérdida de función se observó que células dobles deficientes en *bax* y *bak*, son resistentes a múltiples estímulos apoptóticos, por lo se

considera a estas proteínas como indispensables para la activación de la muerte celular intrínseca (Lindsten 2000). Normalmente *bax* es una proteína monomérica que se localiza en el citosol o unida débilmente a la membrana del retículo endoplásmico. Sin embargo, durante la apoptosis, *bax* se inserta y oligomeriza en la membrana externa de la mitocondria. Las proteínas anti-apoptóticas de la familia de *bcl-2* ejercen su efecto a través de inhibir directa o indirectamente la activación de *bax* y *bak*, dando lugar a un mecanismo de regulación. Puesto que los miembros solo-BH3 también actúan a través de

Tabla II. Miembros de la familia de *Bcl-2*

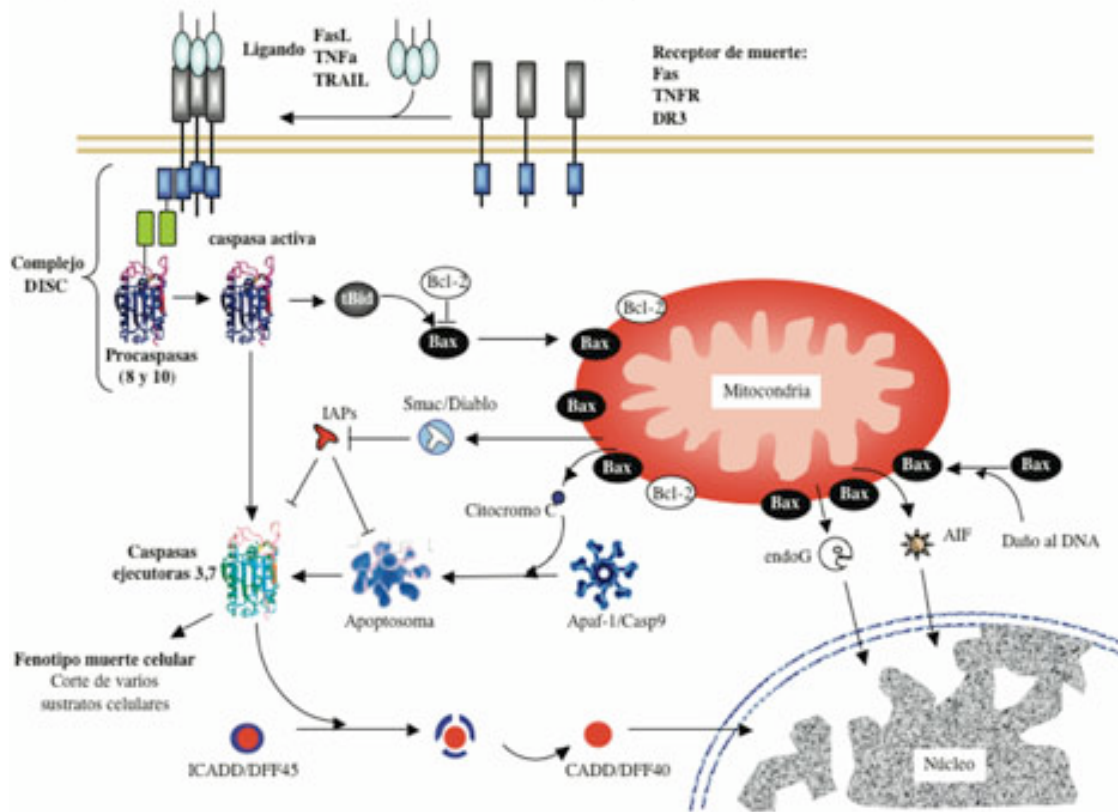
Antiapoptóticos	Dominios presentes
<i>Bcl-2</i> <i>Bcl-X_L</i> <i>Mcl-1</i> <i>Bcl-W</i> <i>Bfl-1</i> <i>Bcl-B</i>	BH1-4
Proapoptóticos	
<i>Bax</i> <i>Bak</i> <i>Bok</i>	BH1-3
<i>Bid</i> <i>Bim</i> <i>Puma</i> <i>Bad</i> <i>Noxa</i> <i>Hrk</i> <i>Bik</i> <i>Bmf</i> <i>Bcl-G</i> <i>Spike</i>	solo-BH3

activar a *bax* y *bak*, y dado que estos últimos se encuentran sujetos a control transcripcional y post-traducciona, se ha sugerido que funcionan como centinelas que responden selectivamente a señales de muerte celular y de sobrevivencia (Zha 1996).

La identificación de genes necesarios para la muerte celular en *C. elegans* estimuló a diversos grupos de investigación a dirigir su atención hacia la caracterización de genes homólogos en vertebrados. De esta búsqueda surgieron *ICE* (interleucina 1 β converting enzyme), y *Apaf-1* (apoptosis activating factor), homólogos de *ced-3* y *ced-4*, respectivamente. A partir de *ICE* se han identificado hasta la fecha 14 proteasas en mamíferos, colectivamente denominadas caspasas, que se caracterizan por tener una cisteína en su sitio activo y cortar en motivos que poseen ácido aspártico (Shi 2002). Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos, cuyo corte genera una subunidad grande y una pequeña que, al asociarse, conforman a la proteína activa. Las caspasas se dividen en aquellas que participan activamente en el proceso apoptótico (caspasa 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 12) y las que controlan la maduración de citocinas (caspasa 1, 4, 5 y 11). Aquellas relacionadas con la apoptosis se subdividen en iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras son las primeras en activarse durante el proceso apoptótico y son responsables de la activación de las efectoras, que a través de cortar diversas proteínas celulares permiten la progresión de la muerte celular. Entre las iniciadoras se encuentran las caspasas 2, 8, 9, 10 y 12 mientras que las efectoras son las caspasas 3, 6 y 7.

A partir del fraccionamiento bioquímico de células de mamífero, dedicados a reconstituir la apoptosis *in vitro*, surgieron ideas clave para entender como se lleva a cabo este proceso. Así, se aisló a *Apaf-2* y *Apaf-3*, que fueron identificados como *citocromo c* y *procaspasa 9*, respectivamente. Estos factores junto con *Apaf1* fueron suficientes y necesarios para reconstituir la actividad de caspasa *in vitro*, constituyendo lo que ahora se conoce como el apoptosoma, y que une los eventos que ocurren en la mitocondria con la activación de las caspasas (Shi 2008). Un estímulo de muerte celular desencadena la activación de proteínas solo-BH3 que a su vez permiten la translocación de *bax* y/o *bak* a la mitocondria. *bclx_L* es estructuralmente similar a toxinas bacterianas formadoras de poros (Belizario 2007), por ello y en este modelo, se presume que *bax* y *bak* permiten la salida de *citocromo c* de la mitocondria a través de formación de poros. Una vez liberado el *citocromo c* de la mitocondria, se forma el complejo del apoptosoma, que en presencia de dATP, permite el autoprosesamiento de la *procaspasa 9*, que a su vez procesa y activa a las caspasas efectoras (Fig. 1).

Figura 1.- Vías de señalización durante la apoptosis



Apoptosis extrínseca.

Los receptores que al unirse a su ligando promueven muerte celular pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (*TNF*). Los receptores mejor caracterizados son *TNFR1*, *Fas* y *DR3*, y que al unirse a *TNF α* , *FasL* y *TRAIL* respectivamente, se homotrimerizan, permitiendo que se ensamble, en su región citoplasmática, el llamado DISC (**d**eath-**i**nducing signaling **c**omplex; (Cain 2002). Proteínas adaptadoras como *FADD* o *TRADD*, que poseen un dominio DED (**d**eath **e**ffector **d**omain) promueven a través de interacciones homotípicas el reclutamiento de la *procaspasa* 8 o 10 al complejo DISC. Al igual que con la *procaspasa* 9 en el apoptosoma, se ha propuesto que el colocar cercanamente a dos copias de la *procaspasa* 8 o 10 permite su procesamiento y activación. Además de cortar a procaspasas ejecutoras como la 3 y la 7, la *caspasa* 8 corta a *bid*, que una vez procesado se inserta en la membrana externa de la mitocondria, promoviendo la liberación de factores proapoptóticos (Zhang 2008). Así, *bid* conforma el punto de unión entre la vía extrínseca y la intrínseca, convergiendo finalmente en la activación de caspasas ejecutoras (Budihardjo 1999).

Sistemas de regulación.

La presencia de dominios DED o CARD (**caspase recruitment domain**) han sido seleccionados como puntos de regulación en la activación de las caspasas (Lamkanfi 2007). Por otro lado, en mamíferos existen ocho distintas *IAPs* (**inhibitor apoptosis proteins**) cuyo mecanismo principal de acción consiste en bloquear el sitio activo de las caspasas impidiendo de esta forma la entrada del sustrato y su ulterior procesamiento. Así, las *caspasas 3* y *7* están sujetas a inhibición principalmente por *XIAP*. Sin embargo, las *cIAPs*, por el hecho de poseer un dominio CARD, pueden competir con la *procaspasa 9* por su unión a *Apaf1*, bloqueando la formación del apoptosoma (Vaux 2003). De igual manera, *c-FLIP* (**FADD like-ICE inhibitory protein**), que posee un dominio DED, es capaz de unirse a *FADD* compitiendo con la *procaspasa 8* y *10*, impidiendo su activación (Kataoka 2005). Proteínas como *Smac/Diablo* que durante un estímulo apoptótico se translocan de la mitocondria al citoplasma, son capaces de bloquear la acción de las *IAPs*. En *Drosophila m.* existen 4 homólogos funcionales de *Smac* colectivamente llamados RHG (**Reaper, Him, Grim** y **Sickle**), que antagonizan la inhibición de las *IAPs* sobre las caspasas *Dronc* y *Drice* (Steller 2008).

Puesto que varios tipos celulares desencadenan una respuesta apoptótica cuando se ven infectadas por algunos tipos de virus, estos últimos han desarrollado proteínas inhibitoras de caspasas como *p35*, *p49* y *crmA* que permiten la sobrevivencia celular y por tanto su replicación (Cassens 2003).

Moléculas blanco durante la apoptosis.

Existen diversas cinasas que al ser cortadas por caspasas se vuelven activas, como *Mekk1*, *Pak2*, *Mst-1* y estas a su vez activan a otras, como las de la familia de *PKC*, *Sapk/Jnk* y cinasas que están involucradas en el control del ciclo celular (Gottlieb 2003; Schlesinger 1998). En varios tipos celulares, es requisito el procesamiento de estas cinasas para la progresión de la apoptosis. Proteínas asociadas al citoesqueleto como α -*actina*, *citoqueratina 18*, α -*fodrina*, pueden ser procesadas al igual que las cinasas *Fak* y *Akt* (Tohyama 2004). De igual manera se degradan componentes que participan en la reparación del ADN como *PARP*, *p53-Rb*, *DNA-PkC* y *hsRAD51* (Nalepa 2002). Existen tres nucleasas que participan en la degradación del ADN durante la apoptosis: la *endonucleasa G*, *CAD* (**caspase activated DNAsa**) y *DNasa II*. El corte por caspasas de

una proteína conocida como *ICAD* (inhibitor of CAD) permite la activación de *CAD*, mientras que en una etapa avanzada, la *DNAse II* es responsable de la degradación del ADN en lisosomas de células fagocíticas (Widlak 2005).

Si las caspasas son la única y final herramienta para ejercer apoptosis, inhibidores de éstas deberían ser suficientes para prevenir las características morfológicas de la apoptosis y detener la muerte celular. Z-VAD.fmk es uno de varios inhibidores de amplio espectro que se unen irreversiblemente al sitio activo de las caspasas. Este inhibidor bloquea eficientemente la apoptosis provocada por una amplia gama de estímulos, sin embargo, existen evidencias donde a pesar de inhibir la actividad de caspasas y la fragmentación de la membrana nuclear, persiste la condensación de la cromatina, corte del ADN en multímeros de 200 pb, encogimiento celular, y la formación de ondas en la membrana plasmática. Por lo tanto la apoptosis que no puede ser bloqueada por estos inhibidores se le ha denominado independiente de caspasas. (Kitagawa 2008). Debido a que ZVAD-fmk no bloquea los cambios que ocurren en la mitocondria durante la apoptosis, como la caída del potencial de membrana, la producción de especies de oxígeno reactivas o la liberación de factores apoptogénicos como el *citocromo c*, *endoG* y *Aif*, se ha propuesto que esta vía pudiera ser responsable de la apoptosis independiente de caspasas. *Aif* (**apoptosis inducing factor**) induce la condensación de la cromatina y la fragmentación a larga escala del ADN aún cuando se haya bloqueado la actividad de caspasas (Lorenzo 2007). El mecanismo preciso de cómo *Aif* y otras proteínas liberadas promueven la muerte en ausencia de caspasas se desconoce, pero se ha propuesto que podría ser a través de la activación de serin-proteasas, *calpains* y *cathepsinas*, que a pesar de ser mas ineficientes que las caspasas, pudieran llevar a cabo su tarea (Smith 2008).

2.2.- Muerte celular tipo II: muerte celular autofágica.

El termino autofagia que significa “comerse a sí mismo”, se refiere al proceso mediante el cual la célula recicla materiales a través de la degradación de componentes celulares. Durante este proceso existe captura de material citoplasmático en vesículas de doble membrana de 400-1500 nm conocidas como autofagosomas. Posteriormente, estos autofagosomas se fusionan con lisosomas generando los autofagolisosomas, donde ocurre degradación por enzimas hidrolíticas, permitiendo así el reciclamiento celular (Tsujimoto 2005). Existen dos propuestas para el origen de estos autofagosomas. La primer de ellas

propone su desarrollo a partir del retículo endoplásmico liso mientras que la segunda hipótesis sostiene que los autofagosomas se forman a partir de estructuras lipídicas conocidas como de media luna, que más tarde crecerán secuestrando parte del citoplasma (Yorimitsu 2005). Estudios genéticos de la autofagia en levaduras derivaron en la identificación de al menos 16 genes esenciales involucrados en la formación de autofagosomas (Codogno 2005). Encontrar dichos genes de autofagia en otros organismos eucariontes como *D. melanogaster*, *C. elegans*, y en mamíferos ha puesto de manifiesto la naturaleza conservada de este mecanismo (Melendez 2008).

Se ha demostrado en diversos sistemas que la autofagia es una respuesta a la falta de nutrientes o de factores de crecimiento. Este proceso es de vital importancia para el neonato, cuando la fuente de nutrientes vía placentaria ha cesado y su ingesta a través de la leche aun no comienza (Kuma 2004). En *D. melanogaster*, existe un marcado incremento en autofagia al final del estado larval que está controlado por ecdycsona, una hormona de naturaleza esteroide (Neufeld 2008). Debido a que células que han estado sometidas a periodos prolongados de autofagia finalmente mueren sin presentar características apoptóticas, y al hecho de que se requiere de la activación de genes que participan en la autofagia para que ocurra la muerte celular, es que se ha incluido este mecanismo como un proceso más de muerte celular (Shimizu 2004). Sin embargo, la autofagia a pesar de inducir bajo ciertas condiciones muerte celular, también es un mecanismo que promueve sobrevivencia al permitir el reciclamiento de nutrientes y/o de organelos dañados.

2.3.- Muerte celular tipo III: necrosis.

Hasta hace pocos años, se consideraba por definición a la necrosis como un tipo de muerte celular no fisiológico, puesto que se daba por sentado que ocurría solo por daño mecánico, generando así una respuesta inflamatoria. Sin embargo, la línea divisoria entre apoptosis y necrosis se desvanece al encontrar que algunas células presentan características de ambos tipos de muerte celular, denominándosele necroapoptosis (Lemasters 1999). Se ha demostrado que condrocitos que controlan el crecimiento longitudinal de los huesos durante el desarrollo embrionario y células epiteliales intestinales en el adulto mueren presentando características necróticas (Barkla 1999; Roach 2000). Por lo que algunos investigadores la han catalogado como muerte necrótica programada. *TNF α* y *TRAIL* que tras unirse a su receptor activan la vía intrínseca

apoptótica, son también el medio por el cual se induce necrosis en algunos tipos celulares (Meurette 2005; Vanden Berghe 2004). Un descubrimiento clave que permitió replantear la definición misma de necrosis, fue el encontrar que después de inyectar restos de células necróticas a un organismo, no se genera una respuesta inflamatoria (Zitvogel 2004). En la actualidad, las definiciones clásicas tanto de apoptosis como de necrosis se consideran como casos extremos de un amplio rango de posibilidades tanto morfológicas como bioquímicas para la muerte celular. Así, se ha propuesto al contexto metabólico como un factor clave para decidir que tipo de muerte celular se ejecutará. En un marco donde existe una carencia de ATP y glucosa, la célula morirá por necrosis, mientras que cuando la concentración de estos es alta entonces la apoptosis es la opción (Nicotera 1997). En muchos casos el inhibir a las caspasas cambia la muerte celular de apoptosis a necrosis o autofagia, sugiriendo que existen mecanismos celulares que subyacen o que suceden simultáneamente.

En base a lo anterior, se ha puesto de manifiesto la importancia de la muerte celular y el necesario control de este proceso para establecer un balance adecuado de cada linaje celular. Cualquier alteración en este proceso puede conllevar a que distintos tipos celulares no se eliminen, promoviendo el desarrollo de varias enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes, o por el contrario, un aumento en el número de células apoptóticas permitirá el desarrollo de enfermedades degenerativas, inmunodeficiencia e infertilidad. Así, esperemos que en un futuro cercano el conocimiento de los diferentes mecanismos de muerte celular se consolide, no solo de la que ocurre de manera programada sino también de aquella que sucede en condiciones patológicas, donde existe interés por evidenciar mecanismos con el fin de encontrar posibles tratamientos.

2.4.- Muerte celular durante el desarrollo embrionario.

En la actualidad se ha reconocido a la muerte celular como un proceso fundamental para que el desarrollo embrionario ocurra correctamente en diversos organismos. La aparente contradicción de crear células que más tarde morirán se puede explicar tomando como ejemplo la muerte de células nerviosas que no encuentran soporte trófico derivado del blanco. Así, la información requerida a nivel de genes y de su regulación para establecer las conexiones neuronales adecuadas se minimiza al contar con un sistema donde aquellas que no realizan los contactos celulares adecuados simplemente

mueren. Los primeros estudios en este campo se limitaban a reportar la presencia de MCP durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, con el descubrimiento de genes que participan en el proceso apoptótico y el análisis de mutantes, se ha evidenciado su verdadera importancia. Tal es el caso de la *caspasa 3*, *8*, *9*, *citocromo c*, *Apaf-1*, cuyas mutaciones en ratón generan letalidad embrionaria, destacando que al alterar la MCP sea en tiempo, nivel, o patrón puede tener serias consecuencias durante el desarrollo embrionario (Hakem 1998; Kuida 1998; Kuida 1996; Li, K. 2000; Varfolomeev 1998; Yoshida 1998).

En organismos multicelulares modelo tales como *D. discoideum*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, el pez cebra, pollo, rata y ratón se ha reportado la presencia de la MCP en varias regiones de la fase embrionaria (Penaloza 2006). Apoptosis y autofagia parecen ser los mecanismos principales por los cuales la MCP se presenta durante el desarrollo embrionario.

Jacobson M. en 1997, clasificó algunas de las funciones de la muerte celular durante el desarrollo embrionario como: 1) el moldeado de estructuras; 2) la eliminación de estructuras no necesarias; 3) el control de los números celulares; 4) la eliminación de células anormales, deslocalizadas, no funcionales o peligrosas y 5) la generación de células sin organelos (Jacobson 1997). Para cada categoría existen ejemplos concretos aplicables a varios organismos (Tabla III).

En algunas ocasiones, a pesar de la presencia de muerte celular en ciertos tejidos durante el desarrollo embrionario, no se ha podido atribuir alguna función debido a falta de estudios. Tal es el caso de la muerte de células germinales en hembras al momento del nacimiento (Reynaud 2000), aquella que ocurre en la masa celular interna del blastocisto (El-Shershaby 1974), en las espermatogonias en desarrollo (Allan 1987), y la muerte de algunos tipos celulares en *D. Melanogaster* (Abrams 1993). Como se puede observar en la tabla III, numerosos son los tejidos o células que bajo circunstancias normales utilizan a la muerte celular como parte integral de su desarrollo.

La formación de la cavidad proamniótica.

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de mamíferos, poco después de la implantación del embrión, se forma lo que se denomina la cavidad proamniótica. Durante este proceso el embrión está compuesto de dos tipos celulares, el

TABLA III. Funciones de la muerte celular durante el desarrollo embrionario segun Jacobson en 1997.

MOLDEADO DE ESTRUCTURAS	ELIMINACION DE ESTRUCTURAS NO NECESARIAS	
<ul style="list-style-type: none"> -Extremidades de vertebrados (Ballard 1968) -Formación de la cavidad proamniótica (Coucovanis 1995) -Cierre del tubo neural (Gordon 1995) -Fusión del esternón (Salas-vidal 1998). -Fusión de mitades del paladar (Cuervo 2004). -Formación de la vesícula otica (Avalone 2002) -Formación del corazón (abdelwahid 2002) -Apertura del ano en el pez cebra (Penalzo 2006). 	<ul style="list-style-type: none"> - Tubos protonefídicos en mamíferos (pole 2002). - Celulas subplacares durante la formación de la corteza (arias 2002). - Ductos mullerianos en el sexo masculino en mamíferos (roberts 2002). - Ductos de Wolff en el sexo femenino en mamíferos (Welsh 2006). - Agallas y cola en renacuajos (Nakajima 2005). - Musculos, intestino medio y glandulas salivales en la mosca de la fruta (Takemoto 2007; Abrams 1993). 	
	ELIMINACION DE CELULAS ANORMALES O PELIGROSAS	
<th>CONTROL DE NUMEROS CELULARES</th> <td> <ul style="list-style-type: none"> - Selección de células B y T en el sistema inmune (Strasser 2008). - Eliminación de cuerpos polares en etapas tempranas del desarrollo (Zakeri 2005). - Eliminación de células cuyo ADN ha sido modificado (Clarke 1993). </td>	CONTROL DE NUMEROS CELULARES	<ul style="list-style-type: none"> - Selección de células B y T en el sistema inmune (Strasser 2008). - Eliminación de cuerpos polares en etapas tempranas del desarrollo (Zakeri 2005). - Eliminación de células cuyo ADN ha sido modificado (Clarke 1993).
<ul style="list-style-type: none"> - Neuronas que no alcanzan su blanco (Oppenheim 1991). - Durante la formación de la retina (Barres 1999). 		
GENERACION DE CELULAS DIFERENCIADAS SIN ORGANELOS		
<ul style="list-style-type: none"> - Keratinocitos en la epidermis (Haake 1997). - Celulas epiteliales del lente (Nishitani 2006) - Eritrocitos (weil 1996) 		

endodermo primitivo y el ectodermo, de los cuales se derivarán estructuras tanto embrionarias como extraembrionarias (Fig. 2A). Del endodermo primitivo surge el endodermo visceral y el parietal, que respectivamente darán origen al saco vitelino y a una lamina basal conocida como membrana de Reichert. El ectodermo extraembrionario genera parte del tejido placentario, mientras que a partir del embrionario o epiblasto, se formará el embrión completo. La formación de la cavidad proamniótica es esencial para que estos tipos celulares se organicen y el embrión se desarrolle de manera adecuada. Varios investigadores han propuesto que esta cavidad se forma debido a la muerte de aquellas células localizadas en el centro de la masa celular (Coucovanis 1995). Un modelo *in vitro* que ha sido utilizado ampliamente para estudiar los procesos que ocurren durante la formación de la cavidad proamniótica, es la generación de agregados de células ES (línea celular derivada de la masa celular interna del blastocisto) conocidos como cuerpos embrioides (CE; Fig. 2B). Al adherirse unas a otras y permanecer en

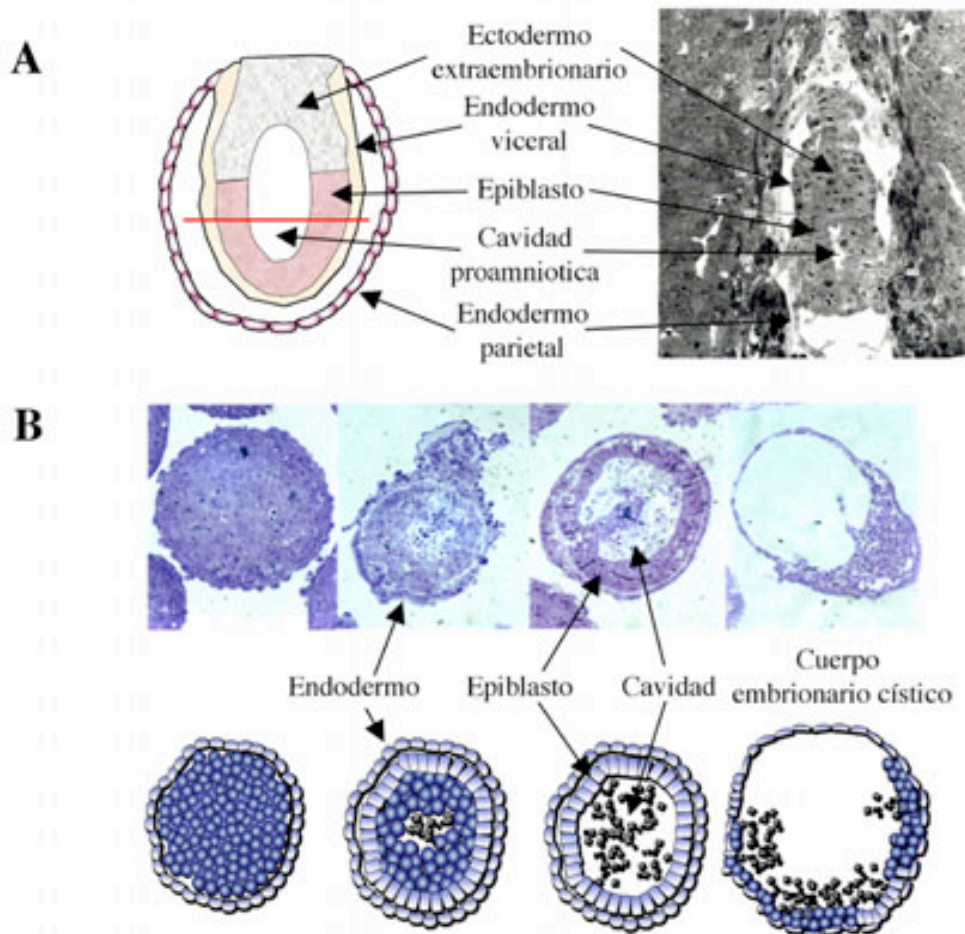


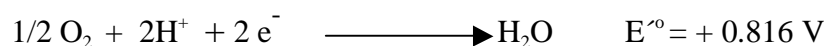
Figura 2.- Los cuerpos embrionarios como modelo de estudio de la formación de la cavidad proamniótica. A) Embrión de 4.5 pdc poco después de la implantación. La línea roja indica la zona homóloga a los cuerpos embrionarios. B) Cortes semifinos de cuerpos embrionarios en diferentes etapas de desarrollo.

suspensión, las células ES pasan por un proceso de diferenciación donde después de 4 días, se forma una capa endodérmica en la superficie del agregado. El endodermo secreta una delgada capa de material extracelular hacia el centro del cuerpo embrioide, presumiblemente la membrana de Reichert. Más tarde se forma al interior un epitelio columnar homólogo al epiblasto embrionario (Coucovanis 1995). Las células centrales del CE mueren por apoptosis, promoviendo así la formación de una cavidad equivalente a la proamniótica. Posteriormente se genera el estado cístico del CE, donde sufre una expansión de la cavidad central al mismo tiempo que los tipos celulares se desorganizan. Así, de este modelo *in vitro*, se han derivado conclusiones importantes de cómo se regula tanto la diferenciación como la muerte celular.

3.- Especies de oxígeno reactivas.

Hace 3.8 billones de años que los microbios alteraron dramáticamente la atmósfera de la tierra. Inicialmente, se trataba de organismos unicelulares que empleaban CO₂, metano y azufre como medio para derivar energía, sin embargo ninguno tuvo tanto impacto como las cianobacterias, cuya actividad fotosintética generó oxígeno libre. Con base en estudios de oxidación de azufre en presencia de rayos solares, se ha estimado que la atmósfera terrestre comenzó a enriquecerse de oxígeno hace 2.45 billones de años (Farquhar 2007). La acumulación de O₂ fomentó el desarrollo en la parte superior de la atmósfera, de una capa de ozono responsable de filtrar los nocivos rayos UV, permitiendo así la colonización de la tierra y la evolución de una enorme cantidad de organismos aerobios. Desde aquel entonces y hasta la actualidad se ha establecido un balance en la concentración del O₂ libre (21%), gracias a la participación tanto de organismos fotosintéticos como heterótrofos.

El O₂ es de naturaleza paramagnética, posee 4 electrones desapareados con el mismo *spin*, por lo que es relativamente inerte, aunque al iniciarse su reducción traspasa esta barrera tornándose más reactivo. La transferencia de electrones donde una molécula gana (agente oxidante) y la otra pierde (agente reductor) está determinada por el potencial de oxido-reducción. En el caso de la reducción de oxígeno a agua, el potencial de reducción estándar es:



El signo positivo indica el sentido de la reacción es decir, hacia donde fluyen los electrones, mientras que el valor denota la fuerza con que viajan. El oxígeno posee un potencial de reducción estándar situado entre los mas altos, lo que lo convierte en un buen aceptor de electrones, es decir, un potente agente oxidante. Este principio se aplica igualmente a los sistemas biológicos y como ejemplo se encuentra la reducción tetravalente del oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O) por la citocromo oxidasa durante la respiración aerobia.

Aunque algunos microorganismos son capaces de vivir en un ambiente anaeróbico, la vida de los animales y plantas superiores depende de forma absoluta de la presencia de oxígeno. En células aerobias, la energía en forma de dATP, es generada por la cadena respiratoria mitocondrial. En ésta, el paso de electrones provenientes del catabolismo de biomoléculas en forma de NADH y FADH₂ es utilizado por distintos

transportadores para generar un gradiente de protones entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Este gradiente de protones es acoplado por el complejo de la ATP sintasa en la síntesis de ATP. Debido a su alto potencial de oxido-reducción, el oxígeno molecular es capaz de captar los electrones provenientes de la cadena respiratoria, por lo que es el último aceptor electrónico. Este fenómeno trajo consigo una manera más eficiente de obtener energía, aunque simultáneamente permitió la generación de productos parciales de reducción del oxígeno conocidas como especies de oxígeno reactivas (EOR). La producción de EOR durante la respiración obedece a la presencia de proteínas mitocondriales con grupos prostéticos redox activos que son capaces de ceder un electrón al oxígeno molecular. Con la adición de un electrón al oxígeno molecular se forma superóxido (O_2^-), con dos peróxido de hidrógeno (H_2O_2), con tres el radical hidroxilo (OH^\bullet) y con cuatro se genera agua (Fig. 3).

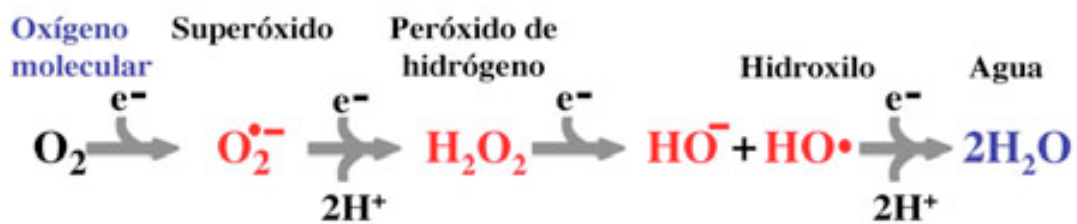


Fig.3.- La reducción parcial del oxígeno molecular genera EOR.

Las EOR son radicales libres que por tener un electrón desapareado poseen la habilidad de reducirse al sustraer electrones de otras moléculas y por consecuencia oxidarlas. Así, el estado energético celular expresado por la cantidad de ATP existente, se encuentra ligado a la generación de EOR y consecuentemente al estado redox celular. Además de la cadena respiratoria existen otras fuentes potenciales para la generación de EOR, las cuales se enlistan en la tabla IV.

Existen dos formas por las cuales el O_2 se vuelve más reactivo, ya sea ganando un electrón para producir superóxido o cambiando el *spin* de uno de sus electrones desapareados, formando el singulete.

Comparado con otras moléculas electrónicamente excitadas, el singulete tiene una vida media relativamente larga, de aproximadamente $2\mu\text{seg}$ en agua, y puede reaccionar rápida y selectivamente en sitios de alta densidad electrónica, como en componentes orgánicos insaturados, generando peróxidos. El superóxido es altamente solvatado en agua y debido a esto no puede atravesar el ambiente hidrofóbico de las

TABLA IV. Fuentes celulares de especies de oxígeno reactivas.

Cadena respiratoria	A través del desacoplamiento o fuga de electrones provenientes de los complejos I y III mitocondriales.
NADPH oxidasa (Nox)	Enzimas localizadas en la membrana celular de leucocitos, microglia, endoteliales, fibroblastos y células de Kupffer. Producen específicamente superóxido. Existen 3 Nox y 2 enzimas Duox (oxidasa dual) en mamíferos.
Oxido nítrico sintasas (NOS)	Proteínas que específicamente producen óxido nítrico (NO). Algunos autores proponen un papel regulatorio del NO sobre la cadena respiratoria al inhibir varios de sus componentes. Existen 4 isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y mitocondrial (mtNOS).
Monoaminoxidasa	Oxida aminas biológicas potencialmente produciendo peróxido de hidrógeno. Se localiza en la membrana externa mitocondrial.
Xantina oxidasa	Enzima citosólica que oxida a xantina e hipoxantina a ácido úrico produciendo peróxido de hidrógeno.
Ácido graso acil-CoA oxidasa	Actúa en la de β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma generando insaturaciones durante su degradación. Produce peróxido de hidrógeno al reoxidarse su grupo FAD, donando estos electrones al oxígeno.
Urato oxidasa	Enzima peroxisomal que produce peróxido de hidrógeno al convertir el ácido úrico en alantoina. No está presente en reptiles, aves y primates.
Glicerolfosfato deshidrogenasa	Responsable de transferir los electrones provenientes de la oxidación del glicerol-3 fosfato, vía ubiquinona al complejo III mitocondrial.
Dihidrolipoamida deshidrogenasa	Forma parte del complejo mitocondrial 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Genera superóxido.
Familia del Citocromo P450	De manera indirecta produce EOR al hidroxilar varios sustratos como: hormonas esteroideas, agentes xenobióticos y en la síntesis de ácidos grasos hidroxilados y epoxidados. Localizados en el retículo endoplásmico.
Lipooxigenasas	Generan peroxidación de lípidos en estructuras membranales de la célula.
Glicolato oxidasa	Cataliza la conversión de glicolato a glioxalato y posteriormente a oxalato. Ambas reacciones generan peróxido de hidrógeno.
Poliamina oxidasa	Convierte espermidina y espermina en 3-aminopropionaldehído produciendo peróxido de hidrógeno.
Oxidasa de función mixta: -D-aminoácido oxidasa -L- α -hidroxiácido oxidasa - α y β glutaril-CoA oxidasa -Oxidasa de ácido pipercolico -Trihidroxicolestanoil-CoA oxidasa -Pristanoil Co-A oxidasa. -Oxalato oxidasa	Estas generan EOR en varias vías metabólicas como: -Síntesis de leucotrienos -Síntesis de plasmalógenos peroxisomales -Síntesis de hormonas esteroideas -Conversión de escualeno a colesterol

membranas celulares, por lo que no está asociado a la peroxidación de lípidos. Aunque su nombre indica que es una molécula fuertemente oxidante, el superóxido a pH fisiológico no lo es para la mayoría de las macromoléculas orgánicas. Sin embargo, no es del todo inofensivo, ya que de él se derivan especies más oxidantes como el peróxido, hidroperóxido y el peroxinitrito. Celularmente, el radical superóxido puede

generarse tras la auto-oxidación de tioles, flavinas, quinonas, catecolaminas y en varias reacciones celulares. Cabe destacar la producción de superóxido por la NADPH oxidasa en neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos durante la llamada explosión respiratoria. Estas células atacan de manera oxidativa a agentes patógenos produciendo superóxido, peróxido, singulete, hidroxilo y ácido hipocloroso. Se sabe que una mutación en el gen que codifica para *Nox2* es causa en humanos de la enfermedad inmunológica conocida como granulomatosis crónica, que provoca hipersusceptibilidad a infecciones por microorganismos (Lambeth 2004). Los peróxidos poseen un enlace O-O que es relativamente débil. Se clasifican propiamente en hidroperóxidos (ROOH) y peróxidos (ROOR). Algunos autores han propuesto que por no tener carga el peróxido de hidrógeno puede atravesar las membranas biológicas, mientras que algunos otros comentan que lo hace a través de canales para el transporte de agua (Bienert 2007). A partir del peróxido se produce el radical hidroxilo por la adición de un electrón proveniente de Fe^{II} o Cu^{II} en la reacción "de Fenton". Ya que el radical hidroxilo es altamente reactivo hacia casi la totalidad de las moléculas orgánicas, su tasa de difusión es comparativamente menor a otras EOR. También se consideran dentro del grupo de EOR al peroxinitrito ($ONOO^-$) y el hipoclorito (OCl^-). El primero se forma al reaccionar superóxido con óxido nítrico (NO), posee una vida media y radio de difusión considerables y es un oxidante muy fuerte de lípidos. El ion hipoclorito es producido por la mieloperoxidasa durante la explosión respiratoria. Por ser altamente reactivas, las EOR pueden reaccionar y por tanto oxidar a macromoléculas como lípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos, alterando su estructura y por ende su función. Ácidos grasos poli-insaturados que forman parte integral de fosfolípidos de membrana, pueden ser atacados por las EOR iniciando reacciones de auto-oxidación en cadena, ocasionando alteraciones irreversibles que afectan la fluidez, permeabilidad y la actividad de proteínas de membrana.

Los grupos funcionales de los 20 aminoácidos son blanco del ataque oxidativo por EOR, sin embargo, metionina, cisteína, tirosina, histidina, arginina, lisina y prolina son los más susceptibles. La modificación oxidativa en estos aminoácidos puede generar cambios estructurales que alteran la función proteica y/o que conllevan a su degradación. Los monosacáridos pueden oxidarse generando ceto-aldehídos e indirectamente conducir a daño proteico por generar grupos carbonilo. La oxidación de guanina en los ácidos nucleicos conduce a la formación de 8-hidroxi-desoxiguanosina

(8OHdG) que a su vez genera mutaciones por sustitución de guanina a timina y de adenina a citosina. Además de 8OHdG se pueden crear otros productos de oxidación de nucleótidos, pero las consecuencias de su generación aun se desconocen. Por ello, el evitar la exposición de los ácidos nucleicos a las EOR y procurar su reparación inmediata es de vital importancia para asegurar la integridad del material genético.

4.- Sistemas antioxidantes.

Diversos organismos al ser expuestos a concentraciones de oxígeno del 50 al 100% mueren de 3 a 7 días. En humanos, existe el fenómeno conocido como efecto Paul Bert, donde personas que practican buceo, respiran oxígeno a presiones elevadas, lo cual provoca daño oxidativo en el sistema nervioso central, pulmones, y ojos, llegando incluso en casos graves a ocasionar la muerte. Para contender con el posible daño oxidativo y regular finamente los niveles de EOR, se desarrollaron los llamados sistemas antioxidantes, cuya función es reducir directamente a las EOR o a las macromoléculas que han sido oxidadas. Los sistemas antioxidantes se dividen a grandes rasgos en enzimáticos y no-enzimáticos. En la tabla V se enlistan estos sistemas.

Cabe destacar que virtualmente todos los seres vivos poseen defensas antioxidantes. La importancia de estos sistemas resulta crucial ya que incluso organismos anaerobios deben contender con la exposición, aunque transitoria, del oxígeno y sus derivados.

Así, la presencia de oxígeno, la generación de EOR y los sistemas antioxidantes establecen un balance redox dentro de la célula. Sin embargo, cuando la producción de EOR aumenta o disminuye la eficacia de los mecanismos antioxidantes se promueve un estado conocido como estrés oxidativo. Hace algunos años se consideraba a las EOR como productos nocivos para las funciones celulares, incluso en la actualidad aun sigue vigente la idea que propone que el daño oxidativo a las macromoléculas es acumulativo y promueve el envejecimiento celular. Sin embargo, múltiples estudios han demostrado que las EOR participan en funciones específicas, entre las que destacan el actuar como moléculas señalizadoras, de defensa al ser producidas por células fagocíticas frente a agentes patógenos, en la diferenciación a tejido cardíaco, durante la angiogénesis y como activadores de la muerte celular.

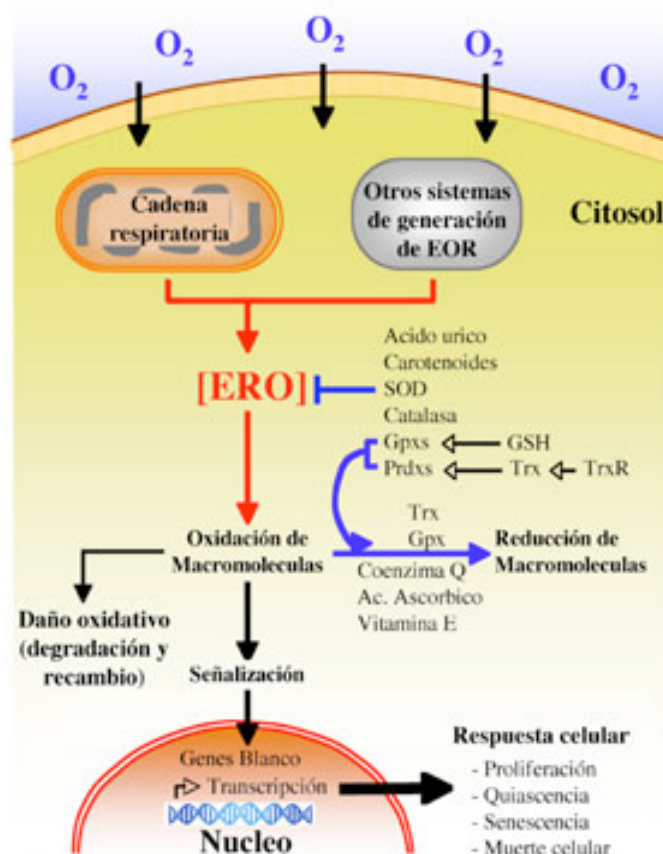
Varios laboratorios, incluido el nuestro, han observado que tras exponer células en cultivo a varias concentraciones de EOR, se genera una respuesta dosis-dependiente. A dosis crecientes las respuestas celulares son: proliferación, quiescencia, senescencia, apoptosis y

necrosis. Al parecer, los organismos aerobios han sido capaces de explotar la capacidad oxidante de las EOR como una manera para controlar diversos procesos celulares (Fig. 4).

Tabla V. Sistemas antioxidantes.	
Antioxidantes enzimáticos	
Superoxido dismutasas (SOD)	Dismutan dos moléculas de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Presentes en todos los organismos.
SOD1	Núcleo de Cu/Zn. Homodimérica. Subcelularmente en el citosol y peroxisoma.
SOD2	Núcleo de Mn. Tetramérica. En mitocondria.
SOD3	Núcleo de Cu/Zn. Tetramérica. Se libera al espacio extracelular.
Catalasa	Hemoproteína tetramérica. Descompone peróxido de hidrógeno. Donador electrónico, el mismo peróxido, metanol, etanol, nitritos, ácido fórmico y ácido ascórbico. Generalmente en peroxisomas. En procariontes y eucariontes.
Peroxidasas	Usan una amplia variedad de donadores electrónicos para reducir peróxidos.
<i>Glutation peroxidasas (Gpx)</i>	Selenio en el sitio activo. Glutathión es el donador electrónico. Actúa sobre peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos.
Gpx1	De expresión constitutiva, citosólica. Tetramérica. Trabaja en conjunto con la fosfolipasa A2 para liberar ácidos grasos de membrana y reducirlos.
Gpx2	Expresada principalmente en el tracto gastrointestinal. Citosólica. Tetramérica
Gpx3	En plasma. Extracelular. Tetramérica. Puede utilizar además tioredoxina como donador de electrones.
Gpx4	Asociada a la membrana plasmática. Monomérica. Reduce lípidos peroxidados
Gpx5	Expresada exclusivamente en el epidídimo.
<i>Peroxirredoxinas (Prdx)</i>	Dependientes de tioredoxina. Cisteína en su sitio activo. Peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos y peroxinitrito como sustratos. Se une a ciclofilina. Presente en procariontes y eucariontes.
Prdx1	Citosólica y nuclear. Homodimérica.
Prdx2	Citosólica y asociada a membrana. Homodimérica e <i>in vitro</i> oligomeriza.
Prdx3	Mitocondrial. Homodimérica e <i>in vitro</i> oligomeriza.
Prdx4	Citosol, aparato de Golgi y espacio extracelular. Homodimérica.
Prdx5	Mitocondrial, peroxisomal, citosol. Monomérica.
Prdx6	Citosólica. Homodimérica.
<i>Otras peroxidases</i>	
Cloroperoxidasa	Usa los electrones provenientes de Cloro, Yodo y Bromo.
Citocromo C peroxidasa	Utiliza citocromo C ²⁺ y se encuentra en levaduras.
Ascorbato peroxidasa	Acido ascórbico como donador electrónico. Solo en plantas.
Yodoperoxidasa	Emplea solo Yodo como donador electrónico. Contiene Se en su sitio activo. Localizada en la tiroides. Presente también en plantas.
Lactoperoxidasa	Utiliza Zinc, Cloro y Bromo. En saliva y leche.
Mieloperoxidasa	Participa en la explosión respiratoria de leucocitos y macrófagos.

Thioredoxinas	Pequeñas proteínas de tipo oxidoreductasas con un grupo tiol. Actúan reduciendo grupos tiol en proteínas. El mecanismo es la ditiolación.
Trx1	Citosólica y nuclear
Trx2	Mitocondrial
Glutaredoxinas	Pequeñas proteínas de tipo oxidoreductasas con un grupo tiol. Actúan reduciendo grupos tiol en proteínas. El mecanismo es la monotioliación y ditiolación. Reducidas por glutatión.
Grx1	Citosólica
Grx2	Núcleo y mitocondria. También puede ser reducida por TrxR.
Sistemas de regeneración antioxidante	Puesto que la mayoría de las peroxidasas utilizan glutatión o tioredoxina como donadores electrónicos, se consideran importantes los sistemas que los sintetizan o regeneran a partir de sus formas oxidadas.
- γ -glutamil cistein sintetasa	Ambas participan secuencialmente en la síntesis de glutatión. El mismo glutatión puede reducir al radical hidroxilo y singulete.
- GSH sintetasa	
- Glutathion Reductasa	Reduce al glutatión oxidado.
Tioredoxinas reductasas	Selenoproteínas homodiméricas que utilizan NADPH como donador electrónico para reducir a las tioredoxinas. Presentes en procariontes y eucariontes.
TrxR1	Citosólica
TrxR2	Mitocondrial
TGR	Isoforma específica de gónadas
Antioxidantes no-enzimáticos	
α -tocoferol (Vitamina E)	Inhibe la peroxidación de lípidos
Ácido ascórbico	Es capaz de reducir al superóxido, peróxidos e hidroxilo.
Carotenoides	Protege del singulete generado por la molécula de clorofila.
Coenzima Q	Inhibe la oxidación de lípidos de membrana.
Acido úrico	Es capaz de reducir al radical hidroxilo, lípidos peroxidados y ácido hipocloroso, producido por la mieloperoxidasa en fagocitos.

Fig.4.- Balance redox celular



5.- Las especies de oxígeno reactivas y la muerte celular.

La homeostasis durante el desarrollo embrionario es finamente establecida por las decisiones que toman las células de manera espacio-temporal. El grupo de investigación dirigido por el Dr. Luis Covarrubias está interesado en determinar cuáles son los factores o señales, a nivel molecular, que desencadenan una respuesta celular en el contexto de la morfogénesis durante el desarrollo embrionario. Particularmente aquellas que son responsables de activar la maquinaria de muerte celular. El entender estos sistemas de regulación es de interés no solo para la ciencia básica, sino también la aplicada, al comprender el origen de algunas enfermedades como son las del tipo neurodegenerativo, autoinmunes o el cáncer.

Uno de los factores que promueven la muerte celular es el estado redox intracelular. Ya que las EOR reaccionan con todas las macromoléculas, se les consideraba inespecíficas y por tanto no aptas para funcionar como segundos mensajeros regulando un evento tan coordinado a nivel molecular como lo es la apoptosis. Sin embargo, existen evidencias concretas que sostienen que las EOR juegan un papel importante como activadores de este proceso.

En sistemas de cultivo *in vitro* de diversos tipos celulares, las EOR adicionadas directamente son capaces de promover una respuesta fenotípica y molecular de carácter apoptótico, misma que puede ser inhibida por la adición de agentes antioxidantes. (Hockenbery 1993). De manera análoga, los sistemas antioxidantes también evitan la muerte celular provocada por otros estímulos, como la exposición a rayos UV, radiación ionizante, doxorubicina y cisplatina, mismos que disparan la producción intracelular de EOR (Dwivedi 2007). Lo anterior evidencia a que estos estímulos utilizan a las EOR como intermediarios para generar una respuesta apoptótica. Puesto que los agentes antes mencionados son estímulos físicos o drogas, podría ser que no tuvieran relevancia fisiológica, pero existen ejemplos concretos donde sistemas celulares promueven un aumento en los niveles endógenos de EOR para generar apoptosis. Tal es el caso del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) que al unirse a su receptor membranal ($TNFR1$), activa el sistema extrínseco apoptótico. Este aumento en EOR es posiblemente derivado de la acción de lipooxigenasas y/o de la cadena respiratoria mitocondrial (Heller 1994), e importantemente, los sistemas antioxidantes son capaces de evitar la muerte celular señalizada a través de la vía de $TNF\alpha$ (Chang 1992; Schulze-Osthoff 1992).

El factor de crecimiento neural (*NGF*) es importante para promover la sobrevivencia de cultivos neuronales y su falta conduce a la muerte celular. Uno de los fenómenos moleculares que preceden a la muerte celular por la falta de *NGF* es un aumento transitorio en la concentración de EOR mismo que puede ser evitado por la adición de superóxido dismutasa, que promueve la sobrevivencia neuronal. (Greenlund 1995).

Los sistemas agentes antioxidantes son capaces de bloquear la muerte celular inducida por compuestos como etopósido, glucocorticoides o eliminación de glutatión. Sin embargo, no en todas las situaciones ocurre, por ejemplo en la muerte celular provocada por *FasL* o staurosporina. (Ratan 1994). Ya que durante el proceso apoptótico el potencial de membrana mitocondrial cae y como consecuencia el transporte electrónico se ve afectado, no sería sorprendente que estos eventos condujeran a un aumento colateral de las EOR. Por lo anterior y aunado a que en condiciones de bajo oxígeno células cultivadas aun pueden morir por apoptosis (Jacobson 1995; Muschel 1995), algunos investigadores han considerado a las EOR como una consecuencia mas que como una causa del proceso apoptótico. Sin embargo, esta versión ha sido debatida por otros grupos, puesto que se han demostrado que aún en condiciones de baja concentración de oxígeno la producción de EOR no se detiene, y por el hecho que los sistemas antioxidantes protegen de diversos estímulos de muerte celular (Clanton 2007; Mollen 2007).

Un punto de vista mas conciliador es el que sostiene que en ciertas situaciones y en ciertos tipos celulares las EOR pueden actuar como moléculas que si bien activan la maquinaria de muerte, estrictamente no forman parte de este proceso.

De entre las proteínas que participan regulando la muerte celular, *bcl-2* es la que mas ha sido relacionada con el estrés oxidativo. La sobre-expresión de *bcl-2* es capaz de inhibir el aumento de EOR asociado a la muerte celular (Hockenbery 1993) y en consecuencia, evitar la muerte celular (Kane 1993). Debido a su capacidad para asociarse con la membrana externa mitocondrial, algunos investigadores han propuesto que *bcl-2* participa protegiendo la integridad membranal al antagonizar a los sistemas pro-apoptóticos y a la producción de EOR.

La regresión de la cola durante la metamorfosis de *Rana rugosa* ha sido durante muchos años un modelo de muerte celular programada. En este modelo, células musculares, nerviosas, epiteliales, mesenquimáticas, y formadoras de cartílago entre otras, sufren de muerte celular de manera masiva. Hanada en 1997 demostró que durante la regresión de

la cola, ocurre un aumento en la actividad de SOD y una disminución en la catalasa, situación que presumiblemente podría ser responsable de generar los niveles aumentados de peróxido de hidrógeno que se han reportaron durante este fenómeno (Hanada 1997).

En el laboratorio del Dr. Luis Covarrubias se han encontrado evidencias que apoyan la participación de las EOR durante la muerte celular, no solo en sistemas *in vitro* sino también *in vivo*.

El β -mercaptoetanol (β ME; HO-CH₂-CH₂-SH), es un componente indispensable para el mantenimiento *in vitro* de células ES. Al ser éste un agente reductor, se proponía que su función protectora consistía en evitar la acumulación intracelular de EOR. La Dra. Susana Castro observó que al retirar el β ME del medio de cultivo, las células ES mueren por apoptosis en las subsecuentes 48 hrs., y que correlaciona con un aumento en las EOR. Sin embargo, el efecto protector del β ME no puede ser igualado por la adición de otros agentes antioxidantes, bien sea porque el β ME posee otra función además de la propuesta o que los antioxidantes adicionados no tienen la capacidad para suplir del todo la función del β ME. Adicionalmente, también reportó que tanto la catalasa como la superóxido dismutasa adicionadas exógenamente son capaces de promover la sobrevivencia de células ES cuando son expuestas al ácido retinoico (Castro-Obregon 1996).

Un recurrido modelo para el estudio para la muerte celular programada ha sido el cultivo *in vitro* de estructuras embrionarias de ratón. En nuestro laboratorio se establecieron cultivos organotípicos embrionarios para la extremidad (Salas-Vidal 1998), el paladar (Cuervo 2002) y el cordón espinal (Sánchez-Carbente 2005), modelos que recapitulan la muerte celular de las regiones interdigitales, la línea media y de neuronas motoras, respectivamente. Utilizando el cultivo de extremidades, hemos reportado que la adición de antioxidantes exógenos tales como fenol, el DMSO (Salas-Vidal 1998) y el *EUK-134*, una molécula sintética que posee actividad tanto de superóxido dismutasa como de catalasa (Schnabel 2006), promueven la sobrevivencia celular en las regiones interdigitales. Así también, el *EUK-134* evita la muerte de motoneuronas en cultivos del cordón espinal (Sánchez-Carbente 2005).

Por otra parte, se detectó la expresión de las tres superóxido dismutasas (*SOD1*, *SOD2* y *SOD3*), catalasa y glutatión peroxidasa en la extremidad en desarrollo, que interesantemente disminuyen su expresión en las regiones interdigitales, justo cuando ocurre un aumento drástico en la concentración de EOR (Schnabel 2006). El ácido retinoico, la forma oxidada de la vitamina A, es el ligando para varios receptores

nucleares que promueven la transcripción de genes involucrados en varios procesos morfogenéticos. Cuando se adiciona exógenamente a cultivos de extremidad, se genera un aumento de muerte celular en las regiones más distales del dígito e interdígito, que esta asociada a un aumento de EOR así como a una disminución en la actividad de peroxidasa (ver anexo I). El mercaptosuccinato, un inhibidor específico para las glutatión peroxidadas, genera un aumento de la muerte celular principalmente en la punta de los dígitos. Dentro de la familia de las glutatión peroxidadas solo la isoforma de lípidos (*Gpx4*) se expresa en la extremidad en desarrollo, por lo que se plantea que juega un papel importante para el control de la muerte celular en esta estructura (Schnabel 2006).

El Dr. Salas reportó por primera vez la presencia de EOR durante el desarrollo embrionario del ratón (Salas-Vidal 1998). Utilizando anaranjado de acridina para develar muerte celular y MTT o DCF-DA para estrés oxidativo, observó que varias regiones embrionarias presentan un sobrelape en estos patrones. En estas zonas se encuentran las regiones interdigitales (12.5 dpc), las crestas y la línea de fusión durante la formación del paladar (14.5 dpc), la retina (10.5 dpc), en la línea de fusión para la formación del esternón (13 dpc), la vesícula ótica (que dará origen al oído; 9.5 dpc), la zona de unión entre el epitelio neural y el de superficie (8.5 dpc), el surco entre el proceso nasal lateral y el primer arco branquial (10.5 dpc), los folículos de las vibrisas (13.5 dpc) y la punta de la cola (14.5 dpc). Solo en los pliegues neurales y los arcos branquiales existe muerte celular sin un aparente aumento en EOR. Al igual que con otras regiones embrionarias, en el cordón espinal en desarrollo existe una relación positiva entre la presencia de EOR y muerte celular, pareciendo estar influenciada por la presencia de enzimas antioxidantes como las *SOD1*, *SOD2*, *catalasa* y *Gpx4*. En este modelo la muerte que obedece a un aumento en EOR es tanto dependiente como independiente de caspasas (Sánchez-Carbente 2005).

La evidencia experimental generada en nuestro grupo apoya la noción de que la producción de EOR forma parte normal del desarrollo embrionario permitiendo la activación de la maquinaria de muerte celular. En consecuencia, el regular tanto la producción como la degradación de los productos parciales de reducción del oxígeno resulta vital para establecer la homeostasis celular. Consecuentemente surge la pregunta: ¿como es que aumentan los niveles de EOR *in vivo*? Existen al menos tres posibilidades, la primera es que se genere un aumento en las actividades productoras de EOR, la

segunda es que haya una disminución de los sistemas antioxidantes o bien que ambas ocurran simultáneamente.

6.- La catalasa y su participación en la muerte celular programada.

La catalasa es una proteína compuesta por cuatro subunidades iguales de 60 KDa, donde cada subunidad posee un grupo hemo unido al sitio activo (Fita 1985). Esta enzima cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua a través de dos diferentes mecanismos: el modo catalítico y el peroxidativo. En modo catalítico toma dos moléculas de peróxido, una cede electrones oxidándose a oxígeno molecular mientras que la otra gana electrones reduciéndose a agua. En el modo peroxidativo utiliza varios metabolitos como donadores electrónicos para la reducción de H_2O_2 , tales como etanol, metanol, ácido fórmico y nitritos. La catalasa es una de las enzimas más eficientes que existen en la naturaleza con una K_m de 10-25 mM, siendo virtualmente insaturable bajo condiciones fisiológicas (Deisseroth 1970). Ya que el H_2O_2 es capaz de inactivar a las SODs mientras que el superóxido hace lo mismo con la catalasa, se ha propuesto que estas enzimas son mutuamente protectoras (Pigeolet 1990). La catalasa se localiza principalmente en peroxisomas pero se ha encontrado en mitocondrias de tejido cardíaco (Radi 1991), en el espacio extracelular del oviducto (Lapointe 1998), y en el citosol de eritrocitos (Nagababu 2003). Su distribución, sumada a la aparente falta de señales consenso para el importe hacia mitocondria o secreción, sugiere que podría existir más de un gen para catalasa, como lo reporta Dickerman en 1968. Sin embargo, con la información obtenida a partir de la secuenciación del genoma del ratón, es posible ratificar que solo existe un gen para esta enzima, llamado *cas-1*, el cual se localiza en el cromosoma 2 (Reimer 1994). A nivel de regulación génica, existen dos *locus*, *Ce1* y *Ce2*, capaces de controlar la actividad enzimática de la catalasa en hígado y riñón respectivamente (Grieshaber 1975; Hoffman 1974). Adicionalmente, existen varias proteínas capaces de unirse a la región 3' no traducida del mensajero de la catalasa, que presumiblemente participan controlando su tasa de traducción (Reimer 1996). En mamíferos, la catalasa se expresa de manera constitutiva durante la vida adulta, aunque sus niveles pueden variar significativamente de órgano a órgano, encontrándose en hígado los niveles más altos aunque también figuran el riñón, pulmón y eritrocitos (Percy 1984). Para comprender si la catalasa regula los niveles de EOR durante el desarrollo

embrionario, es importante establecer su presencia y los niveles de expresión durante este periodo. Desafortunadamente, existen pocos estudios al respecto. Sin embargo, se ha documentado la presencia del mensajero de la catalasa en hígado de ratón a partir de día 8 de gestación el cual aumenta hasta el día 18, aunque los niveles de actividad en este periodo son relativamente bajos. No es sino hasta después del nacimiento donde ocurre un aumento drástico en la actividad enzimática, misma que se asocia con la vida aerobia del ratón (el-Hage 1990). Otra manera de evaluar el papel de la catalasa como modulador de EOR durante el desarrollo embrionario se deriva de estudios de pérdida así como de ganancia de función. En el ser humano existe una enfermedad asociada a la falta de catalasa, la acatalasemia. Los primeros casos de esta padecimiento fueron reportados en Suiza y Japón desde los años setentas (Hirono 1995). Las personas que sufren de esta enfermedad desarrollan ulceraciones orales y, en casos más severos, gangrena alveolar y pérdidas dentales. Hoy día se reconoce que no es estrictamente acatalasemia sino que tienen disminuidos los niveles de actividad enzimática. También se han aislado cepas de ratones hipoacatalasémicos cuya niveles de catalasa varían dependiendo del tejido (Ogata 1991). La cepa de ratón mas afectada es la *Cs1^b* que a pesar de poseer actividades de catalasa del 1, 20 y 85% en eritrocitos, riñón e hígado respectivamente en relación a ratones normales, no presentan algún fenotipo observable. En la mosca de la fruta se han aislado alelos realmente acatalasémicos que manifiestan debilidad y letalidad días después de haber eclosionado de la pupa (Griswold 1993). Desafortunadamente, en estos estudios no es posible revelar su papel durante el desarrollo embrionario temprano debido a lo que se conoce como herencia materna, donde el embrión obtiene ARN mensajeros de la madre, de los que se derivan proteínas, entre ellos la catalasa.

Aunado a lo anterior y de manera importante la catalasa ha demostrado proteger de muerte celular generada por varios agentes que promueven daño al ADN (Bai 2003; Hiraku 1996), por radiación UVA/B (Bertling 1996; Rezvani 2008; Rezvani 2006), S-nitrocisteína (Bonfoco 1995), dietilmaleato (Li, P. F. 1997), cadmio (Oh 2006), ceramida (Iwai 2003; Kannan 2004), menadiona (Starke 1985; Starke 1985), dexametasona (Tome 2003), hiperglicemia y angiostencina II (Brezniceanu 2007), por xantina/xantina oxidasa (Li, P. F. 1997; Rubin 1984), glucosa/glucosa oxidasa (Starke 1985), lipoproteína de baja densidad oxidada (Lin 2004), niveles tóxicos de dopamina (Luo 1998), por la activación al receptor de *Fas* (Kasahara

1997), *TRAIL* (Perez-Cruz 2007), *TGF- β 1* (Islam 1997) y en un modelo transgénico para la diabetes en ratón, la sobreexpresión de catalasa protege a las células renales tubulares de apoptosis (Brezniceanu 2008). Se ha reportado la presencia de peróxido de hidrogeno en el fluido del blastocelo que parece mediar la muerte de células de la masa interna del blastocisto, ya que al adicionar catalasa se evita su eliminación (Gramzinski 1990). Los datos anteriores demuestran que el peróxido de hidrógeno genera una respuesta apoptótica en varios sistemas celulares, y que la catalasa siendo una de las enzimas que participan en su catabolismo evita esta muerte celular. Como se planteo antes, una posible causa del aumento en EOR observado durante el desarrollo embrionario es la regulación negativa de los sistemas antioxidantes, por lo que la catalasa pudiera jugar un papel preponderante sea a través de promover la sobrevivencia celular cuando esta presente o la muerte celular debido a su ausencia.

JUSTIFICACIÓN.

Aun cuando existen numerosas evidencias *in vitro* que demuestran que las EOR son capaces de activar la maquinaria de muerte celular, hace falta realizar estudios *in vivo* para demostrar que efectivamente ocurre de manera fisiológica. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que el aumento de EOR observado durante el desarrollo embrionario pudiera regular de manera positiva a la muerte celular programada. Debido a esto, es que la presencia o ausencia de los sistemas antioxidantes pudieran ser importantes al promover bien sea la sobrevivencia o la muerte celular. Específicamente este proyecto contempla, la modificación de la expresión genética de la catalasa como medio para modular los niveles de EOR tanto *in vitro* como *in vivo*, analizando su repercusión en la muerte celular programada, particularmente durante el desarrollo embrionario. Fueron varias las razones por las cuales utilizamos a la catalasa como blanco de nuestro estudio. Primeramente debido al carácter constitutivo de esta enzima, puesto que a la fecha del establecimiento de este proyecto se reporta su expresión en todos los tejidos analizados, exceptuando el páncreas (Lenzen 1996). En segundo lugar, la catalasa posee una eficiencia de degradación de sustrato en el rango milimolar, una de las mas altas encontradas en la naturaleza, demostrando actuar a concentraciones altas de peróxido, situación propuesta cuando se genera estrés oxidativo. Ya que durante la muerte celular se han reportado niveles elevados de EOR, la catalasa podría contender más eficientemente que otras enzimas antioxidantes al actuar de modo catalítico. Adicionalmente, como se ha expuesto anteriormente, la catalasa ha demostrado proteger de varios estímulos que promueven la muerte celular. Puesto que uno de los objetivos de ese trabajo era realizar estudios de pérdida de función, fue importante el disminuir en lo posible el efecto de redundancia funcional por otras enzimas relacionadas, resultando ser la catalasa una buena opción ya que en mamíferos solo existe un gen para esta enzima (Reimer 1994). Así, el eliminar y/o aumentar los niveles enzimáticos de catalasa permitirá entender la participación de esta enzima en la degradación del peróxido de hidrógeno tanto *in vivo* como *in vitro* y consecuentemente, en procesos celulares como la muerte celular. Adicionalmente, los resultados podrían contribuir a esclarecer algunos aspectos de enfermedades donde se ha involucrado a la catalasa.

HIPÓTESIS.

La pérdida de función de la catalasa conducirá a un estado pro-oxidante predisponiendo a las células a morir por apoptosis y por el contrario, su sobre-expresión disminuirá los niveles de peróxido de hidrógeno confiriendo resistencia a agentes que promuevan la muerte celular mediada por EOR.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Modificar la expresión genética de la catalasa como medio para modular los niveles de EOR tanto *in vitro* como *in vivo*, analizando su repercusión en la muerte celular programada.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.-** Determinar el patrón de expresión de la catalasa durante el desarrollo embrionario del ratón.
- 2.-** Generar una cepa de ratones mutantes nulos para catalasa con el fin de establecer si esta enzima es importante para el desarrollo embrionario, así como para regular los niveles de EOR y por ende la muerte celular programada.
- 3.-** Generar un ratón transgénico que posea niveles elevados de catalasa de manera constitutiva para poder disminuir los niveles de EOR durante el desarrollo embrionario y observar su efecto sobre la muerte celular programada.
- 4.-** Aumentar los niveles enzimáticos de catalasa en las células ES, analizando su efecto en cultivos bajo condiciones que promuevan la muerte celular.

RESULTADOS.

1.- El patrón del ARNm de la catalasa se restringe a zonas específicas durante el desarrollo embrionario.

Para determinar de manera general la presencia del transcrito de la catalasa durante el desarrollo embrionario del ratón, realizamos estudios de RT-PCR en el periodo de 8.5 a 15.5 dpc. Comenzamos a partir del día 8 dpc por las complicaciones metodológicas que involucra la cantidad de muestra sin contaminación de tejido materno en estadios más tempranos y hasta el día 15 dpc, puesto que ya existen reportes de expresión en etapas posteriores. El ARNm de la catalasa está presente en todos los estadios analizados, aunque sus niveles disminuyen ligeramente conforme avanza el desarrollo embrionario hasta 14.5 dpc, y aumentan drásticamente en 15.5 dpc (Fig. 5A). Con el fin de establecer si existe expresión de otras enzimas antioxidantes en los estadios embrionarios antes mencionados, se llevaron a cabo estudios de RT-PCR para las tres SODs. Si bien, los ARNm de *SOD1*, *SOD2* y *SOD3* están presentes en los estadios analizados, el correspondiente a *SOD3* fue único en variar cuantitativamente, disminuyendo su expresión a los 10.5 dpc (Fig. 5A).

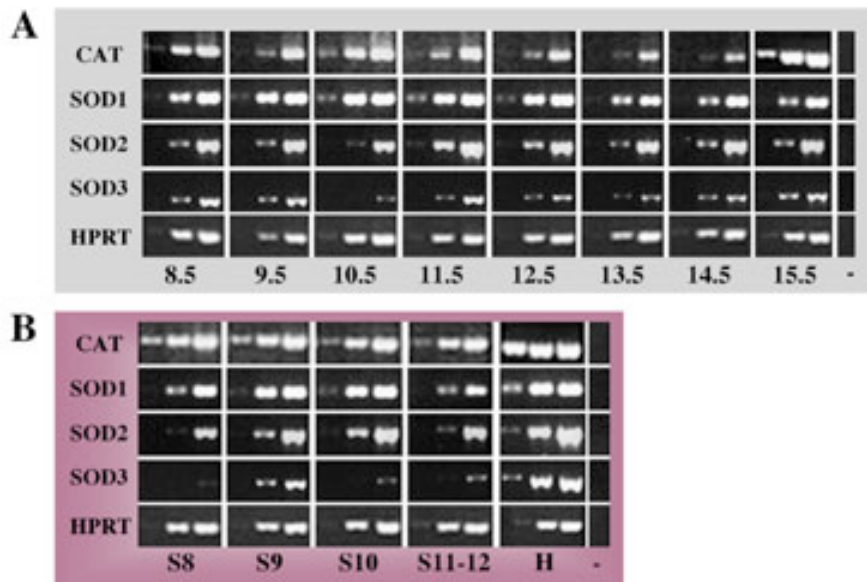


Figura 5.- Detección del ARNm de la catalasa, *SOD1*, *SOD2* y *SOD3* durante la embriogénesis del ratón. RT-PCR semi-cuantitativo de las diferentes enzimas antioxidantes utilizando: A) embriones enteros de estadios de 8.5, 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, 15.5 dpc y B) extremidades anteriores de las etapas S8, S9, S10-11. Se tomaron muestras a los 20, 25 y 30 ciclos de amplificación para poder observar la fase exponencial. H: Hígado, -: Control negativo.

Considerando la importancia de la extremidad como modelo de estudio de muerte celular programada en nuestro laboratorio, se llevaron a cabo estudios de RT-PCR para las diferentes enzimas antioxidantes en los estadios de S8 a S11, que corresponden a las etapas de 11.5-13.5 dpc. Dichos estadios comprenden etapas importantes de formación de la extremidad, como son la diferenciación entre las zonas digitales e interdigitales, la identidad e individualización de las falanges tanto por muerte celular como por crecimiento (Salas-Vidal et al 1999). El ARNm de catalasa se expresa en todos los estadios analizados de la extremidad, siendo más abundante en consideración con el embrión entero en su respectiva etapa del desarrollo. Al igual que en los estudios de embriones enteros, los transcritos para *SOD1* y *SOD2* están presentes sin variar significativamente. Sin embargo, el transcrito para *SOD3* no se expresa en S8, aparece en S9 y disminuye en S10 y S11. Cabe destacar que los niveles de las SODs en la extremidad no están enriquecidos comparado con los estudios en embriones enteros (Fig. 5B). Una vez establecida la presencia del mensajero de la catalasa durante el desarrollo embrionario, decidimos determinar los lugares de expresión por medio de estudios de hibridación *in situ* en embriones enteros y en la extremidad en desarrollo. Inicialmente se introdujo un fragmento de 609 pb perteneciente al ADNc de la catalasa en el vector *pKS-bluescript*. Este vector permitió realizar la transcripción *in vitro* del fragmento clonado para producir un ARN complementario al ADNc de la catalasa (antisentido) y marcado con digoxigenina. Un fragmento que posee la misma orientación del ADNc de la catalasa e igualmente marcado con digoxigenina (fragmento sentido), fue utilizado como control negativo de la hibridación *in situ*. Para corroborar la especificidad de las sondas empleadas, se ensayaron en fragmentos de hígado adulto, órgano donde la catalasa se expresa abundantemente. Solo la sonda antisentido generó una señal de expresión, demostrando así que puede ser utilizada para los estudios de hibridación *in situ* (Fig. 6A). Fue posible observar expresión en la línea media de fusión del paladar en estadio 14 dpc y en tejido pulmonar de 16.5 dpc (Fig. 6B-C). Debido a la poca difusibilidad de la sonda en el tejido de embriones tardíos, solo fue posible realizar este análisis en etapas de hasta 10.5 dpc. Así, encontramos expresión del transcrito de la catalasa en el epiblasto a los 7 dpc, zona de la cual se desarrollara el embrión (Fig. 6D). En estadios de 8.5 y 9.5 dpc su localización es constitutiva y en el estadio de 10.5 dpc, se encuentra enriquecido en la zona cefálica, el primordio de las extremidades, el primer arco branquial y el espacio entre somitas (Fig. 6E-G). Con el fin de determinar si la presencia del ARNm observada por RT-PCR e hibridación *in situ* corresponde a la

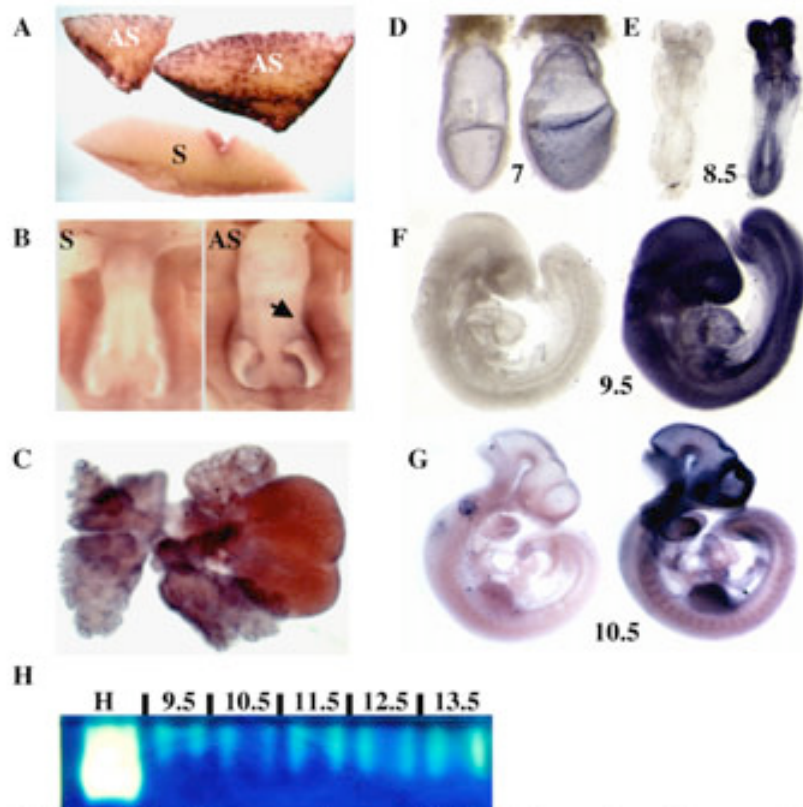


Figura 6.- Expresión del transcrito y actividad de la catalasa durante el desarrollo embrionario del ratón. Hibridación *in situ* para catalasa en: A) fragmentos de hígado adulto, B) paladar embrionario de 14 dpc, C) pulmón de 16 dpc, D-E) embriones de 7-10.5 dpc. Los embriones de la izquierda se trataron con la sonda sentido y los de la derecha con la antisentido. H) Gel de actividad para la catalasa en los estadios marcados. H= Hígado adulto.

presencia de la proteína, se realizaron geles de actividad específicos para catalasa [1] en estadios embrionarios 9.5-13.5 dpc (Fig. 6H). Los resultados indican que existe actividad de catalasa en todas las muestras analizadas, y que esta actividad se enriquece conforme avanza el desarrollo embrionario. Cabe mencionar que la falta de definición de la banda de catalasa en estos geles puede deberse a posibles modificaciones post-traduccionales en la proteína [2] y/o a que este tipo de geles se realizan en condiciones no desnaturizantes.

Empleando hibridación *in situ* en la extremidad en desarrollo del ratón, observamos que el ARNm de la catalasa está presente de manera constitutiva en estadios tempranos, restringiéndose más tarde a la zona interdigital, justo antes de que ocurra la muerte celular (Fig. 7A). En el estadio S10, está enriquecido en la región más distal del dígito, mientras que se encuentra ausente en la zona interdigital justo donde aparece la muerte celular. En el estadio S11, se encuentra delimitando la región del dígito y el interdígito. Realizando un solapamiento de los patrones de muerte celular y de la

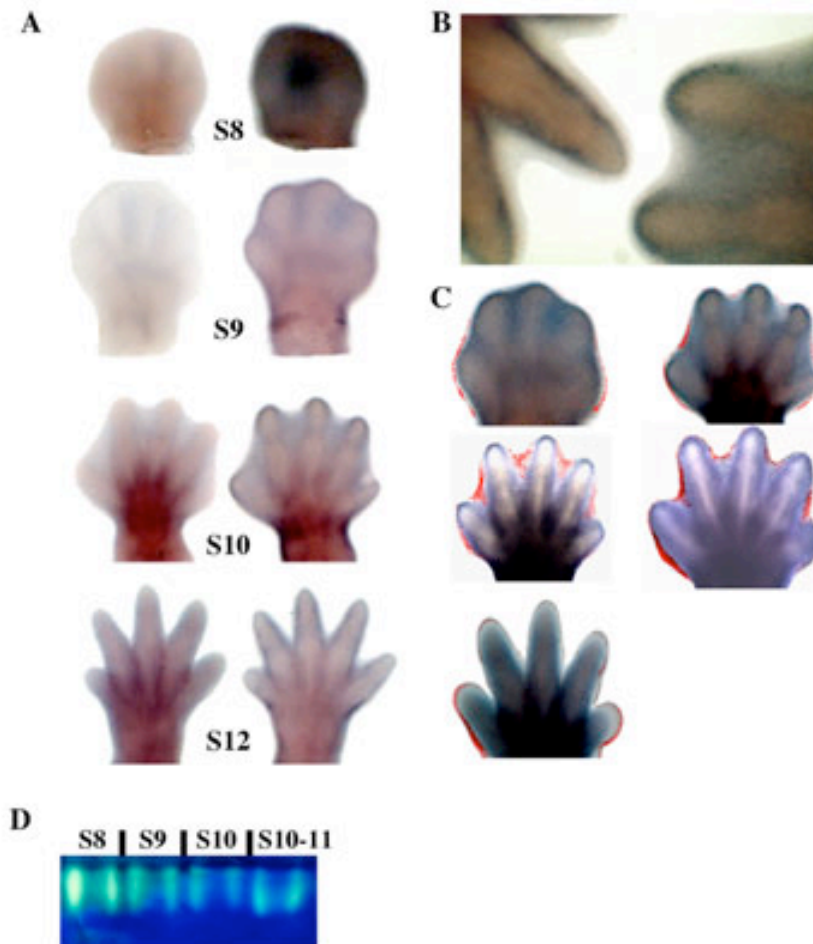


Figura 7.- Presencia de la catalasa en la extremidad en desarrollo. A) Expresión del ARN mensajero de la catalasa por hibridación *in situ* en estadios de S8-S12 en extremidades embrionarias de ratón. B) Acercamiento de extremidades en S10 y S11 donde se observa la falta del ARNm de la catalasa en las regiones más distales. C) Sobrelape de los patrones de muerte celular y del mensajero de la catalasa. D) Actividad de catalasa en extractos de extremidades de los estadios señalados.

expresión del ARNm de la catalasa observamos que son mutuamente excluyentes (Fig. 7C). Los estudios de hibridación *in situ* fueron apoyados observando la actividad enzimática en extractos de extremidades. La actividad está presente en todos los estadios analizados, particularmente enriquecida en la etapa S8, donde también se observa la señal más intensa por hibridación *in situ* (Fig. 7D).

2.- Generación de un ratón deficiente en catalasa.

Los resultados anteriores sugieren que la catalasa pudiera participar delimitando la producción de estrés oxidativo y por consecuencia la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario. Para probar esta hipótesis nos dimos a la tarea de eliminar el gen codificante para esta enzima en ratón. Llevamos a cabo lo que se conoce como “*gene targeting*”, donde utilizando recombinación homóloga en células ES, sustituimos un fragmento de la región genómica de la catalasa por el cassette de

selección “*PGKNeoloxPA*”. Este cassette contiene al gen que confiere resistencia a geneticina (*neo^r*) bajo la dirección del promotor del gen de la *fosfoglicerato kinasa* (*PGK*), aunado a una señal de poliadenilación en la región 3’. La geneticina (G418) es un antibiótico aminoglicósido similar a la gentamicina B1 y que bloquea la síntesis proteica al inhibir la etapa de elongación tanto en células procariontes como eucariontes. El gen *neo^r* codifica para la enzima aminoglicósido 3-fosfotransferasa, capaz de cortar a la geneticina, impidiendo así su efecto sobre la traducción y por lo tanto sirve para seleccionar aquellas células que han integrado el gen. Aunado a lo anterior, el cassette posee secuencias flanqueantes *loxP*, que son sitio de reconocimiento para la recombinasa *Cre*, permitiendo así la expulsión del cassette del genoma.

El segmento del *locus* genómico de la catalasa que se eliminó es un fragmento de 6.2 Kb, que contiene a los exones 4, 5, 6 y parte del 7. En esta región están codificadas las α -hélices 3-7 y las β -plegadas 2-6, y además contiene uno de los tres aminoácidos importantes para la conformación del sitio activo (Fig. 8).

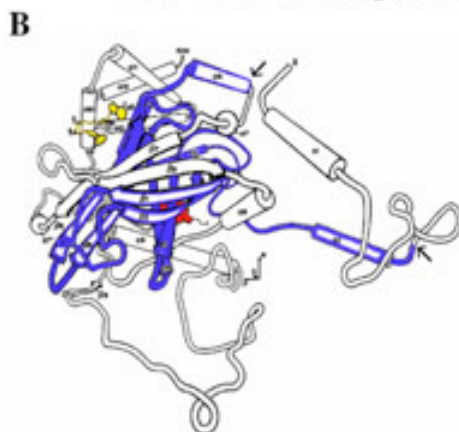
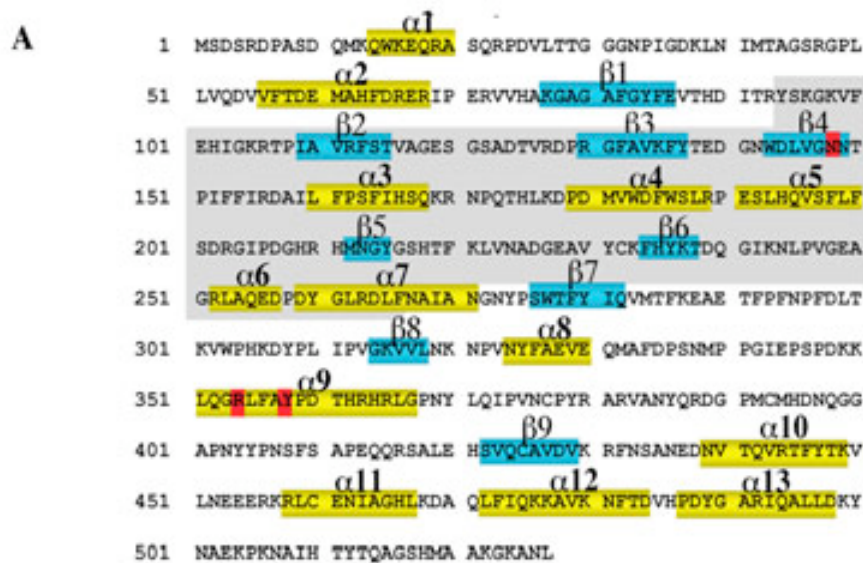


Figura 8.- La estructura primaria y terciaria de la catalasa. A) Secuencia aminoacídica para la catalasa donde se señalan las α -hélices 1-13 (recuadros amarillos), las β -plegadas 1-9 (recuadros azules), así como los tres aminoácidos importantes en la conformación del sitio activo (recuadros rojos). La zona marcada en gris es aquella que se elimina por la mutación y que va de Tyr94 a Phe226. B) Modelo tridimensional de un monómero de la catalasa tomado de Fita en 1985, donde se señala en azul los dominios que no están presentes en la mutante.

El primer paso para realizar este objetivo fue la construcción de un vector de recombinación homóloga (ver material y métodos pg. 68; Fig. 9A) que posteriormente fue introducido por electroporación en células ES. 24 horas más tarde comenzó la selección de aquellas células que incorporaron la construcción molecular por su resistencia a gentamicina, manteniéndose así el cultivo por 15 días hasta la formación de colonias. 500 colonias fueron analizadas por *Southern-blot* empleando sondas específicas para ambos lados del *locus* geonómico de la catalasa. Se identificaron tres clonas (BH1, BH10 y DG3) que resultaron positivas para el evento de recombinación tanto del extremo 5' como del 3' (Fig. 9B).

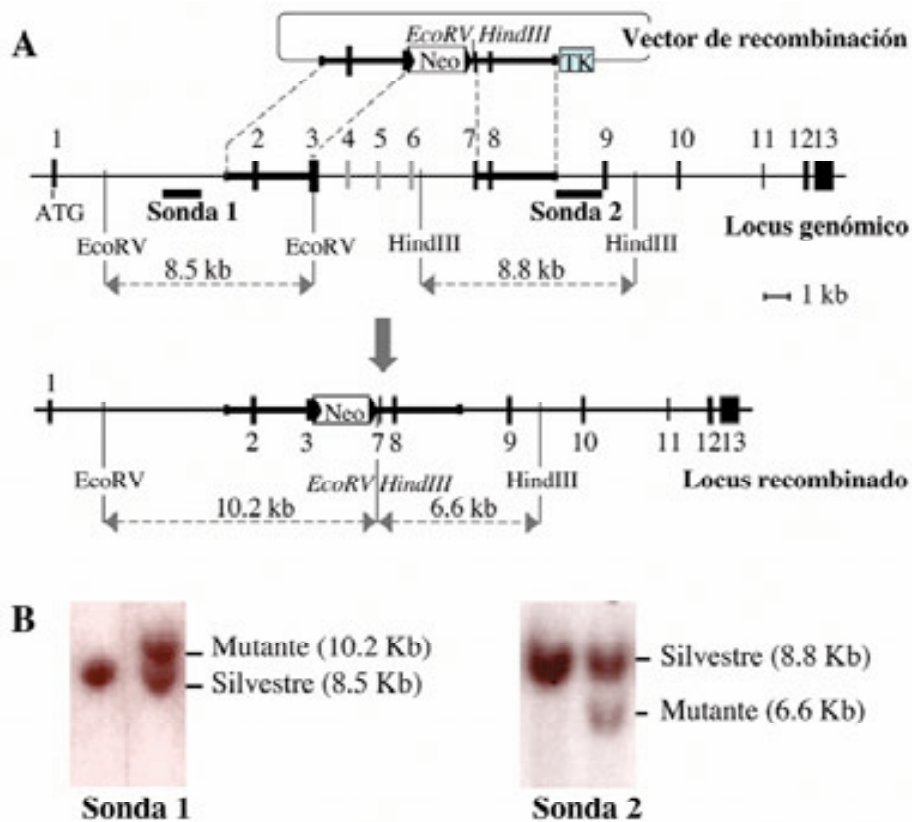


Figura 9.- Estrategia y resultados de "gen targeting" para la catalasa en células ES.
A) Esquema de la región genómica de la catalasa mostrando la estrategia para eliminar 6.2 Kb, que abarca los exones 4, 5, 6 y parte del 7. El vector de recombinación posee un brazo de homología 5' de 3.5 Kb y un brazo 3' de 3.3 Kb. Entre los brazos de homología se colocó un cassette de selección que confiere resistencia a gentamicina. B) Análisis de *Southern blot* empleando la sonda 1 y digiriendo el ADN genómico con la enzima de restricción *EcoRV*, obteniendo una banda silvestre de 8.5Kb y otra de 10.2 Kb cuando se llevó a cabo el evento de recombinación. Para el lado 3' se digirió el ADN genómico con la enzima *HindIII* hibridándose con la sonda 2 y generando una banda silvestre de 8.8Kb o de 6.6 Kb cuando es mutante. Cabe destacar que cuando se realiza *gen targeting en células ES*, solo una copia del gen se recombina, generando así células heterocigotas para la mutación.

Ya que algunos investigadores han observado que la pluripotencialidad de las células ES, medida por su capacidad para generar un alto grado de quimerismo en ratones, está asociada a un porcentaje bajo de aneuploidías, se determinó el cariotipo de las tres clonas aisladas. Células de la colonia BH1 con un 89 % de cariotipos normales se inyectaron a blastocistos de ratones de la cepa C57. 4 quimeras resultantes de esta transferencia se cruzaron con ratones C57 para buscar la segregación del gen mutante (Fig. 10).

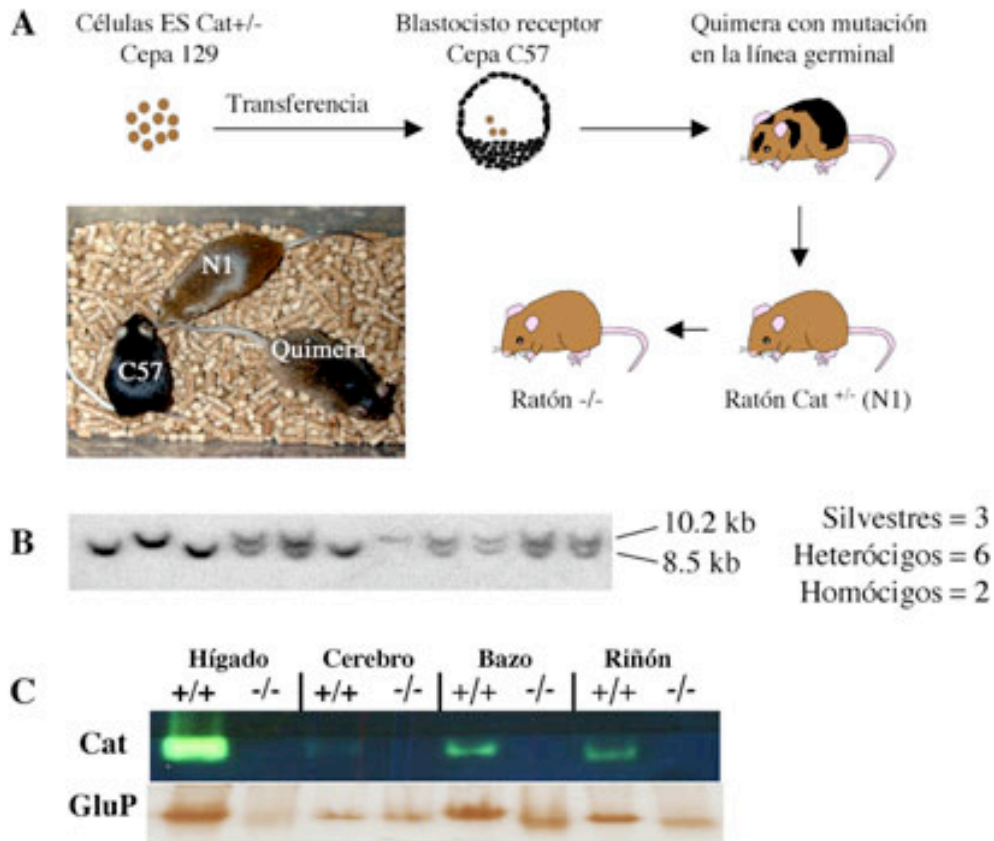


Figura 10.- Estrategia para la producción de un ratón nulo en la catalasa. A) Células ES heterocigotas para la mutación en el gen de catalasa están en un fondo genético de la cepa de ratones cafés 129. Estas células fueron transferidas a blastocistos de la cepa de ratones negros C57, para más tarde ser inyectados a hembras pseudopreñadas. De estos blastocistos, nacieron 4 ratones quiméricos que se cruzaron con ratones C57. Si las células ES $Cat^{+/-}$ dieron origen a la línea germinal en las quimeras, entonces la mitad de los ratones cafés que nazcan serán heterocigotos. Finalmente se cruzan los ratones heterocigotos entre sí para obtener los homocigotos. B) Southern blot para el extremo 5' empleando la sonda I y realizando con ADN proveniente de una camada, cruce de ratones heterocigotos. Se observa que ratones doble mutantes nacen en el radio mendeliano esperado. C) Actividad de catalasa y peroxidasa en extractos de tejidos provenientes de ratones silvestres y ratones homocigotos.

Así, se obtuvo un ratón heterocigoto para la mutación en el gen de catalasa, amplificando su población bajo un fondo genético de la cepa C57. Mas tarde, aquellos heterocigotos

fueron cruzados entre sí para obtener ratones homocigos ($cas^{-/-}$). De estas cruces se determinó que ratones homocigos para la mutación son viables, dado que nacen en la proporción mendeliana correcta 1:2:1 (Fig. 10B). Al analizar algunos tejidos de ratones homocigos comprobamos que la mutación fue efectiva al no observar actividad alguna en geles para catalasa (Fig. 10C). En un análisis preliminar, encontramos que no hay un aumento significativo en la actividad de peroxidasa en varios tejidos del ratón $cas^{-/-}$, lo cual disminuye la posibilidad de que estas enzimas pudieran subsanar la falta de catalasa (Fig. 10C).

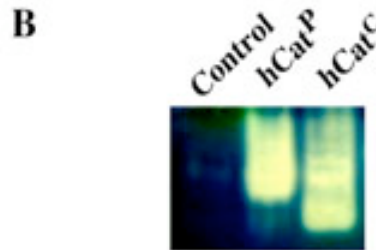
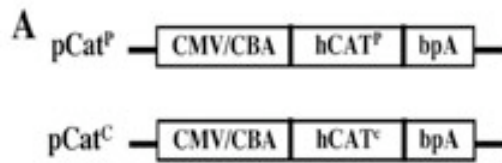
El fenotipo y el alcance de vida de los ratones $cas^{-/-}$, aparentemente son normales. Aún cuando hacen falta repeticiones para corroborar algunas observaciones realizadas en ratones homocigos, es conveniente mencionarlas para tenerlas en cuenta al tratar de explicar la asociación entre la falta de catalasa y el fenotipo resultante. Se observaron algunos individuos presentando lesiones en todo el cuerpo, debilidad muscular y actividad física disminuida. A nivel celular, se realizaron cortes semifinos de tejido hepático, donde aparentemente existe un aumento en el número celular sin que haya un incremento en el tamaño del órgano (dato no mostrado). Por lo que podemos concluir que la catalasa no es necesaria para que el desarrollo embrionario del ratón se lleve a cabo de manera normal y que su falta no afecta la vida adulta de manera importante, por lo menos bajo condiciones de mantenimiento estándar.

3.- Producción de un ratón transgénico para catalasa.

Aunado a la pérdida de función, realizamos estudios de ganancia de función de catalasa como una segunda alternativa para poder modificar el estado redox celular. Como se mencionó anteriormente, existen evidencias en la literatura que demuestran que la catalasa es capaz de evitar o disminuir la muerte celular en varios modelos, presumiblemente a través de suprimir la generación de EOR. El ratón $cas^{-/-}$ tiene la desventaja que solo en los lugares de expresión de catalasa es donde pudiera observarse un efecto en la concentración de EOR, sin embargo un ratón que sobre-exprese catalasa en todos los tejidos pudiera tener un efecto mas drástico y generalizado. Para esto creamos dos vectores de sobre-expresión para esta enzima, utilizando un promotor híbrido de naturaleza constitutiva, el *citomegalovirus/β-actina* de pollo (*CMV/CBA*), mismo que se empleó en la realización del ratón verde fluorescente [3]. Este promotor

dirige la transcripción del ADNc de la catalasa humana seguida por una señal de poliadenilación proveniente de la hormona de crecimiento bovino (pCat^P; Fig. 11A).

Figura 11.- Producción de un ratón transgénico para la catalasa. A) Dos construcciones se emplearon para sobre-expresar la catalasa, una codifica para la forma silvestre y peroxisomal (pCat^P), y la otra es citosólica al no poseer la señal de importe al peroxisoma (pCat^C). B) Gel de actividad para catalasa de extractos de células 293T transformadas transitoriamente con los vectores de sobre-expresión. Control= vector vacío. C) Actividad de catalasa en varios tejidos del ratón transgénico. S= silvestre, Tg= transgénico.



“KANL” es una secuencia consenso que posee la catalasa humana en la región carboxilo terminal, siendo suficiente y necesaria para su ubicación en el peroxisoma. Cuando esta señal no esta presente el sistema de transporte al peroxisoma no la reconoce y consecuentemente se localiza en el citosol [4]. Ya que una isoforma citosólica pudiera ser mas eficiente en degradar al peróxido de hidrógeno proveniente de otras fuentes que no sean el peroxisoma, es que eliminamos por PCR mutagénico la secuencia “KANL” en el ADNc de la catalasa para la generación del ratón transgénico (pCat^C; Fig. 11A). Ambas construcciones fueron introducidas por transfección transitoria a células 293T (línea celular proveniente de cultivos de riñón humano embrionario), para después analizar la expresión de catalasa utilizando geles de actividad (Fig. 11B). La unidad de transgénesis de la Universidad de Georgia, en Estados Unidos, fue responsable de microinyectar la construcción pCat^C a embriones de ratón. Esta unidad reportó que tras varios intentos solo pudo generar un solo ratón transgénico. Después de corroborar el genotipo y amplificar su población realizando cruza en la cepa C57, fue posible observar la actividad enzimática de catalasa en varios

tejidos (Fig. 11C). De estos, el corazón fue el único órgano que presentó un aumento significativo mientras que los niveles en cerebro e hígado solo se incrementaron ligeramente.

4.- Sobre-expresión de enzimas antioxidantes en células ES.

Con el fin de determinar si catalasa es capaz de proteger a células ES de estímulos que generen muerte celular, decidimos construir vectores moleculares adecuados para la selección de clones de células ES que sobre-expresen a esta enzima. Inicialmente, se introdujo el cassette *PGKNeoloxPA* a los vectores pCat^P y pCat^C, que a su vez se incorporaron a células ES mediante electroporación, para finalmente proceder a su cultivo en presencia de geneticina durante 15 días (Fig. 12A). De 60 colonias que fueron analizadas individualmente en geles de actividad para catalasa, se seleccionaron tres por cada construcción que contenían los niveles más altos para realizar los experimentos posteriores (Fig. 12B).

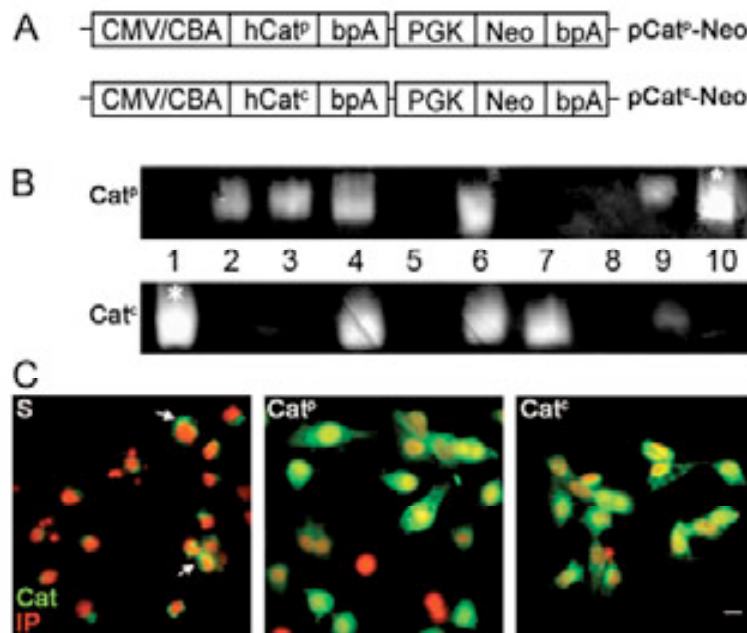


Figura 12.- Sobre-expresión de catalasa en células ES. A) A los vectores pCat^P y pCat^C les fue incorporado un cassette que confiere resistencia a geneticina para la selección de colonias ES transfectadas de manera estable. B) 60 colonias fueron amplificadas y analizadas por su contenido en catalasa por medio de geles de actividad (la figura solo muestra 10 líneas de cada isoforma). De estas se seleccionaron 3 para cada vector que presentaron los niveles más elevados de catalasa (en los geles se señalan con asteriscos). C) Localización de catalasa por inmunocitoquímica (señal verde, Cat) células ES silvestres y en aquellas que sobre-expresan catalasa por microscopía confocal. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja, IP). Barra = 10µm. S= silvestre.

Cabe mencionar que un 50 % de las colonias analizadas fueron resistentes a geneticina pero no sobre-expresaron catalasa. Los resultados de sobre-expresión fueron corroborados por inmunocitoquímica en las diferentes clonas, utilizando un anticuerpo específico para la catalasa (Fig. 12C). En la imagen se observa un patrón punteado en las células ES silvestres, debido presumiblemente a la localización peroxisomal de esta enzima, mientras que aquellas transformadas con las construcciones, el patrón es aparentemente citosólico, incluso para pCat^P, en donde se esperaba un patrón peroxisomal. Lo anterior puede obedecer a una saturación en el sistema de transporte al peroxisoma debido a la alta producción de esta enzima.

4.1.- Células ES que sobre-expresan catalasa se protegen del peróxido de hidrógeno.

Una vez aisladas y caracterizadas por su alto contenido en catalasa, estas líneas celulares se sometieron a varias condiciones que promueven muerte celular en células ES, como la falta de suero y de β -MEOH, la presencia de peróxido de hidrógeno, menadiona, o staurosporina (Fig. 13).

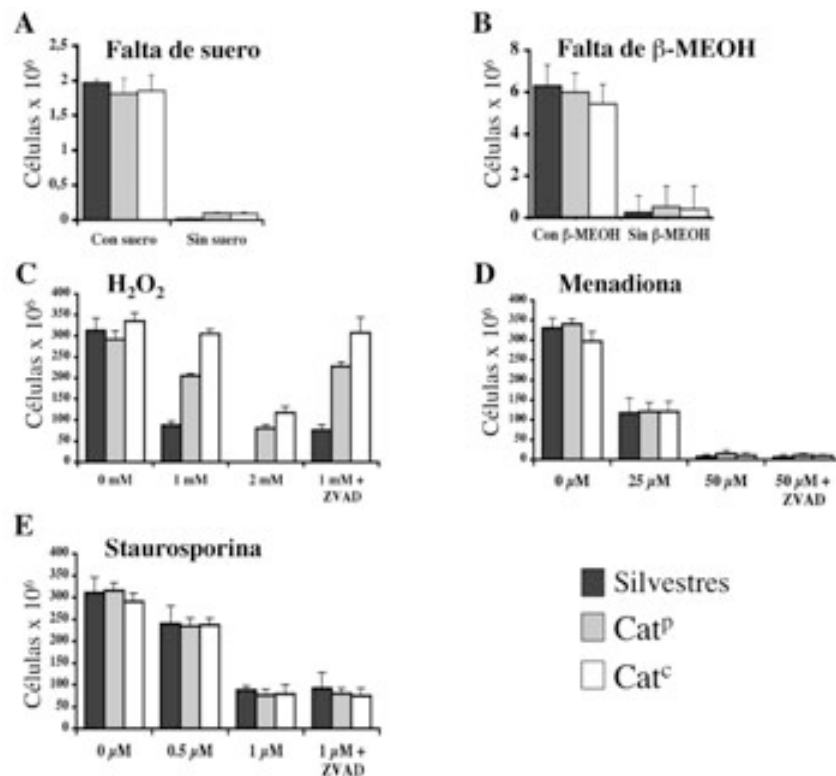


Figura 13.- Sobrevivencia de las células ES que sobre-expresan la catalasa en respuesta a peróxido u otros inductores de muerte celular. El número celular inicial y el tiempo de exposición varió de acuerdo a la condición empleada. Para la falta de suero, peróxido, menadiona y staurosporina, se emplearon 1×10^5 cels./cm², analizando su efecto a las 24 hrs. posterior a la adición del estímulo, excepto la falta de suero, que se llevó a cabo a las 72 hrs. Para la falta de β -ME, se emplearon 1.5×10^6 células en cajas de 6 cm. y se realizó su conteo a las 48 hrs.. La viabilidad fue determinada por la exclusión del colorante azul tripan.

Todas las condiciones empleadas generan muerte celular eficientemente tanto en las células ES silvestres como en aquellas transgénicas, con excepción del peróxido de hidrógeno que induce muerte en las células ES pero no en la línea transgénica que expresa la forma citosólica (Cat^C). Esta línea es 2.5 veces más resistente que la forma silvestre, incluso mas que la forma peroxisomal (Fig. 13C). Estos resultados se confirmaron por citometría de flujo empleando la incorporación de yoduro de propidio como marcador de células muertas (Fig. 14). La adición de zVAD.fmk, un inhibidor de caspasas de amplio espectro, no es capaz de evitar la muerte celular por peróxido de hidrógeno, menadiona o staurosporina, sugiriendo que estos agentes promueven muerte celular independiente de caspasas en células ES.

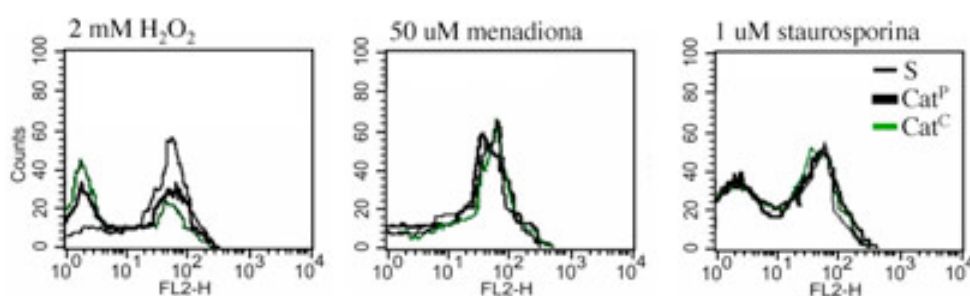


Figura 14.- Análisis por citometría de flujo de las células ES-Cat⁺ tratadas con diferentes inductores de la muerte celular. La densidad celular al inicio del cultivo fue de 1.25x10⁵ cels./cm². Después de 12 hrs. de adhesión al plato de cultivo, fueron expuestas al peróxido de hidrógeno, menadiona o staurosporina por 24 hrs. Las células muertas al incorporar el yoduro de propidio fluorescen permitiendo su cuantificación. S= silvestre. FL2-H= Intensidad de fluorescencia. Counts= número de células por cien.

4.2.- Menadiona promueve la muerte celular a través de un mecanismo independiente de la generación de las especies de oxígeno reactivas.

Ya que se ha propuesto que la menadiona promueve muerte celular a través de la generación de EOR (Singh 2007), y dado que la sobre-expresión de catalasa no es capaz de proteger a las células ES, es que decidimos corroborar si bajo esta condición existe estrés oxidativo por medio de la tinción con un agente redox sensible, el dihidroetidio (DHE; Fig. 15). Así mismo, como control positivo empleamos paraquat, un herbicida que genera superóxido. Ambos agentes son capaces de promover tanto la generación de EOR como muerte celular en células silvestres (Fig. 15), sin embargo, la sobre-expresión de la catalasa es capaz de inhibir solo la generación de estrés oxidativo por estos compuestos. Aunado a lo anterior, *EUK-134* una molécula que posee actividad de superóxido dismutasa y catalasa, en presencia de menadiona evita el estrés oxidativo pero sin promover sobrevivencia. Estas evidencias sugieren que la menadiona aunado a

su actividad pro-oxidante también es capaz de activar la maquinaria de muerte celular por otra vía aun no caracterizada.

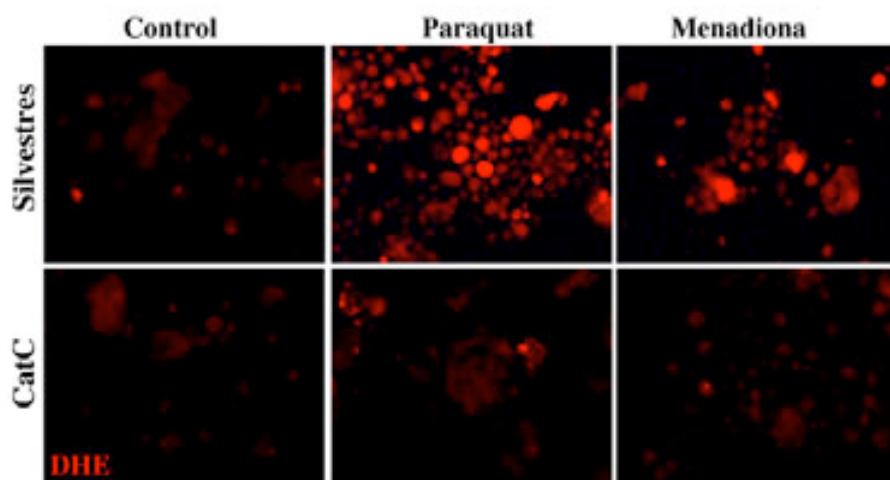


Figura 15.- Actividad antioxidante de catalasa y *EUK-134* en células ES tratadas con paraquat y menadiona. ES silvestres y ES-Cat^C se sembraron a una densidad de 1.25×10^5 cels./cm² y al siguiente día fueron cultivadas por 6 hrs. en presencia o ausencia de paraquat (0.8 mM) o menadiona (50 μ M). *EUK-134* (1.5 μ M) se adicionó 1 hora antes que los pro-oxidantes. Las EOR fueron detectadas por tinción con dihidroetidio (DHE). La forma oxidada del DHE (señal mas intensa) fue detectada en células silvestres pero no en ES-Cat^C o aquellas tratadas con *EUK-134*. Barra = 20 μ m.

4.3.- La sobre-expresión de la catalasa citosólica evita la muerte celular programada en el cuerpo embriode.

Puesto que en el modelo *in vitro* de la formación de los cuerpos embrioides ocurre muerte celular abundante y que, como se expuso anteriormente, el estrés oxidativo podría participar regulando positivamente al proceso de muerte celular, es que decidimos formar cuerpos embrioides a partir de las líneas que sobre-producen catalasa (Fig. 16). Dada la importancia del protocolo a seguir para una buena formación de los CE, en este trabajo ensayamos varios y es que hacemos hincapié en aquel que en nuestras manos resultó el más adecuado (ver material y métodos). Brevemente, este protocolo consiste en permitir la agregación de las células ES en cajas de cultivo por 3 días (D3+0). Posteriormente se despegan sutilmente los agregados para colocarlos en suspensión en cajas bacteriológicas por el tiempo que dure el cultivo. Utilizando este protocolo de diferenciación, estimamos que el proceso de muerte celular comienza en el séptimo día (D3+4) y finaliza mayoritariamente al décimo día de formación (D3+7). Se produjeron cortes semifinos de 200 cuerpos embrioides, tanto de la línea silvestre como

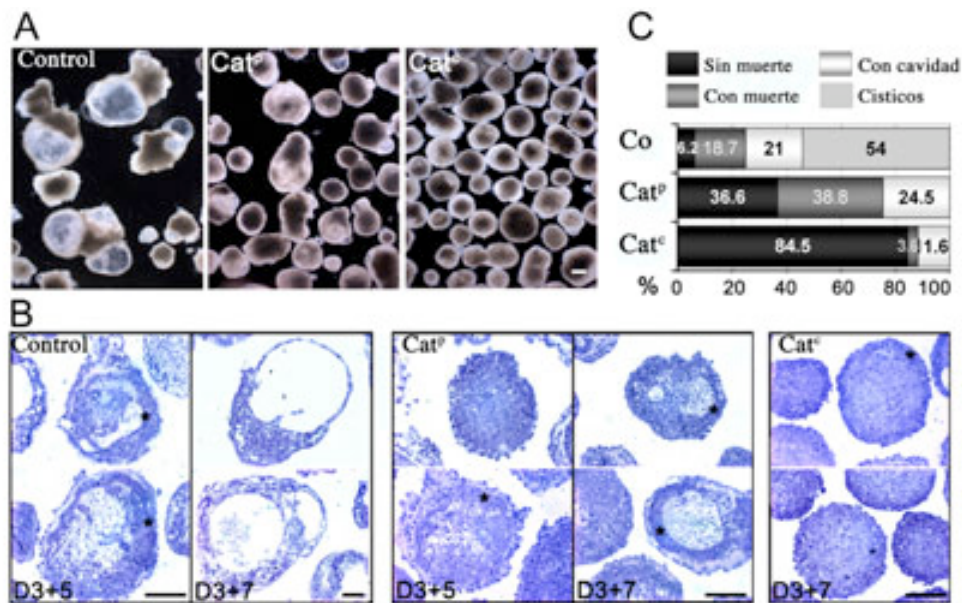


Figura 16.- Proceso de cavitación de CE derivados de las células ES-Cat⁺. A) CE visualizados por microscopía de luz transmitida en el estadio D3+7. B) Cortes de CE de 1 μ m después de teñidos con azul de toluidina. Se muestran fotografías representativas. C) El progreso del proceso de cavitación a D3+7 se estimó cuantificando el porcentaje de CE no cavitados, con o sin muerte celular abundante, CE con cavidad evidente o císticos. La mayoría de los CE silvestres fueron císticos mientras que aquellos derivados de la línea ES-Cat⁺ raramente cavitan. El desarrollo del CE-Cat^P parece retrasado, observándose algunos cavitados y otros císticos a D3+7. El epitelio columnar ectodermal puede ser distinguido en algunos CE no cavitados (marcados con asteriscos). Barra= 100 μ m. Co= Control.

de aquellas que sobre-producen catalasa, y se clasificaron de acuerdo a la etapa de desarrollo de los mismos. Así, en el estadio D3+7 solo un 6.2% de los CE formados a partir de la línea de células ES silvestres no presentan muerte celular estando el resto en etapas más avanzadas (Fig. 16B-C). Aquellos derivados de la isoforma peroxisomal (Cat^P) presentaron un retraso en el desarrollo del cuerpo embriode, con un porcentaje del 36.6% que no contienen muerte celular y no figurando cuerpos embrioides císticos. Comparativamente la gran mayoría (84.5%) de los CE derivados de la línea citosólica (Cat^C) no presentaron muerte celular. Este efecto se mantuvo incluso 13 días después de formados los CE de la línea Cat^C (D3+10; dato no mostrado). Seis líneas de células ES que sobre-expresan catalasa, 3 de la isoforma citosólica y tres de la peroxisomal presentaron el mismo fenotipo, sugiriendo que el efecto de no cavitación se debe al transgen y no al evento de inserción de éste en algún lugar del genoma.

Varios investigadores proponen que se requiere de una diferenciación correcta tanto de las células del endodermo como del ectodermo para que ocurra la muerte celular en el cuerpo embriode [5]. Una posibilidad es que en las líneas que sobre-producen catalasa se haya afectado la diferenciación y por consecuencia la muerte celular, por lo que nos dimos a la tarea de analizar la expresión de los marcadores *Bmp2*

y *Fgf5*, que se han utilizado para evidenciar diferenciación hacia endodermo y ectodermo, respectivamente. Realizando estudios de RT-PCR observamos expresión de *Bmp2* y *Fgf5* en los cuerpos embrioides provenientes tanto de la línea silvestres como de aquellas que sobre-expresan catalasa (Fig. 17).

Estos resultados aunados a la morfología celular en cortes semifinos de cuerpos embrioides indican que el proceso de diferenciación no se afectó por la sobre-expresión de esta enzima. Puesto que la única función que se le ha atribuido a la catalasa es la eliminación de peróxido de hidrógeno, los resultados anteriores sugieren que en los CE se genera esta especie reactiva como una señal para promover muerte celular.

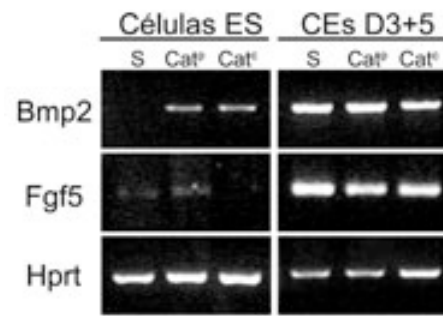


Figura 17.- Análisis por RT-PCR para marcadores de endodermo y ectodermo. El ARN total proveniente tanto de células ES como de CE fue utilizado para realizar ensayos de RT-PCR utilizando cebadores específicos para *bmp2* (endodermo), *fgf5* (ectodermo) y *hprt* (control de carga). S= Silvestre.

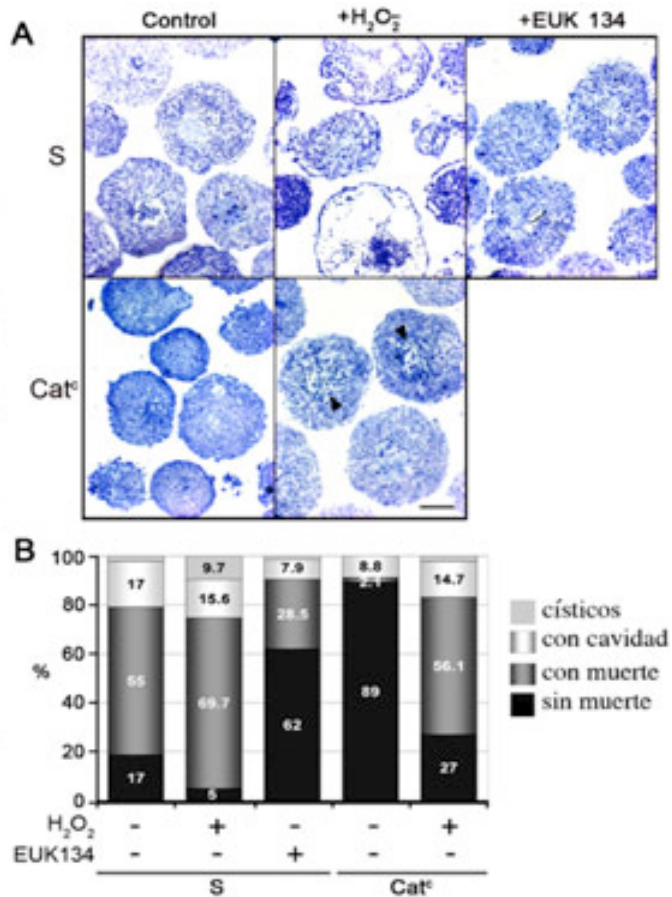
4.4.- El peróxido de hidrógeno rescata parcialmente la muerte celular por efecto de sobre-expresión de catalasa.

El *EUK-134* es un compuesto que posee actividad antioxidante de catalasa/superóxido dismutasa y que ha sido utilizado para inhibir la acumulación de EOR. Por ello utilizamos este compuesto para tratar de corroborar el efecto de no cavitación por la sobre-expresión de catalasa. Sometimos a cuerpos embrioides silvestres a varias concentraciones de *EUK-134*, rangos tomados a partir de curvas de toxicidad en células ES así como de reportes previos donde demuestran protección antioxidante por este compuesto (Sánchez-Carbente 2005). Para analizar su efecto, realizamos conteos morfológicos de cuerpos embrioides expuestos al *EUK-134* en cortes semifinos (Fig. 18).

Al octavo día, un 28.5% de los CE tratados con *EUK-134* presentaron muerte celular comparado con un 55% observado aquellos cuerpos embrioides sin tratar. Por lo que el *EUK-134* al igual que la sobre-expresión de catalasa es capaz de inhibir o retrasar el proceso de muerte celular en el CE. Por el contrario, al adicionar peróxido de hidrógeno al medio de cultivo, observamos un aumento del 15% en la proporción de los CE que presentan muerte celular así como de aquellos que están císticos (Fig. 18). Al aplicar el mismo tratamiento de peróxido a cuerpos embrioides derivados de la línea

Cat^c, se incremento drásticamente la proporción de aquellos que presentan muerte celular, de un 2.1% a un 56.1%. Interesantemente, este aumento en muerte celular se observó mayoritariamente en las células centrales del CE, sugiriendo que estas presentan una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Así, el aumento de antioxidantes como catalasa y *EUK-134* o la exposición a peróxido de hidrógeno generan un efecto opuesto, sugiriendo que las EOR participan regulando positivamente la muerte celular en este modelo.

Figura 18.- Efecto de antioxidantes y peróxido de hidrógeno en la cavitación del CE. CE silvestres (S) y aquellos derivados de ES-Cat^c, fueron tratados con peróxido o *EUK-134*. A) Cortes semifinos de CE en estadio D3+5 teñidos con azul de toluidina. B) La cavitación y la muerte celular fueron evaluadas como se menciona en la figura 4. El peróxido acelera la cavitación de CE silvestres, mientras que induce muerte celular en aquellos derivados de ES-Cat^c (note los núcleos condensados señalados con cabezas de flechas). Por el contrario *EUK-134* reduce la muerte celular y la cavitación. Barra= 100µm.



4.5.- Sobre-expresión de superóxido dismutasa en el cuerpo embriode.

En el laboratorio, la Lic. Sandra Gómez construyó un plásmido que posee las secuencias necesarias para la expresión de la proteína verde fluorescente fusionada a la superóxido dismutasa 1 (*GFP-SOD1*; Fig. 19A). Este vector se transformó inicialmente en células *COS-7* (línea derivada de riñón de mono) para comprobar la actividad de *SOD1* y más tarde en células ES, para seleccionar tanto en ensayos de *Western-blot* como en geles de actividad para SOD, a aquellas clonas que contenían los niveles más altos de la proteína recombinante (Fig. 19B-C).

Utilizando estas líneas de células ES transgénicas, se generaron cuerpos embrioides analizando su morfología en cortes semifinos al octavo y décimo día de desarrollo. (Fig. 19C). Al octavo día es visible una reducción en el tamaño y cierta desorganización celular en el CE que sobre-expresan *GFP-SOD1*. Sin embargo, al décimo día no se observan diferencias perceptibles con respecto a los silvestres. Interesantemente, la sobre-expresión de *SOD1* no es capaz de evitar la muerte celular que ocurre en el centro del CE, sugiriendo que el superóxido no es el radical responsable de activar la maquinaria de muerte celular.

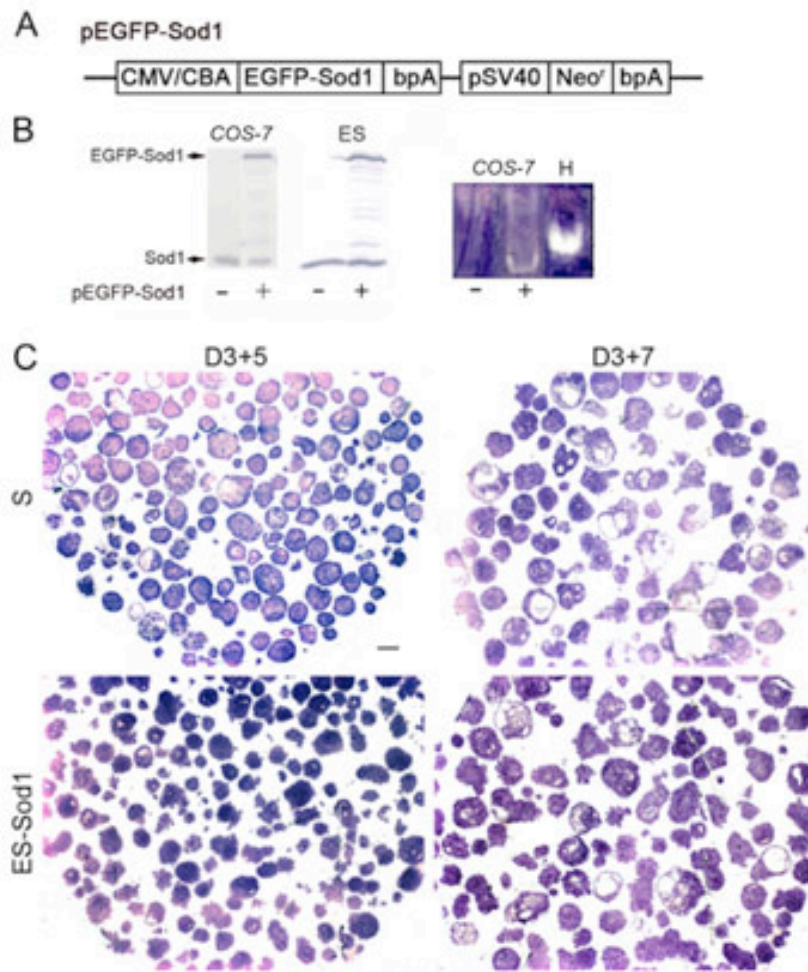


Fig. 19.- La sobre-expresión de superóxido dismutasa (*Cu-Zn SOD1*) en cuerpos embrionarios. A) Vector que posee un cassette de selección para neomicina y la proteína de fusión *EGFP-SOD1* bajo la dirección del promotor híbrido CMV/CBA. B) *Western-blot* utilizando un anticuerpo específico para *SOD1*, en células *COS-7* y ES. Gel de actividad para superóxido dismutasa en *COS-7*. Como control negativo se emplearon células sin transfectar. H = hígado C) Las líneas de células ES que sobre-producen *SOD1* se utilizaron para hacer cuerpos embrioides analizando su efecto en la capacidad para cavitarse.

4.6.- Presencia de especies de oxígeno reactivas en el cuerpo embriode.

Debido a que la adición de catalasa o *EUK-134* inhiben la apoptosis en el CE, es de suponer que ocurre la producción de EOR como una señal para activar la maquinaria de muerte celular. Por tanto, decidimos corroborar lo anterior a través de teñir cuerpos

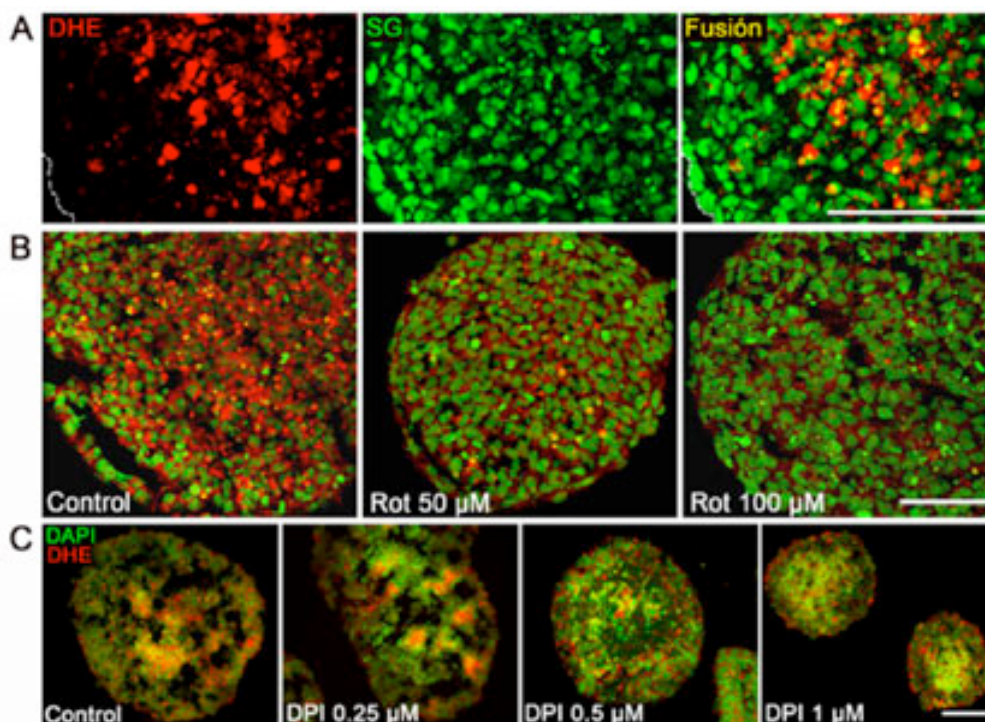


Figura 20.- Presencia de EOR en el CE. A) CE en el estadio de D3+3 formados bajo condiciones normales, B) en presencia de *rotenona* (Rot), C) o con *iodonio de difenilo* (DPI). La tinción para visualizar los núcleos se realizó con *sytoxgreen* (SG) o con DAPI (pseudocolor). La tinción con DHE se observa mayoritariamente en las células centrales del CE. Solo la *rotenona* causa una evidente disminución en la tinción con DHE. Barra= 50 μ m.

embrioides de varios estadios con DHE (Fig. 20A). Observamos la presencia de estrés oxidativo en las células centrales del CE a partir del séptimo y hasta el décimo día de desarrollo, etapa donde la formación de la cavidad casi ha terminado. Es de notar que temporalmente la producción de EOR precede a la muerte celular ya que este proceso se evidencia hasta el octavo día.

Una pregunta necesaria que nos planteamos fue el tratar de determinar cual era la fuente de producción de EOR en el CE. Y para contestarla empleamos dos inhibidores, la *rotenona* y el *DPI* (Iodonio de difenilo), el primero actúa sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y el segundo inhibe a las *NADPH oxidasas*. Ambos agentes fueron incluidos en el medio de cultivo durante el desarrollo del CE, analizando su efecto mediante la tinción para EOR con DHE (Fig. 20B-C). Así, solamente con *rotenona* fue posible observar una disminución dosis-dependiente sobre

la tinción con DHE, sugiriendo que la fuente principal de EOR es la cadena respiratoria mitocondrial.

4.7.- La participación de caspasas durante la cavitación del cuerpo embriode.

Con la idea de corroborar la falta de muerte celular en los CE que sobreproducen catalasa, es que realizamos estudios de inmunocitoquímica utilizando como marcador de apoptosis, un anticuerpo que reconoce específicamente la forma activa de la caspasa 3. En el CE silvestre, se observa una señal enriquecida en la parte central. Sin embargo, en aquellos que sobre-expresan catalasa no se detectó señal alguna. (Fig. 21A).

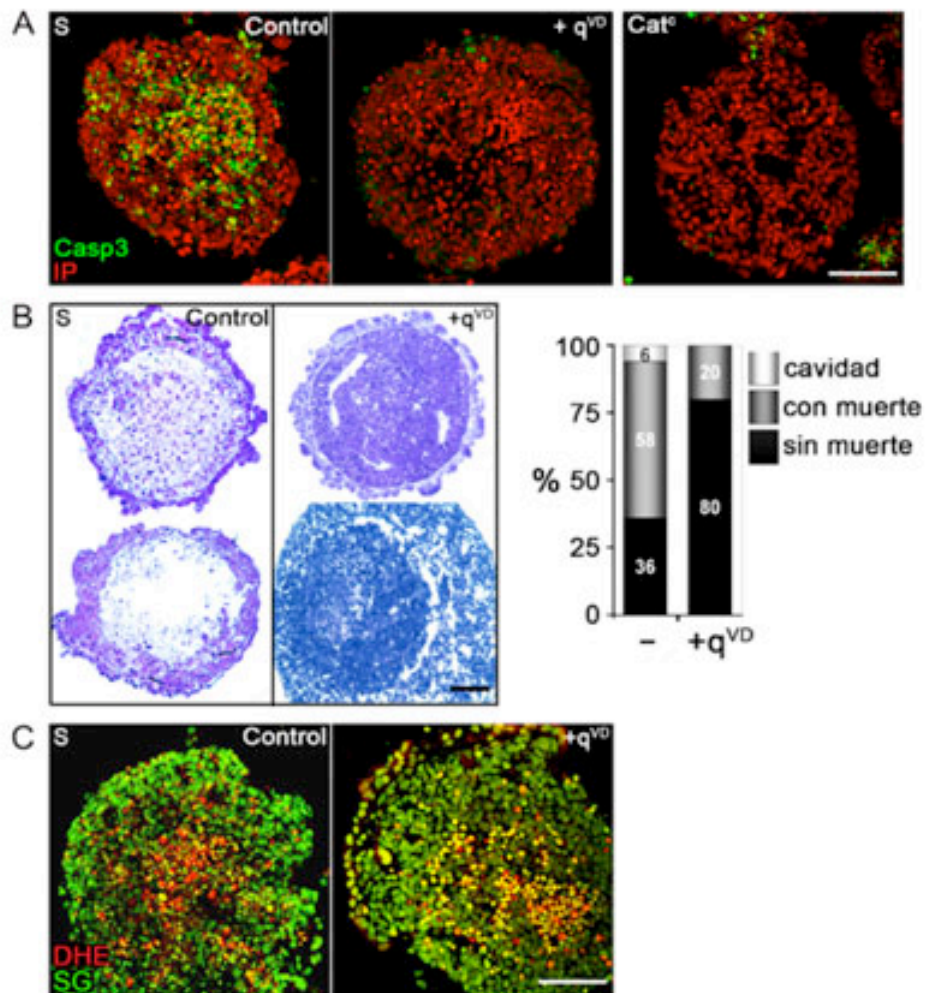


Figura 21.- La activación de *caspasa 3* y su función durante la cavitación del CE. A) La forma activa de la *caspasa 3* (Casp3, señal verde) fue detectada por inmunocitoquímica en CE silvestres (S), en ausencia o presencia de q^{VD} así como también en aquellos que sobre-expresan catalasa. Los núcleos están teñidos con yoduro de propidio (IP; señal roja). B) Muerte celular, cavitación y niveles de EOR (C) en CE tratados con q^{VD}, fueron analizados en cortes semifinos o por tinción con DHE. Note que q^{VD} reduce los niveles de *caspasa 3* activa, la muerte celular y la cavitación, pero no la cantidad de EOR en las células centrales. La sobre-expresión de catalasa disminuye la actividad de caspasa a niveles indetectables como lo hace el q^{VD}. Barra = 50 μ m.

Como se expuso anteriormente, las caspasas son proteasas que participan de manera activa durante el proceso apoptótico. Joza y colaboradores (2001) han sugerido que las caspasas no son necesarias para la muerte celular en este modelo, puesto que cuerpos embrioides mutantes nulos en caspasa 9 o caspasa 3 cavitan de manera normal. Esta suposición pudiera ser errónea debido a la posible redundancia funcional entre caspasas. Así, en este trabajo probamos esta hipótesis cultivando cuerpos embrioides silvestres con q^{VD} , otro inhibidor de caspasas de amplio espectro pero más estable que zVAD, y analizamos su efecto en cortes semifinos a los 10 días de desarrollo (Fig. 17B). La adición de q^{VD} disminuye la señal por inmunocitoquímica para caspasa 3 (Fig. 21A), y reduce la proporción de cuerpos embrioides que contienen muerte celular de 58 a un 20% a los 10 días de desarrollo. Es de notar que la mayoría de los CE tratados con este inhibidor contienen una masa celular sólida central mientras que otros se expanden a pesar de no presentar apoptosis. (Fig. 21B). Interesantemente, se detectó la presencia de EOR en los CE tratados con q^{VD} , indicando que su producción es anterior a la activación de las caspasas. Bajo este tratamiento, los núcleos teñidos con DHE se observan completos y colocalizando mejor con la tinción para núcleos con *sitoxgreen* (Fig. 21C). Así, estos datos sugieren, en contraste a lo que propone Joza y colaboradores, que las caspasas son necesarias para que ocurra la muerte celular en el CE.

4.8.- La función de *Aif* durante el proceso de cavitación del cuerpo embrioide.

Siguiendo con la idea de establecer la vía por la cual el estrés oxidativo promueve muerte celular, enfocamos nuestra atención en *Aif*. *Aif* es una flavoproteína evolutivamente conservada que se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial. De manera natural esta proteína juega un papel importante en la cadena respiratoria mitocondrial, pero bajo un estímulo de muerte celular *Aif* se transloca al núcleo para inducir la condensación de la cromatina y la fragmentación a larga escala del ADN [6]. Varios investigadores han propuesto a la vía de muerte celular inducida por *Aif* como independiente de caspasas ya que estas proteasas no son necesarias para que *Aif* se transloque al núcleo. Por otra parte, se ha descrito la presencia de *Aif* durante la cavitación en el CE (Joza 2001). Una posibilidad es que durante este proceso ambas vías funcionen de manera independiente. Sin embargo, el estrés oxidativo es el común denominador ya que al inhibirlo por la sobre-expresión de catalasa se abate la muerte

celular. Para contar con más elementos que permitan entender la participación de *Aif* y las EOR en el proceso de cavitación, es que inicialmente tratamos de establecer si el estrés oxidativo es una señal que desencadena la liberación de *Aif*. Por ello sometimos a células ES a un estímulo de peróxido de hidrógeno estableciendo la localización de *Aif* por inmunocitoquímica (Fig. 22A).

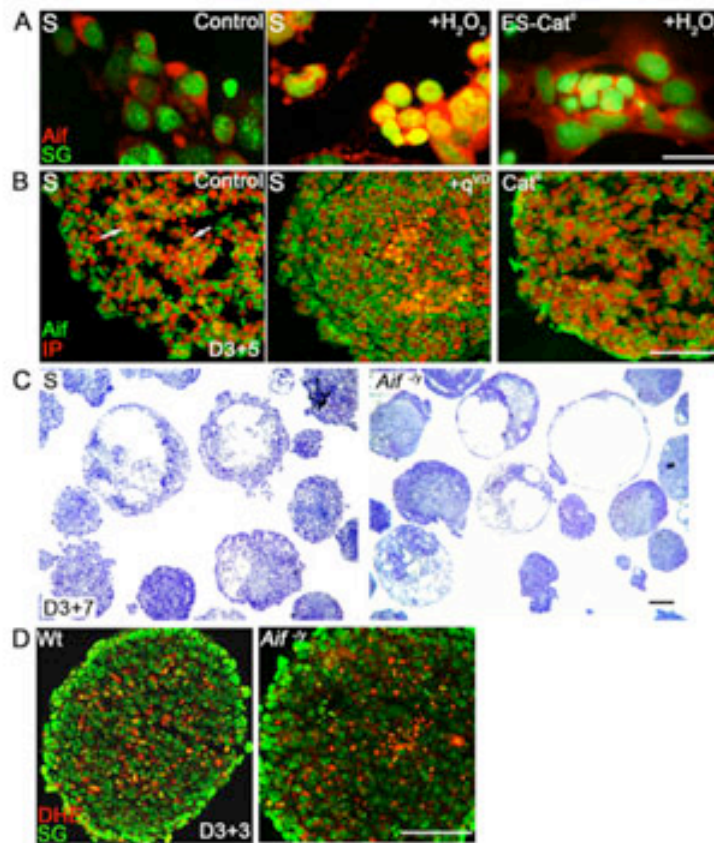


Figura 22.- La función y liberación de *Aif* durante el proceso de cavitación en el CE. A) Inmunodetección de *Aif* en células ES cultivadas en ausencia o presencia de peróxido de hidrógeno por 24 hrs. *Aif* se transloca al núcleo bajo el tratamiento con peróxido (señal amarilla) en células ES silvestres pero no en aquellas que sobre-producen catalasa (barra= 25 μ m). B) *Aif* se encontró en los núcleos de las células centrales del CE. La translocación de *Aif* no se observó en CE-Cat^c y no puede ser prevenida por la inhibición de caspasas. C) Cortes semifinos de CE derivados de células ES silvestres (S) o aquellas nulas para *Aif* (*Aif*^{-/-}), y colectados al día D3+7. CE silvestres o *Aif*^{-/-} cavitan de manera similar y poseen los mismos niveles de EOR (D). *Sitoxgreen* (SG) o *yoduro de propidio* (IP) se emplearon para visualizar los núcleos. Barra de escala en B,C y D= 100 μ m.

Así, el peróxido de hidrógeno es una señal que permite la translocación de *Aif* al núcleo y, contrariamente la sobre-expresión de catalasa la evita. En el CE ocurre un fenómeno similar, donde *Aif* se transloca al núcleo en las células mas centrales como lo reporta Joza (2001), pero nuevamente la sobre-producción de catalasa inhibe su movimiento (Fig. 22B). Lo anterior sugiere que la translocación de *Aif* es el resultado de la

producción de estrés oxidativo. Cabe resaltar que en presencia de q^{VD} , *Aif* sigue translocándose al núcleo, reafirmando que esta funciona en una vía independiente de caspasas y señalando que ambas ocurren durante la muerte celular en el cuerpo embriode.

Haciendo una comparación entre *Aif* y la base de datos del *Gene Bank* resultó que esta proteína posee similitud con las *NADH oxidasas* de bacterias, y mas aún en ensayos funcionales *in vitro*, presenta actividad generadora de superóxido [7]. Con el fin de discernir si el propio *Aif* es la fuente del estrés oxidativo, teñimos cuerpos embrioides derivados de células ES nulas para *Aif* con DHE (*Aif*^{-y}, Fig. 22D). Estos cuerpos embrioides presentan una producción normal de estrés oxidativo, lo cual sugiere que las EOR actúan por encima de la vía de *Aif* y por lo tanto, no son consecuencia de la actividad de esta proteína.

Joza reporto en el 2001 que cuerpos embrioides derivados de células ES *Aif*^{-y} no presentan muerte celular y por lo tanto no cavitan, sugiriendo que la activación de la vía de *Aif* es indispensable para el proceso de cavitación. Sin embargo, Brown y colaboradores demostraron a través de varias estrategias, que *Aif* no es necesario para el proceso de cavitación en el CE, ni para la formación de la cavidad proamniótica en el embrión [8]. Según Brown, la discrepancia entre ambos reportes pudiera obedecer a diferencias en el protocolo empleado para la diferenciación de los CE.

Ya que nosotros empleamos las mismas células ES *Aif*^{-y}, nos dimos a la tarea de ratificar estos resultados. En nuestras manos, los CE derivados de células ES *Aif*^{+/y} cavitan de manera normal (Fig. 22C). Lo que nos lleva a concluir que la activación de la vía de *Aif*, aun cuando ocurre no es indispensable, y que el mecanismo principal por el cual se genera muerte celular en el CE es dependiente de caspasas.

Lo anterior nos permite sugerir que el estrés oxidativo, en particular el peróxido de hidrógeno, es una señal que promueve muerte celular durante el proceso de cavitación en el CE a través de activar tanto la vía de *Aif* como aquella dependiente de caspasas.

DISCUSION Y PERSPECTIVAS.

1.- El patrón de expresión de catalasa.

Los resultados de este trabajo arrojan la noción de que la catalasa se expresa abundantemente durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, considerando los resultados que se obtuvieron y aquellos ya publicados, queda por analizar el período que

abarca desde la etapa de blastocisto hasta el séptimo día de desarrollo. Dado que el patrón de expresión fue determinado utilizando la presencia del transcrito de la catalasa, queda por establecer si realmente este es indicativo de la presencia de la proteína, ya que la observación que se realizó fue solo a través de geles de actividad. Una alternativa para esclarecer de manera definitiva el patrón de expresión de esta enzima antioxidante puede ser por medio de generar ratones “*knock-in*”, donde se introduciría por “*gene targeting*” un gen reportero en fase como el de la proteína verde fluorescente bajo el promotor endógeno de la catalasa. Si esta GFP tuviera una señal consenso a peroxisoma este ratón podría emplearse para realizar estudios ya sea de biogénesis de peroxisomas o aquellos que involucran a los llamados proliferadores de peroxisomas que generan cáncer hepático en ratón [9].

2.- La pérdida de catalasa.

La finalidad de los estudios de expresión fue constatar la presencia de enzimas antioxidantes para sustentar la idea que pudieran estar delimitando el estrés oxidativo y consecuentemente la muerte celular programada. Los resultados de este trabajo junto con los de las Dras. Denhi Schnabel y Maria del Rayo Sánchez constatan la presencia tanto de superóxido dismutasas, peroxidasas y catalasa durante el desarrollo embrionario. En el modelo de la extremidad todas las enzimas antioxidantes se excluyen de la zona donde se presenta el estrés oxidativo y la muerte celular. Por lo que parte de la hipótesis que propone que la ausencia de los sistemas antioxidantes pudiera contribuir a un aumento en el estrés oxidativo es todavía viable. Sin embargo, hacen faltan estudios tanto de pérdida como de ganancia de sistemas antioxidantes para comprobar si son indirectamente causantes del estrés oxidativo. Por lo anterior, es que nos dimos a la tarea de generar el ratón nulo para catalasa. Ho y colaboradores también llevaron a cabo estudios de pérdida de catalasa en ratón [10]. Sus observaciones son iguales a las nuestras, donde ratones *cas*^{-/-} no presenta fenotipo alguno, pero reportan que existe una disminución en la actividad de transferencia electrónica en la cadena respiratoria mitocondrial sin poder explicar el porqué de este fenómeno.

Es interesante que no haya habido ninguna consecuencia por la eliminación del gen de catalasa, siendo esta una proteína que se expresa abundantemente durante el desarrollo embrionario. La redundancia funcional de los sistemas antioxidantes pudiera ser la causa de la falta de fenotipo, por lo que sería necesario producir la pérdida de

varios de ellos para lograr disminuir de manera significativa la capacidad antioxidante. A pesar de la falta de fenotipo en el ratón *cas^{-/-}*, creemos que es necesario determinar si la concentración de EOR se modificó durante el desarrollo embrionario de estos ratones, particularmente en la extremidad.

En la actualidad, nuestra hipótesis al respecto es que la catalasa junto con otros sistemas contribuye a la capacidad antioxidante durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, a nivel organismal pudiera tener un papel preponderante en un contexto metabólico, debido a su enriquecimiento en microcuerpos del tejido hepático. Varios sistemas enzimáticos que operan en el peroxisoma generan como subproducto H_2O_2 , en particular durante la β -degradación de ácidos grasos de cadena larga. Durante periodos de hambruna o en ejercicio prolongado, la degradación de ácidos grasos es importante para la generación de energía, actuando por igual tanto en la mitocondria como en el peroxisoma. Por lo que la catalasa podría ser importante bajo estas condiciones promoviendo la degradación del H_2O_2 y de esta manera evitar el daño oxidativo a los sistemas multienzimáticos que operan en el peroxisoma. En el laboratorio planeamos realizar estudios comparativos entre ratones silvestres y aquellos *cas^{-/-}* bajo diferentes condiciones que promuevan la actividad metabólica peroxisomal, como son el ejercicio y la administración de proliferadores de peroxisomas. Estos últimos son drogas de tipo fibratos (ácidos carboxílicos anfipáticos), que al unirse a los llamados receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) inducen la transcripción de genes que codifican para proteínas peroxisomales. Estos PPARs han sido relacionados a diferentes procesos como diferenciación, metabolismo, inflamación, cicatrización y conversión neoplásica [11].

La importancia de la actividad peroxisomal en el metabolismo celular se vuelve obvia al observar los defectos bastante severos en enfermedades peroxisomales. Personas con el síndrome de Zellweger, una enfermedad recesiva autosomal, no poseen peroxisomas y presentan niveles altos de ácidos grasos de cadena larga. Los síntomas incluyen: retardación psicomotora, disfunción hepática, hipotonía y/o pérdida de la visión. Este síndrome es letal a edades tempranas. Una vía metabólica faltante en estos individuos es la producción de plasmalógenos (glicerofosfolípidos en los que una de las dos cadenas acil está unida al glicerol por un enlace éter alquénil y enriquecidos en órganos como el corazón, sistema nervioso, riñón y gónadas), siendo presumiblemente la causa de los desordenes neurológicos presentados por estos individuos. En un grupo

de complementación de este síndrome, la catalasa se localiza en el citosol al parecer debido a un problema en el sistema de importe al peroxisoma. El posible aumento de H_2O_2 , debido a la falta de catalasa, provoca daño oxidativo de los componentes multienzimáticos peroxisomales, ya que el reintroducir esta enzima a fibroblastos de estos pacientes, restablece el metabolismo normal en estos microcuerpos [12]. Así, los síntomas de Zellweger pudieran ser presentados en ratones *cas*^{-/-}, aunque de manera superficial no son evidentes. Por lo que se vuelve interesante y necesario llevar a cabo experimentos donde se analice el metabolismo peroxisomal en ratones *cas*^{-/-}, para comprobar si la falta en catalasa verdaderamente recapitula lo observado en la enfermedad de Zellweger.

De los estudios de pérdida de función de los sistemas antioxidantes resaltan el de *Gpx4*, *γGcs*, *Trx1*, *Trx2*, *TrxR1* y *TrxR2*, cuya mutación es letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario [13], evidenciando la importancia de mantener los niveles de EOR en concentraciones bajas para una adecuada homeostasis. Sin embargo, queda aún por analizar el efecto de estas mutaciones sobre la generación de estrés oxidativo y muerte celular durante el desarrollo embrionario (ver anexo 3).

3.- Ganancia de la catalasa en ratón.

La unidad de transgénesis de la Universidad de Georgia, encargada de microinyectar la construcción molecular reportó que tras varios intentos solo pudo derivar un ratón transgénico. Debido a la naturaleza constitutiva del promotor empleado, una posibilidad es que la sobre-expresión de catalasa en todos los tejidos pudiera ser letal para el desarrollo embrionario y aquel que sobrevivió lo hizo gracias al carácter restrictivo de la expresión.

Durante un insulto de hipoxia/ reoxigenación, fenómeno que ocurre en algunas afecciones cardíacas, se ha reportado la producción de EOR y muerte celular de células del miocardio. Empleando un promotor específico para dirigir la expresión de catalasa a músculo cardíaco Chen y colaboradores reportaron un aumento de 60 veces más catalasa, observando que esto aminora algunos síntomas que se presentan durante la hipoxia/reoxigenación como son: reducción en la fuerza contráctil y ritmo cardíaco, la arritmia y las alteraciones morfológicas [14].

La estreptozocina es una droga que es empleada para atacar al cáncer metastático de células pancreáticas, induciendo muerte celular al parecer por inhibición

de la síntesis de ADN. También ha sido empleada para promover un fenotipo diabético en el ratón. Empleando el promotor de insulina para dirigir la expresión de catalasa a las células β -pancreáticas (lugar donde los niveles endógenos de catalasa son muy bajos), Xu y colaboradores pudieron obtener un aumento de 50 veces de los niveles normales y es en este modelo donde la catalasa evita el efecto diabesogénico de la estreptozocina [15].

Schneider en el año 2005, generó cepas de ratones con niveles elevados de tres isoformas de catalasa (peroxisomal, nuclear y mitocondrial) resultando que solo aquellos con la isoforma mitocondrial presentan una disminución en cardiopatías, en el desarrollo de cataratas y en la producción de H_2O_2 , así como un aumento en la vida media y máxima. El corazón, músculo esquelético y cerebro fueron los tejidos donde se observó sobre-expresión. Cabe destacar que este grupo utilizó el mismo promotor que empleamos nosotros para la sobre-expresión de catalasa citosólica. Este grupo comenta también la naturaleza de mosaicismo en el patrón de expresión de catalasa en estos ratones indicando que una expresión amplia podría resultar letal para el desarrollo embrionario [16].

Recientemente se publicó un estudio de sobre-expresión empleando 80 Kb de la región genómica que contiene al gen de la catalasa y sus secuencias regulatorias, al parecer sin observar fenotipo alguno [17]. Con esa estrategia, se obtuvieron niveles elevados de expresión de 2-4 veces comparado con los silvestres en casi todos los tejidos. Sin embargo, en los sitios donde normalmente se pudiera estar apagando esta enzima, como en las zonas interdigitales embrionarias, en estos animales transgénicos también se apagaría sin poder evaluar un efecto sobre la producción de EOR y muerte celular. Por lo anterior, una posibilidad sería el realizar ensayos de microinyección de la construcción de sobre-expresión, disectando y genotipificando embriones en varios estadios a fin de comprobar si ocurre un efecto letal en esta etapa. Otra manera de llevarlo a cabo es generar ratones a partir de líneas de células ES que sobre-expresan catalasa. Inicialmente haciendo quimeras, que de entrada la contribución al tejido nos hablaría de si la sobre-expresión de catalasa tendría algún efecto selectivo.

La sobre-expresión de otros sistemas antioxidantes se ha llevado a cabo pero siempre con expresión restringida a ciertos órganos o tejidos. Estos estudios apoyan la noción que los mecanismos antioxidantes son importantes para evitar el daño oxidativo

sin embargo, no se ha analizado su efecto sobre la producción de EOR durante el desarrollo embrionario.

4.- Sobre-expresión de la catalasa en las células ES.

A pesar de observar un incremento importante en la actividad de catalasa en las células ES, creemos que hace falta corroborar estos resultados con estudios de *Western-blot* para establecer de manera mas fina el aumento en la proteína. Es interesante que a pesar de presentar aparentemente la misma actividad y el mismo patrón de expresión de catalasa entre las isoformas peroxisomal y citosólica (Fig. 12), exista una respuesta diferencial al H_2O_2 y en el efecto en la cavitación del CE. Por lo que se pudieran llevar a cabo estudios de fraccionamiento bioquímico analizando la actividad de catalasa tanto en microcuerpos como en el citosol, para así establecer si es que la localización es responsable de esta discrepancia.

De los agentes o condiciones empleadas para promover muerte celular en células ES, solo del H_2O_2 se protegen las células que sobre-expresan catalasa. Al ser el peróxido de hidrógeno el substrato natural de la catalasa es de esperar tal protección. Lo anterior indica que la falta de suero y de β -ME, así como menadiona o staurosporina son capaces de activar la maquinaria de muerte celular independiente de la generación de EOR, o dicho de otra manera, la presencia de EOR no es necesaria para generar muerte celular bajo las condiciones antes mencionadas. El caso de menadiona es interesante puesto que se ha postulado que su principal mecanismo para promover muerte celular es a través de la generación de EOR. En este trabajo demostramos que efectivamente si aumentan los niveles de EOR pero que estos no son necesarios para que se lleve a cabo la muerte celular. Puesto que nosotros determinamos la muerte celular a las 24 hrs. de iniciado el tratamiento, una posibilidad es que las EOR si participan en el proceso de muerte celular pero que no son indispensables, por lo que al medir la muerte celular a tales tiempos ya las células murieron por mecanismos independientes a la producción EOR. Para probar esta hipótesis, se podrían realizar los mismos ensayos cuantificando la muerte celular a tiempos más cortos.

En el mismo sentido de lo previamente reportado por la Dra. Susana Castro, encontramos que la sobre-expresión de catalasa no es capaz de subsanar la falta de β -ME en células ES. El β -ME es un agente capaz de reducir puentes disulfuro, mecanismo por el cual estaría ejerciendo su actividad protectora en las células ES. Una posibilidad

es que el β -ME pudiera estar reduciendo de manera específica a ciertas proteínas afectando su función y por ende promover sobrevivencia. La adición de sistemas antioxidantes no necesariamente afectaría la reducción de estas moléculas blanco por lo que ambos sistemas no funcionarían al mismo nivel, explicando así el efecto no protector de sobre-expresar catalasa. Puesto que el β -ME es un factor indispensable en el cultivo de las células ES, se vuelve interesante el estudiar el mecanismo por el cual es capaz de promover sobrevivencia. Para poder identificar tales proteínas, se podrían realizar estudios de proteómica donde ya sea en presencia o ausencia de β -ME, se observe el perfil proteico en geles bidimensionales, señalando así las proteínas sensibles a la falta de β -ME. Una vez identificadas se llevarían a cabo una serie de experimentos para comprobar si estas son responsables de la sobrevivencia de las células ES.

Por otra parte, zVAD no es capaz de promover sobrevivencia de células ES expuestas al peróxido de hidrógeno, menadiona o staurosporina inclusive bajo la sobre-expresión de catalasa, señalando que estos agentes generan muerte celular por una vía independiente de caspasas. Sin embargo creemos que es importante repetir estos resultados con otros inhibidores de caspasas más estables como es el caso del qVD. Cabe destacar que bajo el efecto del peróxido de hidrógeno, *Aif* se transloca de la mitocondria al núcleo en células ES, sugiriendo que esta podría ser la vía alterna al de las caspasas para promover muerte celular. Sería interesante probar esta hipótesis al exponer células ES *Aif*^{+/y} a estos agentes y bajo la presencia del inhibidor de caspasas, observando su efecto en la muerte celular.

5.- Sobre-expresión de la catalasa en el cuerpo embrioide.

En el modelo del CE, ocurre tanto el proceso de diferenciación como muerte celular. Se ha propuesto que la muerte celular de las células centrales del CE es dependiente de una correcta diferenciación, inicialmente hacia endodermo y la generación de la lámina basal, y posteriormente hacia el ectodermo con la formación del epitelio columnar. En este sentido, la ausencia de varias proteínas durante la formación del CE, tales como *integrina β 1* [18], *FGF* [19], y *BMPs* (Coucouvanis 1999) generan un efecto de no cavitación en el CE, fenómeno que responde mas a un efecto sobre diferenciación que en muerte celular.

El desarrollo del CE es un sistema que nos permitió evaluar la participación de las EOR en el proceso de muerte celular. Así, encontramos que la sobre-expresión de

catalasa en el CE (CE-Cat⁺) es capaz de prevenir la cavitación sin afectar el proceso de diferenciación.

Fue importante encontrar producción de EOR en el CE y que este aumento está relacionado a la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, es posible que este aumento en EOR también pudiera estar obedeciendo a una disminución de los sistemas antioxidantes en las células centrales del CE. Durante el rescate del fenotipo de no cavitación en los CE-Cat⁺ por H₂O₂, observamos que las células centrales del CE son las que se ven más afectadas, sugiriendo que estas pudieran estar bajo una condición, que las sensibiliza a la muerte celular. La disminución de los sistemas antioxidantes podría ser tal condición, por lo que se vuelve interesante analizar la presencia o ausencia de las principales enzimas antioxidantes durante el proceso de cavitación del CE.

Siguiendo con la idea de sobre-expresar enzimas antioxidantes en el CE, demostramos que la expresión de *SOD1* no afecta la cavitación, aunque es importante considerar que los niveles de actividad pudieran no ser suficientes. Por otra parte, en una condición donde aumente *SOD1* pero que estén disminuidas las actividades removedoras de H₂O₂, los niveles de este último aumentarían promoviendo así la muerte celular, por lo que se vuelve necesario e interesante detectar la presencia de estrés oxidativo en los CE-*SOD1*⁺.

Para poder validar los resultados *in vitro*, fue que en algunas ocasiones intentamos detectar EOR en embriones que expresan la proteína verde-fluorescente, de 4 dpc, etapa donde se forma la cavidad proamniótica. Este objetivo no fue posible realizarlo debido a la inaccesibilidad del embrión, la poca tasa de difusión del DHE, la baja proporción de células que mueren y la rapidez con que se lleva a cabo este proceso. En este punto valdría la pena volver a intentar estos mismos experimentos ya con más experiencia.

Al fusionar los blastómeros de un embrión de dos células por electrofusión, se genera un embrión que posee el material genético duplicado (4n), y que puede ser cultivado hasta la etapa de blastocisto. Al introducir células ES a blastocistos tetraploides se generan embriones quiméricos, donde las células tetraploides solo son capaces de generar tejido extra-embriionario, permitiendo que el embrión se derive en su totalidad, de las células ES introducidas [20]. Por lo que una manera de evaluar si el

fenómeno de no cavitación en el CE por catalasa se recapitula *in vivo*, es produciendo embriones tetraploides utilizando células ES-Cat⁺.

En este trabajo demostramos que en la muerte celular que ocurre durante el desarrollo del CE se activan dos vías: la independiente de caspasas representada por la translocación de *Aif* al núcleo, y aquella dependiente de caspasas, siendo esta última suficiente y necesaria para que ocurra la muerte celular y la cavitación del CE (Fig. 23).

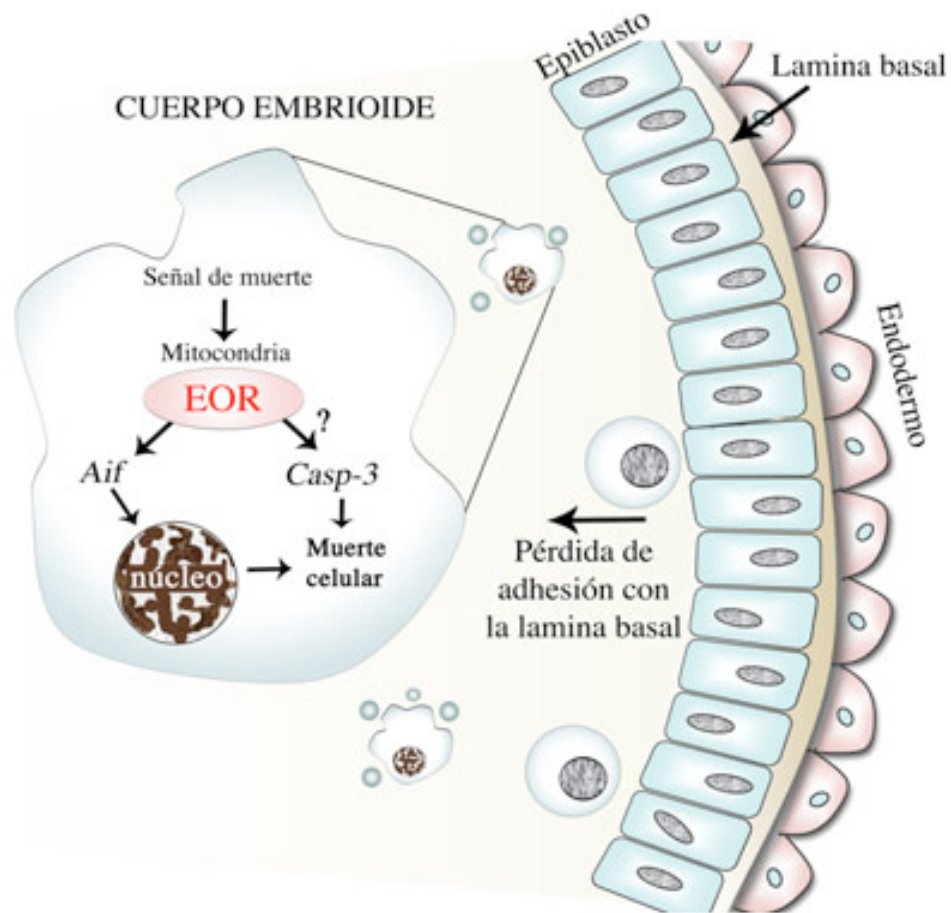


Figura 23.- Modelo de la muerte celular en el cuerpo embrioide.

Una pregunta que queda por resolver es ¿cual es el mecanismo molecular por el cual el peróxido de hidrógeno es capaz de activar la maquinaria de muerte? Una posibilidad es que la producción de EOR pudiera tener como efecto inmediato la peroxidación de lípidos en las membranas mitocondriales, llevando a la pérdida de potencial y a su permeabilización, permitiendo que factores pro-apoptóticos como citocromo c y *Aif* se liberen con sus subsecuentes consecuencias.

Y por otra parte, ¿A través de qué mecanismo se activa el programa que conduce a la generación de estrés oxidativo y a la muerte celular de las células centrales del CE? Se ha propuesto la pérdida de adhesión con la lámina basal como una señal que activa a

la muerte celular, aunque también podría ser la falta de factores tróficos que promuevan la sobrevivencia de las células centrales al no diferenciar a células del epiblasto. El factor de respuesta a suero (*SRF*) es un factor transcripcional que tras unirse al elemento de respuesta suero (SER) en regiones promotoras, permite la transcripción de genes blanco. Este factor ha sido relacionado con procesos como proliferación y diferenciación. Sin embargo, en células ES promueve sobrevivencia a través de inducir la expresión de genes antiapoptóticos como *bcl-2* y *bcl-x_L*. Al expresar ectópicamente *bcl-2* se evita la muerte celular generada por la falta de SRF en células ES. Los CE derivados de células ES *SRF^{-/-}* tienen disminuidos los niveles de *bcl-2*, presentan muerte celular de manera no regulada y no cavitan [21]. Por lo que no sería sorprendente encontrar señales extracelulares que pudieran estar regulando la expresión o actividad del SRF para que tanto la sobrevivencia como la muerte celular ocurran de manera normal en el CE y posiblemente durante la formación de la cavidad proamniótica.

Hasta la fecha no existen evidencias contundentes para establecer si las EOR son una causa o consecuencia del proceso apoptótico durante el desarrollo embrionario. Sin embargo en base a los resultados obtenidos en este trabajo, demostramos que el estrés oxidativo, en particular el peróxido de hidrógeno, es una señal necesaria para la activación de la maquinaria de muerte celular en el modelo del CE, y proponemos que esto pudiera ocurrir *in vivo* durante la formación de la cavidad proamniótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Purificación de ARN total.

Soluciones:

- Solución D:	p/ 50 ml:
Tiocianato de guanidina 4M	23.632 gr
Citrato de sodio 25mM pH 7	1.25 ml de 1M
Sarcosil 0.5%	2.5 ml de 10%
Agua-DPC	28 ml
β-mercaptoetanol	7.2μl por ml de sol D (añadir al momento)

- Etanol 95%
- Acetato de Sodio 2M, pH 4
- Fenol saturado con agua
- Cloroformo : alcohol isoamilico 24:1
- Isopropanol
- Etanol 75 %

Metodología.

- 1) Disectar el tejido e inmediatamente colocarlo en hielo seco.
- 2) Pulverizar en mortero con ayuda de nitrógeno líquido.
- 3) Adicionar 0.1 ml de acetato de sodio 2M pH 4 y mezclar bien por inversión. Añadir 1 ml de fenol saturado con agua, mezclar nuevamente y agregar 0.2 ml de cloroformo: alcohol-isoamilico (49:1). Incubar 15 min. en hielo.
- 4) Centrifugar empleando el rotor JA20 a 10, 000 x g a 4°C. Tomar la fase superior y colocarla en un tubo de polipropileno nuevo.
- 5) Precipitar el ARN en tubos eppendorf adicionando 1 ml (1 vol.) de isopropanol. Incubar 30 min. a -20°C. Centrifugar 10 min. a 10,000 x g a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 6) Lavar con etanol al 75% y secarlo exactamente 5 min. al vacío.
- 7) Disolver el ARN en 0.3 ml de solución D y precipitar con 0.3 ml de isopropanol por 30 min. a -20°C. Centrifugar 10 min. a 10,000 x g a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 8) Lavar el ARN en etanol al 75%, dejarlo 10-15 min. a TA
- 9) Centrifugar 5 min. a 10,000 x g a 4°C. Descartar el sobrenadante y secar el pellet como en el paso anterior.
- 10) Resuspender el pellet en 40 µl de H₂O-DPC por cada 100mg de tejido inicial. Incubar el ARN de 10 min. a 56°C. Mantener a -70°C.
- 11) Cuantificar el ARN por diluir 1 µl en 1 ml de H₂O (pH 7) y leer a 260 nm.
- 12) Visualizar el ARN en un gel con formaldehído:
 - 0.3 g de agarosa, 3 ml de MOPS 10X, 26 ml de H₂O, fundir y añadir 1.5 ml de formaldehído al 37%. Buffer de corrida: MOPS 1X.

2.- Reacción para hacer ADNc.

Mezcla para ADNc por reacción en 30µl totales:

- H₂O bidestilada estéril (DEPC)
- Buffer transcriptasa reversa
- DTT (10 µM)
- dNTPs (240 µM final)
- Oligo dT (0.5 µg final)
- Transcriptasa reversa (200 U)
- ARN (1 µg) Antes de adicionarlo, calentar a 65°C por 5 min. y después en hielo 5 min.
- Incubar la reacción 2 hrs. a 37°C.

3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Mezcla para hacer PCR por reacción en 50µl totales:

- 3 µl de ADNc
- 5 µl de buffer PCR 10X
- dNTPs (160 µM final)
- Oligonucleótidos (adicionar 20 pmol, aproximadamente 200 ng).
- Taq Polimerasa (5 U)

Las PCRs en este estudio fueron realizadas con los siguientes oligonucleótidos

Catalasa

Oligo 5': TACCTGTGAACTGTCCCTACCG

Oligo 3': GAATTGCGTTCTTAGGCTTCTC

Con un alineamiento de 57°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 minutos de separación, alineamiento y polimerización respectivamente. Producto de 411 pb.

HPRT

Oligo 5': CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG

Oligo 3': GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC

Con un alineamiento de 57°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min. Producto de 352 pb.

SOD1

Oligo 5': AGTATGGGGACAAATACACAAGG

Oligo 3': CAGTCAAAGCGTCACACAGTTAC

Con un alineamiento de 56°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min.

SOD2

Oligo 5': TCAACGCCACCGAGGAGA

Oligo 3': CCCCAGCAGCGGAATAAG

Con un alineamiento de 59°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min.

SOD3

Oligo 5': TGAGGCCTATTTTCAGTCTG

Oligo 3': CATAGAGAGGTGTCTGGCG

Con un alineamiento de 58°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min.

BMP2

Oligo 5': AGACGTCCTCAGCGAATTTG

Oligo 3': GTTTGTGTTTGGCTTGACGC

Con un alineamiento 50°C de y con tiempos de 0.5, 1.5 y 1 min. Producto de 719 pb.

FGF5

Oligo 5': AGGGGATTGTAGGAATACGAG

Oligo 3': CAGTGACGGTGAAGGAAAG

Con un alineamiento de 55°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min. Producto de 315 pb.

4.- Gel de actividad para la catalasa.

Los extractos proteicos se obtuvieron por sonicación de una suspensión celular en buffer de ruptura celular.

Buffer de ruptura:

- HEPES (final 200mM)
 - DTT (final 1mM)
 - Desferal (final 0.1mM)
 - En H₂O
 - PMSF final 1mM (adicionar justo antes de usar)
- (Por cada 1x10⁶ células adicionar 20 µl de buffer de ruptura)

- Una vez sonicadas, centrifugar a 14,000 rpm 10 min. a 4°C para después recuperar el sobrenadante.

- La concentración proteica se midió a través del método de Bradford, realizando previamente una curva estándar con albúmina bovina para la calibración.

Curva Bradford

ALBUMINA (1mg/ml)	H ₂ O	Colorante Bradford
0 µl	800 µl	200 µl
4 µl	796 µl	200 µl
8 µl	792 µl	200 µl
16 µl	784 µl	200 µl
32 µl	768 µl	200 µl
Muestra 10 µl	790 µl	200 µl

Gel nativo al 8%

	<i>Resolving gel</i>	<i>Stacking gel</i>
H ₂ O	4.94 ml	2.2 ml
Tris 2M pH= 8.9	1.86 ml	567 µl
Acrilamida al 40%	2.28 ml	567 µl
Persulfato de amonio 10%	21.6 µl	17 µl
TEMED	<u>14.4 µl</u>	<u>7 µl</u>
TOTAL	9.11 ml	3.35 ml

Buffer de corrida: 3 gr. Tris Base
14.4 gr Glicina
Para un litro sin ajustar el pH

Colorante 5X para 10 ml:
1 ml de glicerol
500 µl tris 2M pH= 9.8
2 mg de azul de bromofenol

- 1) Se cargaron 150 µg de proteína por carril.
- 2) Correr el gel a 150 V (~50 mA) por aproximadamente 2 hrs.
- 3) Incubar el gel en metanol al 5% por 3 min. Lavar con agua de la llave.
- 4) Incubar el gel en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.03%. en agitación por 5 min.
- 5) Pesar 1 gr de Cloruro férrico (FeCl₂-6H₂O), 1 gr de Ferrocianuro de potasio y disolver cada uno en 25 ml de H₂O por separado.
- 6) Retirar la solución de peróxido de hidrógeno y adicionar las soluciones anteriores al gel al mismo tiempo.
- 7) Incubar hasta revelar.

5.- Hibridación *in situ*.

A) Preparación de sonda de ARN de cadena sencilla.

Mezcla de reacción:

- Buffer de transcripción	4 µl
- Plásmido linearizado	1 µg
- NTPs-Digoxigenina	2 µl
- DTT 0.1M	2 µl
- Inhibidor de RNAsa	40 U
- ARN polimerasa	<u>20 U</u>

Total 20 µl

- 1) Incubar a 37°C por 2 hrs.

- 2) Añadir 100 µl de H₂O-DPC y precipitar adicionando 10 µl de LiCl 4M más 300 µl de etanol absoluto, incubando 30 min. a -20°C.
- 3) Centrifugar por 10 min. a 14,000 rpm a 4°C.
- 4) Lavar el pellet con etanol al 70%.
- 5) Disolver el pellet en 100µl (a 0.1µg/µl).
- 6) Correr un minigel con 5 µl de transcrito (La banda de ARN debe ser de 5 a 10 veces mas intensa que el ADN).
- 7) Almacenar la sonda a -20°C.

B) Preparación de embriones.

PBT: PBS con 0.1% Tween-20 (solución estéril).

- 1) Sacrificar al ratón por dislocación cervical y disectar los embriones.
- 2) Inmediatamente colocar los embriones en PFA.
- 3) Fijar de 4 hrs. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- 4) Lavar y deshidratar los embriones como sigue:

PBT	5 min.	4°C
PBT	5 min.	4°C
metanol/PBT 25%	5 min.	TA
metanol/PBT 50%	5 min.	TA
metanol/PBT 75%	5 min.	TA
metanol 100%	5 min.	TA
metanol 100%	mantener a -20°C	

C) Protocolo de hibridación *in situ*.

- Llevar a cabo todos los pasos en tubos eppendorf cónicos de 2 ml con baja agitación.
- Por tubo usar 1 ml de solución.

- 1) Rehidratar como sigue:

metanol/PBT 75%	5 min.	TA
metanol/PBT 50%	5 min.	TA
metanol/PBT 25%	5 min.	TA
PBT	5 min.	TA
PBT	5 min.	TA

- 2) Blanquear los embriones con:

6% de H ₂ O ₂ en PBT	1 hr.
PBT	5 min.
PBT	5 min.
PBT	5 min.

- 3) Permeabilizar utilizando:

Proteinasa K (10 mg /ml)	2-15 min. (para embriones de 7-9 dpc)
Glicina (2mg/ml)	5 min.
PBT	5 min. TA
PBT	5 min. TA

- 4) Prehibridar 1 hr. a 70°C con:

50% formamida
5X SSC

ARN de levadura (50 µg/ml)

1% SDS

Heparina (50µg/ml)

5) Hibridar con solución de prehibridación más 10µl del ARN marcado toda la noche a 70°C.

6) En los lavados posteriores se emplean estas 4 soluciones:

Solución 1: 50% formamida
SSC 5x pH 4.5
SDS1%

Solución 2: NaCl 0.5M
Tris-HCl pH 7.5 10mM
Tween-20 0.1%

Solución 3: Formamida 50%
SSC 2x pH= 4.5

TBST 10x: Para 100 ml:
8 gr NaCl
0.2 gr KCl
25 ml de Tris-HCl 1M pH= 7.5
10 ml Tween-20
Autoclavear y diluir a 1x, adicionar levamisol (0.48mg/ml) el día de uso.

Emplear el siguiente esquema de lavado:

Solución 1	30 min.	70°C
Solución 1/Solución 2 (1:1)	10 min.	70°C
Solución 2	5 min.	TA
Solución 2	5 min.	TA
Solución 2	5 min.	TA
Solución 3	30 min.	TA
Solución 3	30 min.	TA
TBST	5 min.	TA
TBST	5 min.	TA
TBST	5 min.	TA

7) Prebloquear los embriones incubándolos con 10% suero en TBST de 2-3 hrs.

8) Preabsorber el anticuerpo con polvo de embrión. Polvo de embrión: 3 mg de polvo de embrión en 0.5ml de TBST, 30min. a 70°C con agitación, colocar en hielo por 5 min. Adicionar 5 µl de suero de oveja mas 1µl de anticuerpo anti-DIG, agitar suavemente por 1hr a 4°C, remover el sobrenadante a un tubo fresco y diluirlo a 2 ml con TBST/suero 1%.

9) Remover el TBST/suero 10% de los embriones, remplazar con el anticuerpo preabsorbido e incubarlo toda la noche a 4°C.

10) Al día siguiente lavar con:

TBST	5 min
TBST	5 min
TBST	5 min
TBST	1 hr
TBST	1 hr
TBST	1 hr
TBST	toda la noche

11) Continuar lavando con NTMT

NTMT: 100mM NaCl

100mM Tris-Hcl pH9.5

50mM MgCl₂

0.1% Tween-20

2mM levamisol

(Hacer la solución al día de uso a partir de los stocks)

NTMT 10 min.

NTMT 10 min.

NTMT 10 min.

12) Transferir los embriones a cajas de 6 pozos.

13) Incubar en NTMT mas 3.5µl NBT/ml y 3.5µl BCIP/ml, en agitación leve por 20 min. protegiendo de la luz.

14) Dejar de 1hr a toda la noche en la oscuridad hasta que se observe la señal (usualmente de 4-6 hr.)

15) Lavar con: PBT 15 min.

PBT 15 min.

PBT/glicerol 50% 15 min.

16) Mantener en PBT/glicerol 80% a 4°C.

6.- Cultivo celular

Soluciones:

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCOBRL, cat. 12100-038):

Disolver el contenido del sobre en 900 ml de agua bidestilada estéril o MilliQ. Adicionar 3.7 gr de bicarbonato de sodio, disolver y ajustar el pH a 6.9 con ácido clorhídrico 1N. Aforar a un litro con agua y esterilizar por filtración a través de una membrana de acetatos con poro de 0.22µm.

Gelatina 0.1% (Gelatin from porcine skin, type A, SIGMA, cat. G1890):

Disolver 3 gr de gelatina en 300 ml de agua bidestilada estéril calentando en el horno de microondas para mas tarde esterilizar en autoclave. Este es una solución stock al 1% del cual solo se diluirá al 0.1% con agua bidestilada estéril antes de usar.

PBS (Phosphate Buffer Saline):

8 gr de NaCl

0.2 gr de KCl

1.44 gr de NaHPO₄

0.2 gr de KH₂PO₄

Disolver en 900 ml de agua bidestilada estéril, aforar a 1 litro y filtrar a través de 0.22µm.

Mitomicina C (Mitomycin C, ROCHE, cat. 10 107 409 001):

Disolver el contenido del vial (2 mg) en 4 ml de PBS.

GPS 100X (Glutamax GIBCO, cat. 35050-061; Penicillin G, SIGMA, cat. P-4687; Streptomycin sulfate, SIGMA, Cat. S-1277): Descongelar el bote de Glutamax, tomar 10 ml, adicionar 300 mg de Penicilina y 500 mg de Streptomina, disolver, filtrar a través de 0.22µm. Esta solución se devuelve al frasco de Glutamax. Dispensar en tubos de 15 ml.

Tripsina 2.5% (Trypsin, GIBCO, cat. 15090-046): Diluir con Verseno (GIBCO, cat. 15040): Emplear una dilución de tripsina al 10% con verseno (0.25 %).

βME 1000X (β-mercaptoethanol, GIBCO, cat. 21985-023): Diluir a 100X con PBS

G418 100X, (Geneticin, GIBCO, cat. 11811-023): 18 mg de componente activo por ml en PBS, esterilizar a través de 0.22μm, alicuotar y mantener a 4°C.

1000X FIAU (1-[2-deoxy, 2-fluoro-β-D-arabinofuranosil]-5-ioduracil): se prepara el stock a una concentración final de 200μM. Preparar una solución intermedia (100 mM) adicionando 338 mg de FIAU a 8 ml de PBS. Para obtener la solución de FIAU completamente disuelta, adicionar unas gotas de NaOH 5N. Una vez disuelta, aforar a 10 ml con PBS. Dividir en alicuotas y mantener a -20°C. Preparar el stock 1000X por adicionar 100 μl de 100 mM FIAU a 50 ml de PBS. Si el FIAU aun precipita, adicionar NaOH 5N hasta disolver. Después de mezclar, esterilizar por filtración a través de 0.22μm, alicuotar y mantener a -20°C.

Medio STO/ Feeder:

7% Suero Bovino Fetal (SBF; GIBCO)
1X GPS
El resto es de DMEM.

Medio M15: 15% SBF
1X GPS 1X aminoácidos no esenciales (GIBCO, Cat. 11140-50).
1X Piruvato de Sodio (GIBCO, Cat. 11360-070).
El resto es de DMEM

Medio de congelación:

60% DMEM
20% de SBF
20% DMSO (Dimethyl sulphoxide, SIGMA, cat. D2650)

Protocolos:

Cubrir cajas con gelatina.

- 1) Cubrir la superficie de un numero apropiado de cajas con gelatina al 0.1%.
- 2) Colocarlas en la campana de flujo laminar por dos hrs., aspirar la gelatina antes de utilizar las cajas o mantenerlas secas para su posterior uso.

Descongelar células.

- 1) Remover el vial de células congeladas del contenedor y colocarlo en un baño a 37°C
- 2) Transferir la suspensión celular a un tubo de 15 ml estéril, adicionar 5 ml de medio lentamente y agitando.
- 3) Colectar las células centrifugando a 1000 rpm por 5 min., aspirar el sobrenadante y resuspender en 5 a 10 ml.

Expansión de células STO

- 1) Crecer las células STO en un plato de 10 cm. previamente gelatinificado. Usar 10 ml de medio STO, incubar a 37°C, 5% de CO₂.
- 2) Cuando hayan llegado a confluencia descartar el sobrenadante, enjuagar dos veces con PBS. Aspirar el PBS y adicionar 1.5 ml de tripsina, incubando a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 3) Adicionar 1 ml de medio STO para inactivar la tripsina, pipetear arriba y abajo varias veces para tener una suspensión de células bien separadas unas de otras.
- 4) Centrifugar a 1000 rpm en una centrifuga de mesa.
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de medio STO.

- 6) Contar las células en cámara de Newbauer con 10µl de suspensión celular y 10µl de azul tripan (GIBCO, cat. 15250-061). El número de células por cada cuadrante equivale a 0.1 µl de la suspensión por lo que hay que multiplicar por 20, 000 para tener el número de las células por ml.
- 7) Subcultivar un décimo de la cantidad total (aproximadamente $1-1.5 \times 10^6$ células) en una caja de 10 cm.

Preparación de células alimentadoras.

- 1) Partiendo de un subcultivo adicionar de 10 a 12 millones de células en un plato de 10 cm. previamente gelatinificado y con 10 ml de medio STO.
- 2) Al día siguiente, añadir 200 µl de Mitomicina por caja de 10 cm. Dejar que actúe la droga por dos hrs.
- 3) Subcultivar y sembrar en platos gelatinificados a una densidad de 76,000 células/cm², o 1.5×10^6 células por caja de 6 cm.

Cultivo de células ES.

Subcultivo

- 1) Cuando el cultivo este a confluencia, cambiar el medio.
- 2) 4 hrs. después, lavar dos veces con PBS, adicionar tripsina (1.5 ml para caja de 6 cm. o 2 para caja de 10cm) e incubar 10 a 12 min. a 37°C.
- 3) Adicionar un volumen igual de tripsina, pipetear varias veces para disgregar las células.
- 4) Pasar la suspensión a un tubo de 15 ml, y centrifugar a 1000 rpm 5 min. Descartar el sobrenadante y resuspender en 10 ml.
- 5) Determinar el número celular y subcultivar ($1.5-2 \times 10^6$ células en caja de 6 cm. o $3-4 \times 10^6$ en caja de 10 cm.) en una caja con células alimentadoras y con medio M15.

Transformación genética por electroporación.

- 1) Linearizar el vector a transformar. Extraerlo con fenol/cloroformo y una vez más con cloroformo. Precipitar con 2.4 vol. de etanol, lavar con etanol al 70% y secar. Resuspender el ADN a 1µg/µl en 0.1X TE estéril.
- 2) Reemplazar el medio de cultivo de las células ES 4 hrs. antes.
- 3) Colectar las células por tripsinización, resuspender en 10 ml de PBS y determinar el número celular.
- 4) Colectar nuevamente por centrifugación, aspirar el sobrenadante y resuspender a una densidad de 1.1×10^7 células /ml.
- 5) Colocar 5µg de ADN en la pared interna de una cubeta de electroporación. Adicionar 0.9ml de la suspensión celular y mezclar suavemente (es importante no hacer demasiadas burbujas). Electroporar a 230V, 500µF.
- 6) Transferir el contenido de la cubeta a un tubo de 50 ml estéril. Adicionar 15 ml de M15 lentamente y resuspender uniformemente. Distribuir la suspensión en 5 platos de 10 cm. con células alimentadoras y colocarlas en la incubadora.
- 7) Al día siguiente cambiar el medio para descartar los restos celulares. Para la selección utilizando neomicina, comenzar a adicionar el antibiótico 24 hrs. después de la electroporación y continuar hasta que las colonias puedan levantarse. Para la selección negativa con el casete HSV-TK utilizar FIAU comenzando a la par con la selección positiva.
- 8) Cambiar el medio con la apropiada selección cada vez que el medio este amarillo o haya demasiados restos celulares, al inicio diariamente.
- 9) Las colonias resistentes pueden ser levantadas a los 10-12 días después de la electroporación.

Selección de colonias.

- 1) Reemplazar el medio 4 hrs. antes, mientras tanto adicionar 25µl de tripsina por pozo a cajas de 96 pozos con fondo de U.

Estos plásmidos se emplearon para aislar los brazos de homología (marcados en negro) así como para la obtención de sondas (regiones punteadas) para la identificación de colonias de células ES recombinantes.

Primeramente se subclonó el casete de TK (*timidina cinasa*; casete *MCITKpA*: Hasty, P, et al 1991. *Nature*(30): 243-246), partiendo del vector *pUN1vec* (Ramiro Ramírez Solís) en el vector *pKS-Bluescript* usando los sitios BamHI-XbaI. A este nuevo vector se le denominó de recombinación. Mas tarde se aisló el brazo de homología 3' del vector pCat3 (BglII-BamHI), y se subclonó en el vector de recombinación en el sitio de corte de BamHI. Se procedió a remover el sitio EcoRV del vector *PGKNeoloxPA* (Yuji Mishina), usando adaptadores ClaI-EcoRI, para permitir ver una diferencia en tamaños en el análisis de *Southern-blot* de las colonias de células ES resistentes a neomicina, Este casete de neomicina sin EcoRV fue cortado con XhoI y subclonado en el vector de recombinación en el sitio SalI. Finalmente se adicioneo el brazo 5', cortado con EcoRV, al vector de recombinación que fue cortado con XhoI y los extremos rellenados con la enzima Klenow. Para la transformación, el vector se linearizó con la enzima NotI.

Vectores de sobreexpresión

Para la construcción de los vectores de sobre-expresión (pCAT^P y pCat^C) se utilizo el promotor híbrido de citomegalovirus/actina (vector *pCCALL*) dirigiendo la expresión del ADNc de la catalasa de humano (vector *pCAT10*; American type culture collection), y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (*PGKNeobpA*). La forma citosólica de la catalasa se generó eliminando la señal de importe al peroxisoma (KANL), localizada en la región 3' terminal. Brevemente, se generó un producto de PCR de 465pb empleando como cebadores: 5'TACCTGTGAACTGTCCCTACCG3', 5'CACAGATCTGCCACTCCATGGCCG3', y de templado el vector *pCAT10*. El primer 3' contiene la secuencia que cambia el aminoácido lisina por el codón de término ámbar (AAG a UAG) y un sitio NcoI para facilitar la identificación del plásmido. Finalmente, el producto de PCR fue digerido con SspI-BglII y reemplazó la secuencia 3' de la catalasa en el vector pCAT^P. A ambas construcciones se les adicionó el casete de resistencia a Neomicina (*PGKNeoloxpB*, Yuji Mishina) para permitir la selección en las células ES.

DISCUSION Y PERSPECTIVAS.

1.- El patrón de expresión de catalasa.

Los resultados de este trabajo arrojan la noción de que la catalasa se expresa abundantemente durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, considerando los resultados que se obtuvieron y aquellos ya publicados, queda por analizar el período que

abarca desde la etapa de blastocisto hasta el séptimo día de desarrollo. Dado que el patrón de expresión fue determinado utilizando la presencia del transcrito de la catalasa, queda por establecer si realmente este es indicativo de la presencia de la proteína, ya que la observación que se realizó fue solo a través de geles de actividad. Una alternativa para esclarecer de manera definitiva el patrón de expresión de esta enzima antioxidante puede ser por medio de generar ratones “*knock-in*”, donde se introduciría por “*gene targeting*” un gen reportero en fase como el de la proteína verde fluorescente bajo el promotor endógeno de la catalasa. Si esta GFP tuviera una señal consenso a peroxisoma este ratón podría emplearse para realizar estudios ya sea de biogénesis de peroxisomas o aquellos que involucran a los llamados proliferadores de peroxisomas que generan cáncer hepático en ratón (Tharappel 2003).

2.- La pérdida de catalasa.

La finalidad de los estudios de expresión fue constatar la presencia de enzimas antioxidantes para sustentar la idea que pudieran estar delimitando el estrés oxidativo y consecuentemente la muerte celular programada. Los resultados de este trabajo junto con los de las Dras. Denhi Schnabel y Maria del Rayo Sánchez constatan la presencia tanto de superóxido dismutasas, peroxidasas y catalasa durante el desarrollo embrionario. En el modelo de la extremidad todas las enzimas antioxidantes se excluyen de la zona donde se presenta el estrés oxidativo y la muerte celular. Por lo que parte de la hipótesis que propone que la ausencia de los sistemas antioxidantes pudiera contribuir a un aumento en el estrés oxidativo es todavía viable. Sin embargo, hacen faltan estudios tanto de pérdida como de ganancia de sistemas antioxidantes para comprobar si son indirectamente causantes del estrés oxidativo. Por lo anterior, es que nos dimos a la tarea de generar el ratón nulo para catalasa. Ho y colaboradores también llevaron a cabo estudios de pérdida de catalasa en ratón (Ho 2004). Sus observaciones son iguales a las nuestras, donde ratones *cas^{-/-}* no presenta fenotipo alguno, pero reportan que existe una disminución en la actividad de transferencia electrónica en la cadena respiratoria mitocondrial sin poder explicar el porqué de este fenómeno.

Es interesante que no haya habido ninguna consecuencia por la eliminación del gen de catalasa, siendo esta una proteína que se expresa abundantemente durante el desarrollo embrionario. La redundancia funcional de los sistemas antioxidantes pudiera ser la causa de la falta de fenotipo, por lo que sería necesario producir la pérdida de

varios de ellos para lograr disminuir de manera significativa la capacidad antioxidante. A pesar de la falta de fenotipo en el ratón *cas^{-/-}*, creemos que es necesario determinar si la concentración de EOR se modificó durante el desarrollo embrionario de estos ratones, particularmente en la extremidad.

En la actualidad, nuestra hipótesis al respecto es que la catalasa junto con otros sistemas contribuye a la capacidad antioxidante durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, a nivel organismal pudiera tener un papel preponderante en un contexto metabólico, debido a su enriquecimiento en microcuerpos del tejido hepático. Varios sistemas enzimáticos que operan en el peroxisoma generan como subproducto H_2O_2 , en particular durante la β -degradación de ácidos grasos de cadena larga. Durante periodos de hambruna o en ejercicio prolongado, la degradación de ácidos grasos es importante para la generación de energía, actuando por igual tanto en la mitocondria como en el peroxisoma. Por lo que la catalasa podría ser importante bajo estas condiciones promoviendo la degradación del H_2O_2 y de esta manera evitar el daño oxidativo a los sistemas multienzimáticos que operan en el peroxisoma. En el laboratorio planeamos realizar estudios comparativos entre ratones silvestres y aquellos *cas^{-/-}* bajo diferentes condiciones que promuevan la actividad metabólica peroxisomal, como son el ejercicio y la administración de proliferadores de peroxisomas. Estos últimos son drogas de tipo fibratos (ácidos carboxílicos anfipáticos), que al unirse a los llamados receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) inducen la transcripción de genes que codifican para proteínas peroxisomales. Estos PPARs han sido relacionados a diferentes procesos como diferenciación, metabolismo, inflamación, cicatrización y conversión neoplásica (Yu 2007).

La importancia de la actividad peroxisomal en el metabolismo celular se vuelve obvia al observar los defectos bastante severos en enfermedades peroxisomales. Personas con el síndrome de Zellweger, una enfermedad recesiva autosomal, no poseen peroxisomas y presentan niveles altos de ácidos grasos de cadena larga. Los síntomas incluyen: retardación psicomotora, disfunción hepática, hipotonía y/o pérdida de la visión. Este síndrome es letal a edades tempranas. Una vía metabólica faltante en estos individuos es la producción de plasmalógenos (glicerofosfolípidos en los que una de las dos cadenas acil está unida al glicerol por un enlace éter alquénil y enriquecidos en órganos como el corazón, sistema nervioso, riñón y gónadas), siendo presumiblemente la causa de los desordenes neurológicos presentados por estos individuos. En un grupo

de complementación de este síndrome, la catalasa se localiza en el citosol al parecer debido a un problema en el sistema de importe al peroxisoma. El posible aumento de H_2O_2 , debido a la falta de catalasa, provoca daño oxidativo de los componentes multienzimáticos peroxisomales, ya que el reintroducir esta enzima a fibroblastos de estos pacientes, restablece el metabolismo normal en estos microcuerpos (Kawada 2004). Así, los síntomas de Zellweger pudieran ser presentados en ratones *cas*^{-/-}, aunque de manera superficial no son evidentes. Por lo que se vuelve interesante y necesario llevar a cabo experimentos donde se analice en metabolismo peroxisomal en ratones *cas*^{-/-}, para comprobar si la falta en catalasa verdaderamente recapitula lo observado en la enfermedad de Zellweger.

De los estudios de pérdida de función de los sistemas antioxidantes resaltan el de *Gpx4*, *γGcs*, *Trx1*, *Trx2*, *TrxR1* y *TrxR2*, cuya mutación es letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Covarrubias 2008), evidenciando la importancia de mantener los niveles de EOR en concentraciones bajas para una adecuada homeostasis. Sin embargo, queda aún por analizar el efecto de estas mutaciones sobre la generación de estrés oxidativo y muerte celular durante el desarrollo embrionario (ver anexo 3).

3.- Ganancia de la catalasa en ratón.

La unidad de transgénesis de la Universidad de Georgia, encargada de microinyectar la construcción molecular reportó que tras varios intentos solo pudo derivar un ratón transgénico. Debido a la naturaleza constitutiva del promotor empleado, una posibilidad es que la sobre-expresión de catalasa en todos los tejidos pudiera ser letal para el desarrollo embrionario y aquel que sobrevivió lo hizo gracias al carácter restrictivo de la expresión.

Durante un insulto de hipoxia/ reoxigenación, fenómeno que ocurre en algunas afecciones cardíacas, se ha reportado la producción de EOR y muerte celular de células del miocardio. Empleando un promotor específico para dirigir la expresión de catalasa a músculo cardíaco Chen y colaboradores reportaron un aumento de 60 veces más catalasa, observando que esto aminora algunos síntomas que se presentan durante la hipoxia/reoxigenación como son: reducción en la fuerza contráctil y ritmo cardíaco, la arritmia y las alteraciones morfológicas (Chen, Y. 1997).

La estreptozocina es una droga que es empleada para atacar al cáncer metastático de células pancreáticas, induciendo muerte celular al parecer por inhibición

de la síntesis de ADN. También ha sido empleada para promover un fenotipo diabético en el ratón. Empleando el promotor de insulina para dirigir la expresión de catalasa a las células β -pancreáticas (lugar donde los niveles endógenos de catalasa son muy bajos), Xu y colaboradores pudieron obtener un aumento de 50 veces de los niveles normales y es en este modelo donde la catalasa evita el efecto diabetesogénico de la estreptozocina (Xu 1999).

Schneider en el año 2005, generó cepas de ratones con niveles elevados de tres isoformas de catalasa (peroxisomal, nuclear y mitocondrial) resultando que solo aquellos con la isoforma mitocondrial presentan una disminución en cardiopatías, en el desarrollo de cataratas y en la producción de H_2O_2 , así como un aumento en la vida media y máxima. El corazón, músculo esquelético y cerebro fueron los tejidos donde se observó sobre-expresión. Cabe destacar que este grupo utilizó el mismo promotor que empleamos nosotros para la sobre-expresión de catalasa citosólica. Este grupo comenta también la naturaleza de mosaïcismo en el patrón de expresión de catalasa en estos ratones indicando que una expresión amplia podría resultar letal para el desarrollo embrionario (Schriner 2005).

Recientemente se publicó un estudio de sobre-expresión empleando 80 Kb de la región genómica que contiene al gen de la catalasa y sus secuencias regulatorias, al parecer sin observar fenotipo alguno (Chen, X. 2003). Con esa estrategia, se obtuvieron niveles elevados de expresión de 2-4 veces comparado con los silvestres en casi todos los tejidos. Sin embargo, en los sitios donde normalmente se pudiera estar apagando esta enzima, como en las zonas interdigitales embrionarias, en estos animales transgénicos también se apagaría sin poder evaluar un efecto sobre la producción de EOR y muerte celular. Por lo anterior, una posibilidad sería el realizar ensayos de microinyección de la construcción de sobre-expresión, disectando y genotipificando embriones en varios estadios a fin de comprobar si ocurre un efecto letal en esta etapa. Otra manera de llevarlo a cabo es generar ratones a partir de líneas de células ES que sobre-expresan catalasa. Inicialmente haciendo quimeras, que de entrada la contribución al tejido nos hablaría de si la sobre-expresión de catalasa tendría algún efecto selectivo.

La sobre-expresión de otros sistemas antioxidantes se ha llevado a cabo pero siempre con expresión restringida a ciertos órganos o tejidos. Estos estudios apoyan la noción que los mecanismos antioxidantes son importantes para evitar el daño oxidativo

sin embargo, no se ha analizado su efecto sobre la producción de EOR durante el desarrollo embrionario.

4.- Sobre-expresión de la catalasa en las células ES.

A pesar de observar un incremento importante en la actividad de catalasa en las células ES, creemos que hace falta corroborar estos resultados con estudios de *Western-blot* para establecer de manera mas fina el aumento en la proteína. Es interesante que a pesar de presentar aparentemente la misma actividad y el mismo patrón de expresión de catalasa entre las isoformas peroxisomal y citosólica (Fig. 12), exista una respuesta diferencial al H_2O_2 y en el efecto en la cavitación del CE. Por lo que se pudieran llevar a cabo estudios de fraccionamiento bioquímico analizando la actividad de catalasa tanto en microcuerpos como en el citosol, para así establecer si es que la localización es responsable de esta discrepancia.

De los agentes o condiciones empleadas para promover muerte celular en células ES, solo del H_2O_2 se protegen las células que sobre-expresan catalasa. Al ser el peróxido de hidrógeno el substrato natural de la catalasa es de esperar tal protección. Lo anterior indica que la falta de suero y de β -ME, así como menadiona o staurosporina son capaces de activar la maquinaria de muerte celular independiente de la generación de EOR, o dicho de otra manera, la presencia de EOR no es necesaria para generar muerte celular bajo las condiciones antes mencionadas. El caso de menadiona es interesante puesto que se ha postulado que su principal mecanismo para promover muerte celular es a través de la generación de EOR. En este trabajo demostramos que efectivamente si aumentan los niveles de EOR pero que estos no son necesarios para que se lleve a cabo la muerte celular. Puesto que nosotros determinamos la muerte celular a las 24 hrs. de iniciado el tratamiento, una posibilidad es que las EOR sí participan en el proceso de muerte celular pero que no son indispensables, por lo que al medir la muerte celular a tales tiempos ya las células murieron por mecanismos independientes a la producción EOR. Para probar esta hipótesis, se podrían realizar los mismos ensayos cuantificando la muerte celular a tiempos más cortos.

En el mismo sentido de lo previamente reportado por la Dra. Susana Castro, encontramos que la sobre-expresión de catalasa no es capaz de subsanar la falta de β -ME en células ES. El β -ME es un agente capaz de reducir puentes disulfuro, mecanismo por el cual estaría ejerciendo su actividad protectora en las células ES. Una posibilidad

es que el β -ME pudiera estar reduciendo de manera específica a ciertas proteínas afectando su función y por ende promover sobrevivencia. La adición de sistemas antioxidantes no necesariamente afectaría la reducción de estas moléculas blanco por lo que ambos sistemas no funcionarían al mismo nivel, explicando así el efecto no protector de sobre-expresar catalasa. Puesto que el β -ME es un factor indispensable en el cultivo de las células ES, se vuelve interesante el estudiar el mecanismo por el cual es capaz de promover sobrevivencia. Para poder identificar tales proteínas, se podrían realizar estudios de proteómica donde ya sea en presencia o ausencia de β -ME, se observe el perfil proteico en geles bidimensionales, señalando así las proteínas sensibles a la falta de β -ME. Una vez identificadas se llevarían a cabo una serie de experimentos para comprobar si estas son responsables de la sobrevivencia de las células ES.

Por otra parte, zVAD no es capaz de promover sobrevivencia de células ES expuestas al peróxido de hidrógeno, menadiona o staurosporina inclusive bajo la sobre-expresión de catalasa, señalando que estos agentes generan muerte celular por una vía independiente de caspasas. Sin embargo creemos que es importante repetir estos resultados con otros inhibidores de caspasas más estables como es el caso del qVD. Cabe destacar que bajo el efecto del peróxido de hidrógeno, *Aif* se transloca de la mitocondria al núcleo en células ES, sugiriendo que esta podría ser la vía alterna al de las caspasas para promover muerte celular. Sería interesante probar esta hipótesis al exponer células ES *Aif*^{+/y} a estos agentes y bajo la presencia del inhibidor de caspasas, observando su efecto en la muerte celular.

5.- Sobre-expresión de la catalasa en el cuerpo embriode.

En el modelo del CE, ocurre tanto el proceso de diferenciación como muerte celular. Se ha propuesto que la muerte celular de las células centrales del CE es dependiente de una correcta diferenciación, inicialmente hacia endodermo y la generación de la lámina basal, y posteriormente hacia el ectodermo con la formación del epitelio columnar. En este sentido, la ausencia de varias proteínas durante la formación del CE, tales como *integrina β 1* (Aumailley 2000), *FGF* (Chen 2000), y *BMPs* (Coucouvani 1999) generan un efecto de no cavitación en el CE, fenómeno que responde mas a un efecto sobre diferenciación que en muerte celular.

El desarrollo del CE es un sistema que nos permitió evaluar la participación de las EOR en el proceso de muerte celular. Así, encontramos que la sobre-expresión de

catalasa en el CE (CE-Cat⁺) es capaz de prevenir la cavitación sin afectar el proceso de diferenciación.

Fue importante encontrar producción de EOR en el CE y que este aumento está relacionado a la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, es posible que este aumento en EOR también pudiera estar obedeciendo a una disminución de los sistemas antioxidantes en las células centrales del CE. Durante el rescate del fenotipo de no cavitación en los CE-Cat⁺ por H₂O₂, observamos que las células centrales del CE son las que se ven más afectadas, sugiriendo que estas pudieran estar bajo una condición, que las sensibiliza a la muerte celular. La disminución de los sistemas antioxidantes podría ser tal condición, por lo que se vuelve interesante analizar la presencia o ausencia de las principales enzimas antioxidantes durante el proceso de cavitación del CE.

Siguiendo con la idea de sobre-expresar enzimas antioxidantes en el CE, demostramos que la expresión de *SOD1* no afecta la cavitación, aunque es importante considerar que los niveles de actividad pudieran no ser suficientes. Por otra parte, en una condición donde aumente *SOD1* pero que estén disminuidas las actividades removedoras de H₂O₂, los niveles de este último aumentarían promoviendo así la muerte celular, por lo que se vuelve necesario e interesante detectar la presencia de estrés oxidativo en los CE-*SOD1*⁺.

Para poder validar los resultados *in vitro*, fue que en algunas ocasiones intentamos detectar EOR en embriones que expresan la proteína verde-fluorescente, de 4 dpc, etapa donde se forma la cavidad proamniótica. Este objetivo no fue posible realizarlo debido a la inaccesibilidad del embrión, la poca tasa de difusión del DHE, la baja proporción de células que mueren y la rapidez con que se lleva a cabo este proceso. En este punto valdría la pena volver a intentar estos mismos experimentos ya con más experiencia.

Al fusionar los blastómeros de un embrión de dos células por electrofusión, se genera un embrión que posee el material genético duplicado (4n), y que puede ser cultivado hasta la etapa de blastocisto. Al introducir células ES a blastocistos tetraploides se generan embriones quiméricos, donde las células tetraploides solo son capaces de generar tejido extra-embriionario, permitiendo que el embrión se derive en su totalidad, de las células ES introducidas (Mísra 2001). Por lo que una manera de evaluar

si el fenómeno de no cavitación en el CE por catalasa se recapitula *in vivo*, es produciendo embriones tetraploides utilizando células ES-Cat⁺.

En este trabajo demostramos que en la muerte celular que ocurre durante el desarrollo del CE se activan dos vías: la independiente de caspasas representada por la translocación de *Aif* al núcleo, y aquella dependiente de caspasas, siendo esta última suficiente y necesaria para que ocurra la muerte celular y la cavitación del CE (Fig. 23).

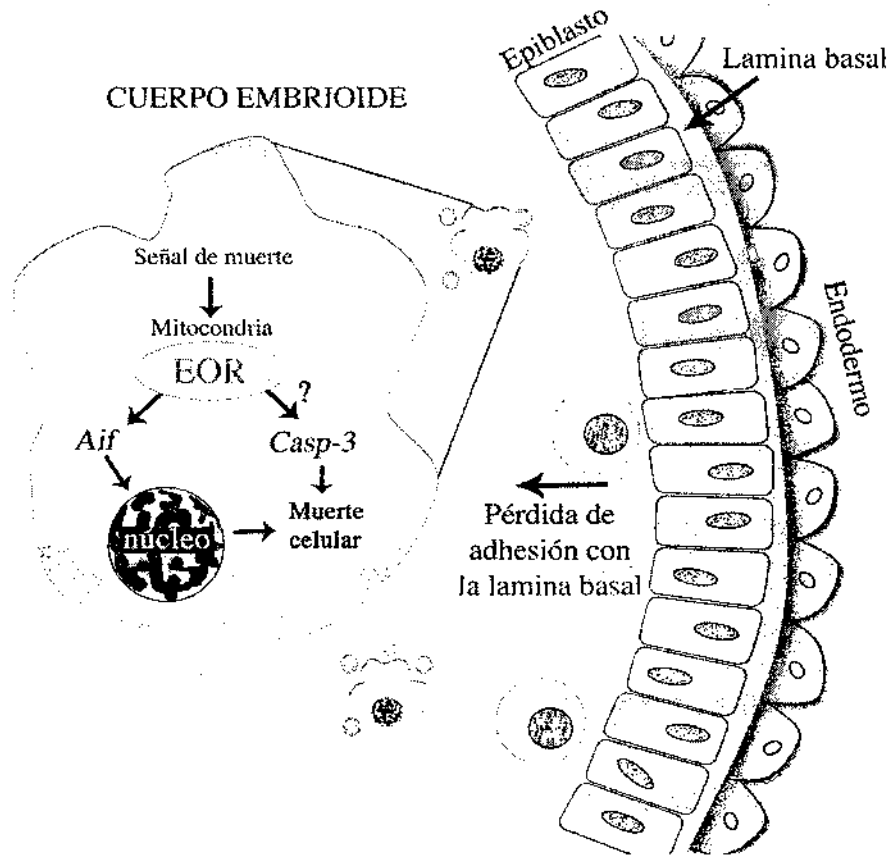


Figura 23.- Modelo de la muerte celular en el cuerpo embriónico.

Una pregunta que queda por resolver es ¿cual es el mecanismo molecular por el cual el peróxido de hidrógeno es capaz de activar la maquinaria de muerte? Una posibilidad es que la producción de EOR pudiera tener como efecto inmediato la peroxidación de lípidos en las membranas mitocondriales, llevando a la pérdida de potencial y a su permeabilización, permitiendo que factores pro-apoptóticos como citocromo c y *Aif* se liberen con sus subsecuentes consecuencias.

Y por otra parte, ¿A través de qué mecanismo se activa el programa que conduce a la generación de estrés oxidativo y a la muerte celular de las células centrales del CE? Se ha propuesto la pérdida de adhesión con la lámina basal como una señal que activa a

la muerte celular, aunque también podría ser la falta de factores tróficos que promuevan la sobrevivencia de las células centrales al no diferenciar a células del epiblasto. El factor de respuesta a suero (*SRF*) es un factor transcripcional que tras unirse al elemento de respuesta suero (*SER*) en regiones promotoras, permite la transcripción de genes blanco. Este factor ha sido relacionado con procesos como proliferación y diferenciación. Sin embargo, en células ES promueve sobrevivencia a través de inducir la expresión de genes antiapoptóticos como *bcl-2* y *bcl-x_l*. Al expresar ectópicamente *bcl-2* se evita la muerte celular generada por la falta de *SRF* en células ES. Los CE derivados de células ES *SRF*^{-/-} tienen disminuidos los niveles de *bcl-2*, presentan muerte celular de manera no regulada y no cavitan (Schratt 2004). Por lo que no sería sorprendente encontrar señales extracelulares que pudieran estar regulando la expresión o actividad del *SRF* para que tanto la sobrevivencia como la muerte celular ocurran de manera normal en el CE y posiblemente durante la formación de la cavidad proamniótica.

Hasta la fecha no existen evidencias contundentes para establecer si las EOR son una causa o consecuencia del proceso apoptótico durante el desarrollo embrionario. Sin embargo en base a los resultados obtenidos en este trabajo, demostramos que el estrés oxidativo, en particular el peróxido de hidrógeno, es una señal necesaria para la activación de la maquinaria de muerte celular en el modelo del CE, y proponemos que esto pudiera ocurrir *in vivo* durante la formación de la cavidad proamniótica.

CONCLUSIONES.

- 1.- La catalasa, al igual que otras enzimas antioxidantes, se encuentra distribuida ampliamente durante el desarrollo embrionario del ratón.
- 2.- La falta de catalasa no tiene consecuencias para el desarrollo embrionario del ratón.
- 3.- La menadiona es capaz de promover muerte celular en células ES por un mecanismo independiente de la formación de estrés oxidativo y de la activación de caspasas.
- 4.- Las EOR son una señal que activa la muerte celular siendo esenciales para la cavitación del CE.

- 5.- La mitocondria es la fuente principal de EOR durante la cavitación del CE.
- 6.- La muerte celular, durante la cavitación del CE, es dependiente de la actividad de caspasas.
- 7.- El aumento en la concentración en EOR es anterior a la liberación de *Aif* y la activación de caspasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Purificación de ARN total.

Soluciones:

- | | |
|----------------------------|---|
| - Solución D: | p/ 50 ml: |
| Tiocianato de guanidina 4M | 23.632 gr |
| Citrato de sodio 25mM pH 7 | 1.25 ml de 1M |
| Sarcosil 0.5% | 2.5 ml de 10% |
| Agua-DPC | 28 ml |
| β -mercaptoetanol | 7.2 μ l por ml de sol D (añadir al momento) |
- Etanol 95%
 - Acetato de Sodio 2M, pH 4
 - Fenol saturado con agua
 - Cloroformo : alcohol isoamilico 24:1
 - Isopropanol
 - Etanol 75 %

Metodología.

- 1) Disectar el tejido e inmediatamente colocarlo en hielo seco.
- 2) Pulverizar en mortero con ayuda de nitrógeno líquido.
- 3) Adicionar 0.1 ml de acetato de sodio 2M pH 4 y mezclar bien por inversión. Añadir 1 ml de fenol saturado con agua, mezclar nuevamente y agregar 0.2 ml de cloroformo: alcohol-isoamilico (49:1). Incubar 15 min. en hielo.
- 4) Centrifugar empleando el rotor JA20 a 10,000 x g a 4°C. Tomar la fase superior y colocarla en un tubo de polipropileno nuevo.
- 5) Precipitar el ARN en tubos eppendorf adicionando 1 ml (1 vol.) de isopropanol. Incubar 30 min. a -20°C. Centrifugar 10 min. a 10,000 x g a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 6) Lavar con etanol al 75% y secarlo exactamente 5 min. al vacío.
- 7) Disolver el ARN en 0.3 ml de solución D y precipitar con 0.3 ml de isopropanol por 30 min. a -20°C. Centrifugar 10 min. a 10,000 x g a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 8) Lavar el ARN en etanol al 75%, dejarlo 10-15 min. a TA
- 9) Centrifugar 5 min. a 10,000 x g a 4°C. Descartar el sobrenadante y secar el pellet como en el paso anterior.
- 10) Resuspender el pellet en 40 μ l de H₂O-DPC por cada 100mg de tejido inicial. Incubar el ARN de 10 min. a 56°C. Mantener a -70°C.
- 11) Cuantificar el ARN por diluir 1 μ l en 1 ml de H₂O (pH 7) y leer a 260 nm.
- 12) Visualizar el ARN en un gel con formaldehído:

0.3 g de agarosa, 3 ml de MOPS 10X, 26 ml de H₂O, fundir y añadir 1.5 ml de formaldehído al 37%. Buffer de corrida: MOPS 1X.

2.- Reacción para hacer ADNc.

Mezcla para ADNc por reacción en 30 μ l totales:

- H₂O bidestilada estéril (DEPC)
- Buffer transcriptasa reversa
- DTT (10 μ M)
- dNTPs (240 μ M final)
- Oligo dT (0.5 μ g final)
- Transcriptasa reversa (200 U)
- ARN (1 μ g) Antes de adicionarlo, calentar a 65°C por 5 min. y después en hielo 5 min.
- Incubar la reacción 2 hrs. a 37°C.

3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Mezcla para hacer PCR por reacción en 50 μ l totales:

- 3 μ l de ADNc
- 5 μ l de buffer PCR 10X
- dNTPs (160 μ M final)
- Oligonucleótidos (adicionar 20 pmol, aproximadamente 200 ng).
- Taq Polimerasa (5 U)

Las PCRs en este estudio fueron realizadas con los siguientes oligonucleótidos

Catalasa

Oligo 5': TACCTGTGAACTGTCCCTACCG

Oligo 3': GAATGCGTTCTTAGGCTTCTC

Con un alineamiento de 57°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 minutos de separación, alineamiento y polimerización respectivamente. Producto de 411 pb.

HPRT

Oligo 5': CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG

Oligo 3': GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC

Con un alineamiento de 57°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min. Producto de 352 pb.

SOD1

Oligo 5': AGTATGGGGACAAA'TACACAAGG

Oligo 3': CAGTCAAAGCGTCACACAGTTAC

Con un alineamiento de 56°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min.

SOD2

Oligo 5': TCAACGCCACCGAGGAGA

Oligo 3': CCCCAGCAGCGGAATAAG

Con un alineamiento de 59°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min.

SOD3

Oligo 5': TGAGGCCTATTTTCAGTCTG

Oligo 3': CATAGAGAGGTGTCIGGCCG

Con un alineamiento de 58°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min.

BMP2

Oligo 5': AGACGTCCTCAGCGAATTTG

Oligo 3': GTTGTGTTTGGCTTGACGC

Con un alineamiento 50°C de y con tiempos de 0.5, 1.5 y 1 min. Producto de 719 pb.

FGF5

Oligo 5': AGGGGATTGTAGGAATACGAG

Oligo 3': CAGTGACGGTGAAGGAAAG

Con un alineamiento de 55°C y con tiempos de 0.5, 1 y 1 min. Producto de 315 pb.

4.- Gel de actividad para la catalasa.

Los extractos proteicos se obtuvieron por sonicación de una suspensión celular en buffer de ruptura celular.

Buffer de ruptura:

- HEPES (final 200mM)
 - DTT (final 1mM)
 - Desferal (final 0.1mM)
 - En H₂O
 - PMSF final 1mM (adicionar justo antes de usar)
- (Por cada 1x10⁶ células adicionar 20 µl de buffer de ruptura)

- Una vez sonicadas, centrifugar a 14,000 rpm 10 min. a 4°C para después recuperar el sobrenadante.

- La concentración proteica se midió a través del método de Bradford, realizando previamente una curva estándar con albúmina bovina para la calibración.

Curva Bradford

ALBUMINA (1mg/ml)	H ₂ O	Colorante Bradford
0 µl	800 µl	200 µl
4 µl	796 µl	200 µl
8 µl	792 µl	200 µl
16 µl	784 µl	200 µl
32 µl	768 µl	200 µl
Muestra 10 µl	790 µl	200 µl

Gel nativo al 8%

	Resolving gel	Stacking gel
H ₂ O	4.94 ml	2.2 ml
Tris 2M pH= 8.9	1.86 ml	567 µl
Acrilamida al 40%	2.28 ml	567 µl
Persulfato de amonio 10%	21.6 µl	17 µl
TEMED	14.4 µl	7 µl
TOTAL	9.11 ml	3.35 ml

Buffer de corrida: 3 gr. Tris Base
14.4 gr Glicina

Para un litro sin ajustar el pH

Colorante 5X para 10 ml:
1 ml de glicerol
500 μ l tris 2M pH= 9.8
2 mg de azul de bromofenol

- 1) Se cargaron 150 μ g de proteína por carril.
- 2) Correr el gel a 150 V (~50 mA) por aproximadamente 2 hrs.
- 3) Incubar el gel en metanol al 5% por 3 min. Lavar con agua de la llave.
- 4) Incubar el gel en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.03% en agitación por 5 min.
- 5) Pesar 1 gr de Cloruro férrico ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1 gr de Ferrocianuro de potasio y disolver cada uno en 25 ml de H_2O por separado.
- 6) Retirar la solución de peróxido de hidrógeno y adicionar las soluciones anteriores al gel al mismo tiempo.
- 7) Incubar hasta revelar.

5.- Hibridación *in situ*.

A) Preparación de sonda de ARN de cadena sencilla.

Mezcla de reacción:

- Buffer de transcripción	4 μ l
- Plásmido linearizado	1 μ g
- NTPs-Digoxigenina	2 μ l
- DTT 0.1M	2 μ l
- Inhibidor de RNAsa	40 U
- ARN polimerasa	<u>20 U</u>
Total	20 μl

- 1) Incubar a 37°C por 2 hrs.
- 2) Añadir 100 μ l de H_2O -DPC y precipitar adicionando 10 μ l de LiCl 4M más 300 μ l de etanol absoluto, incubando 30 min. a -20°C.
- 3) Centrifugar por 10 min. a 14,000 rpm a 4°C.
- 4) Lavar el pellet con etanol al 70%.
- 5) Disolver el pellet en 100 μ l (a 0.1 μ g/ μ l).
- 6) Correr un minigel con 5 μ l de transcrito (La banda de ARN debe ser de 5 a 10 veces mas intensa que el ADN).
- 7) Almacenar la sonda a -20°C.

B) Preparación de embriones.

PBT: PBS con 0.1% Tween-20 (solución estéril).

- 1) Sacrificar al ratón por dislocación cervical y disectar los embriones.
- 2) Inmediatamente colocar los embriones en PFA.
- 3) Fijar de 4 hrs. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- 4) Lavar y deshidratar los embriones como sigue:

PBT	5 min.	4°C
PBT	5 min.	4°C
metanol/PBT 25%	5 min.	TA
metanol/PBT 50%	5 min.	TA

metanol/PBT 75%	5 min.	TA
metanol 100%	5 min.	TA
metanol 100%	mantener a -20°C	

C) Protocolo de hibridación *in situ*.

- Llevar a cabo todos los pasos en tubos eppendorf cónicos de 2 ml con baja agitación.
- Por tubo usar 1 ml de solución.

1) Rehidratar como sigue:

metanol/PBT 75%	5 min.	TA
metanol/PBT 50%	5 min.	TA
metanol/PBT 25%	5 min.	TA
PBT	5 min.	TA
PBT	5 min.	TA

2) Blanquear los embriones con:

6% de H ₂ O ₂ en PBT	1 hr.
PBT	5 min.
PBT	5 min.
PBT	5 min.

3) Permeabilizar utilizando:

Proteínasa K (10 mg /ml)	2-15 min. (para embriones de 7-9 dpc)
Glicina (2mg/ml)	5 min.
PBT	5 min. TA
PBT	5 min. TA

4) Prehibridar 1 hr. a 70°C con:

50% formamida
 5X SSC
 ARN de levadura (50 µg/ml)
 1% SDS
 Heparina (50µg/ml)

5) Hibridar con solución de prehibridación más 10µl del ARN marcado toda la noche a 70°C.

6) En los lavados posteriores se emplean estas 4 soluciones:

Solución 1: 50% formamida
 SSC 5x pH 4.5
 SDS 1%

Solución 2: NaCl 0.5M
 Tris-HCl pH 7.5 10mM
 Tween-20 0.1%

Solución 3: Formamida 50%
 SSC 2x pH= 4.5

TBST 10x: Para 100 ml:
 8 gr NaCl
 0.2 gr KCl
 25 ml de Tris-HCl 1M pH= 7.5
 10 ml Tween-20

Autoclavear y diluir a 1x, adicionar levamisol (0.48mg/ml) el día de uso.

Emplear el siguiente esquema de lavado:

Solución 1	30 min.	70°C
Solución 1/Solución 2 (1:1)	10 min.	70°C
Solución 2	5 min.	TA
Solución 2	5 min.	TA
Solución 2	5 min.	TA
Solución 3	30 min.	TA
Solución 3	30 min.	TA
TBST	5 min.	TA
TBST	5 min.	TA
TBST	5 min.	TA

7) Prebloquear los embriones incubándolos con 10% suero en TBST de 2-3 hrs.

8) Preabsorber el anticuerpo con polvo de embrión. Polvo de embrión: 3 mg de polvo de embrión en 0.5ml de TBST, 30min. a 70°C con agitación, colocar en hielo por 5 min. Adicionar 5 μ l de suero de oveja mas 1 μ l de anticuerpo anti-DIG, agitar suavemente por 1hr a 4°C, remover el sobrenadante a un tubo fresco y diluirlo a 2 ml con TBST/suero 1%.

9) Remover el TBST/suero 10% de los embriones, remplazar con el anticuerpo preabsorbido e incubarlo toda la noche a 4°C.

10) Al día siguiente lavar con:

TBST	5 min
TBST	5 min
TBST	5 min
TBST	1 hr
TBST	1 hr
TBST	1 hr
TBST	toda la noche

11) Continuar lavando con NTMT

NTMT: 100mM NaCl
100mM Tris-Hcl pH9.5
50mM MgCl₂
0.1%Tween-20
2mM Ievamisol
(Hacer la solución al día de uso a partir de los stocks)

NTMT	10 min.
NTMT	10 min.
NTMT	10 min.

12) Transferir los embriones a cajas de 6 pozos.

13) Incubar en NTMT mas 3.5 μ l NBT/ml y 3.5 μ l BCIP/ml, en agitación leve por 20 min. protegiendo de la luz.

14) Dejar de 1hr a toda la noche en la oscuridad hasta que se observe la señal (usualmente de 4-6 hr.)

15) Lavar con:	PBT	15 min.
	PBT	15 min.
	PBT/glicerol 50%	15 min.

16) Mantener en PBT/gliccrol 80% a 4°C.

6.- Cultivo celular

Soluciones:

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCOBRL, cat. 12100-038):

Disolver el contenido del sobre en 900 ml de agua bidestilada estéril o MilliQ. Adicionar 3.7 gr de bicarbonato de sodio, disolver y ajustar el pH a 6.9 con ácido clorhídrico 1N. Aforar a un litro con agua y esterilizar por filtración a través de una membrana de acetatos con poro de 0.22 μ m.

Gelatina 0.1% (Gelatin from porcine skin, type A, SIGMA, cat. G1890):

Disolver 3 gr de gelatina en 300 ml de agua bidestilada estéril calentando en el horno de microondas para mas tarde esterilizar en autoclave. Este es una solución stock al 1% del cual solo se diluirá al 0.1% con agua bidestilada estéril antes de usar.

PBS (Phosphate Buffer Saline):

- 8 gr de NaCl
- 0.2 gr de KCl
- 1.44 gr de NaHPO₄
- 0.2 gr de KH₂PO₄

Disolver en 900 ml de agua bidestilada estéril, aforar a 1 litro y filtrar a través de 0.22 μ m.

Mitomomicina C (Mitomycin C, ROCHE, cat. 10 107 409 001):

Disolver el contenido del vial (2 mg) en 4 ml de PBS.

GPS 100X (Glutamax GIBCO, cat. 35050-061; Penicillin G, SIGMA, cat. P-4687; Streptomycin sulfate, SIGMA, Cat. S-1277): Descongelar el bote de Glutamax, tomar 10 ml, adicionar 300 mg de Penicilina y 500 mg de Streptomocina, disolver, filtrar a través de 0.22 μ m. Esta solución se devuelve al frasco de Glutamax. Dispensar en tubos de 15 ml.

Tripsina 2.5% (Trypsin, GIBCO, cat. 15090-046): Diluir con Verseno (GIBCO, cat. 15040): Emplear una dilución de tripsina al 10% con verseno (0.25 %).

β ME 1000X (β -mercaptoethanol, GIBCO, cat. 21985-023): Diluir a 100X con PBS

G418 100X, (Geneticin, GIBCO, cat. 11811-023): 18 mg de componente activo por ml en PBS. esterilizar a través de 0.22 μ m, alicuotar y mantener a 4°C.

1000X FIAU (1-[2-deoxy, 2-fluoro- β -D-arabinofuranosil]-5-ioduracil): se prepara el stock a una concentración final de 200 μ M. Preparar una solución intermedia (100 mM) adicionando 338 mg de FIAU a 8 ml de PBS. Para obtener la solución de FIAU completamente disuelta, adicionar unas gotas de NaOH 5N. Una vez disuelta, aforar a 10 ml con PBS. Dividir en alicuotas y mantener a -20°C. Preparar el stock 1000X por adicionar 100 μ l de 100 mM FIAU a 50 ml de PBS. Si el FIAU aun precipita, adicionar NaOH 5N hasta disolver. Después de mezclar, esterilizar por filtración a través de 0.22 μ m, alicuotar y mantener a -20°C.

Medio STO/ Feeder:

- 7% Suero Bovino Fetal (SBF; GIBCO)
- 1X GPS
- El resto es de DMEM.

Medio M15: 15% SBF
1X GPS 1X aminoácidos no esenciales (GIBCO, Cat. 11140-50).
1X Piruvato de Sodio (GIBCO, Cat. 11360-070).
El resto es de DMEM

Medio de congelación:

- 60% DMEM
- 20% de SBF
- 20% DMSO (Dimethyl sulphoxide, SIGMA, cat. D2650)

Protocolos:

Cubrir cajas con gelatina.

- 1) Cubrir la superficie de un numero apropiado de cajas con gelatina al 0.1%.
- 2) Colocarlas en la campana de flujo laminar por dos hrs., aspirar la gelatina antes de utilizar las cajas o mantenerlas secas para su posterior uso.

Descongelar células.

- 1) Remover el vial de células congeladas del contenedor y colocarlo en un baño a 37°C
- 2) Transferir la suspensión celular a un tubo de 15 ml estéril, adicionar 5 ml de medio lentamente y agitando.
- 3) Colectar las células centrifugando a 1000 rpm por 5 min., aspirar el sobrenadante y resuspender en 5 a 10 ml.

Expansión de células STO

- 1) Crecer las células STO en un plato de 10 cm. previamente gelatinificado. Usar 10 ml de medio STO, incubar a 37°C, 5% de CO₂.
- 2) Cuando hayan llegado a confluencia descartar el sobrenadante, enjuagar dos veces con PBS. Aspirar el PBS y adicionar 1.5 ml de tripsina, incubando a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 3) Adicionar 1 ml de medio STO para inactivar la tripsina, pipetear arriba y abajo varias veces para tener una suspensión de células bien separadas unas de otras.
- 4) Centrifugar a 1000 rpm en una centrifuga de mesa.
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de medio STO.
- 6) Contar las células en cámara de Newbauer con 10 μ l de suspensión celular y 10 μ l de azul tripan (GIBCO, cat. 15250-061). El numero de células por cada cuadrante equivale a 0.1 μ l de la suspensión por lo que hay que multiplicar por 20, 000 para tener el número de las células por ml.
- 7) Subcultivar un décimo de la cantidad total (aproximadamente 1-1.5 x 10⁶ células) en una caja de 10 cm.

Preparación de células alimentadoras.

- 1) Partiendo de un subcultivo adicionar de 10 a 12 millones de células en un plato de 10 cm. previamente gelatinificado y con 10 ml de medio STO.
- 2) Al día siguiente, añadir 200 μ l de Mitomicina por caja de 10 cm. Dejar que actúe la droga por dos hrs.
- 3) Subcultivar y sembrar en platos gelatinificados a una densidad de 76,000 células/cm², o 1.5 x 10⁶ células por caja de 6 cm.

Cultivo de células ES.

Subcultivo

- 1) Cuando el cultivo este a confluencia, cambiar el medio.
- 2) 4 hrs. después, lavar dos veces con PBS, adicionar tripsina (1.5 ml para caja de 6 cm. o 2 para caja de 10cm) e incubar 10 a 12 min. a 37°C.
- 3) Adicionar un volumen igual de tripsina, pipetear varias veces para disgregar las células.
- 4) Pasar la suspensión a un tubo de 15 ml, y centrifugar a 1000 rpm 5 min. Descartar el sobrenadante y resuspender en 10 ml.
- 5) Determinar el número celular y subcultivar (1.5-2 x 10⁶ células en caja de 6 cm. o 3-4 x 10⁶ en caja de 10 cm.) en una caja con células alimentadoras y con medio M15.

Transformación genética por electroporación.

- 1) Linearizar el vector a transformar. Extraerlo con fenol/cloroformo y una vez más con cloroformo. Precipitar con 2.4 vol. de etanol, lavar con etanol al 70% y secar. Resuspender el ADN a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en 0.1X TE estéril.
- 2) Reemplazar el medio de cultivo de las células ES 4 hrs. antes.
- 3) Colectar las células por tripsinización, resuspender en 10 ml de PBS y determinar el número celular.
- 4) Colectar nuevamente por centrifugación, aspirar el sobrenadante y resuspender a una densidad de 1.1×10^7 células/ml.
- 5) Colocar $5\mu\text{g}$ de ADN en la pared interna de una cubeta de electroporación. Adicionar 0.9ml de la suspensión celular y mezclar suavemente (es importante no hacer demasiadas burbujas). Electroporar a 230V, $500\mu\text{F}$.
- 6) Transferir el contenido de la cubeta a un tubo de 50 ml estéril. Adicionar 15 ml de M15 lentamente y resuspender uniformemente. Distribuir la suspensión en 5 platos de 10 cm. con células alimentadoras y colocarlas en la incubadora.
- 7) Al día siguiente cambiar el medio para descartar los restos celulares. Para la selección utilizando neomicina, comenzar a adicionar el antibiótico 24 hrs. después de la electroporación y continuar hasta que las colonias puedan levantarse. Para la selección negativa con el casete HSV-TK utilizar FIAU comenzando a la par con la selección positiva.
- 8) Cambiar el medio con la apropiada selección cada vez que el medio este amarillo o haya demasiados restos celulares, al inicio diariamente.
- 9) Las colonias resistentes pueden ser levantadas a los 10-12 días después de la electroporación.

Selección de colonias.

- 1) Reemplazar el medio 4 hrs. antes, mientras tanto adicionar $25\mu\text{l}$ de tripsina por pozo a cajas de 96 pozos con fondo de U.
- 2) Aspirar el medio, lavar dos veces con PBS y adicionar 10 ml de PBS para cubrir la superficie de la caja.
- 3) Levantar las colonias de los platos lavados colocando una colonia por pozo en la caja de 96 con la tripsina. Repetir hasta llenar la caja.
- 4) Incubar a 37°C por 12 min. Durante este tiempo, preparar las células alimentadoras en caja de 96 pozos reemplazando el medio con $100\mu\text{l}$ de M15.
- 5) Empleando una pipeta muticanal, adicionar $25\mu\text{l}$ de M15 por pozo a las colonias. Pipetear para disgregar las células. Transferir las colonias al plato con células alimentadoras preparadas anteriormente. Tomará de 3-5 días antes de que las células se puedan expandir.

7.- Exposición de células ES a condiciones que promueven la muerte celular.

En la exposición al H_2O_2 , menadiona, staurosporina y la falta de suero, los experimentos se realizaron sembrando 1×10^5 células/ cm^2 en cajas de 24 pozos (2×10^5 cels. por pozo) por triplicado. Se analizó el efecto después de 24 hrs. de exposición exceptuando la falta de suero que fue después de 72 hrs. Para H_2O_2 , menadiona y staurosporina se realizaron primeramente curvas de concentración para encontrar las más adecuadas que promuevan muerte celular en las células ES silvestres. Para la falta de β -ME se sembraron 1.5×10^6 células en cajas de 6 cm., realizando el conteo a las 48 hrs.

8.- Generación de cuerpos embrioides.

- 1) Subcultivar las células ES a una densidad de 1.1×10^7 en un plato de cultivo de 10 cm. sin gelatina. Ahí permanecerán por 3 días, cambiando el medio cada 24 hrs. Este paso tiene como finalidad promover la formación de agregados celulares y al mismo tiempo disminuir la proporción de células STO en el

cultivo. Para que los agregados se formen correctamente es importante no disminuir el número celular ni el tamaño de la caja de cultivo.

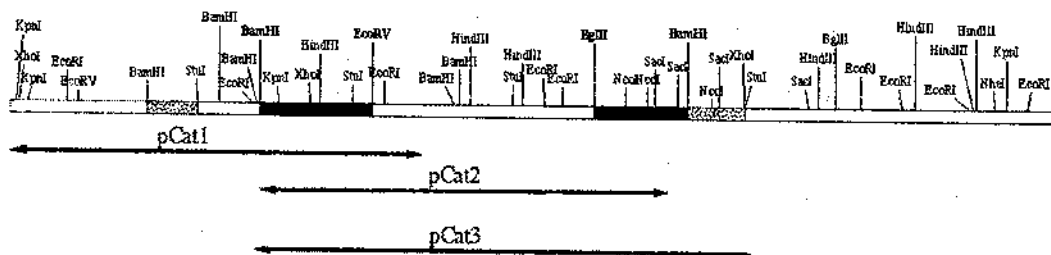
2) Al cuarto día (D3+0) se deben observar claramente los agregados celulares, así como también la presencia de células endodermales en la periferia de los agregados. Despegar los agregados utilizando una pipeta de 25 ml dejando caer suavemente medio M15.

3) Tomar los agregados y colocarlos en un frasco de 100 ml. Evitar reutilizar el mismo medio para volver a despegar ya que la capa de endodermo que se forma en este periodo, es muy sensible a los movimientos bruscos. Partiendo de una caja de 10 cm. se derivan 13 a 15 cajas bacteriológicas. Es importante una dilución correcta puesto que si existe una alta densidad los cuerpos embrioides se agregan formando "collares" que no diferencian de manera adecuada. Ya en las cajas bacteriológicas, permanecerán el suspensión por los días que dure el cultivo, reemplazando el medio cada 48 hrs. o cuando cambie el pH. Para cambiar el medio, el contenido de hasta 4 cajas se vacía directamente en un tubo de 50 ml., permitiendo que los cuerpos embrioides se sedimenten por gravedad, posteriormente se reemplaza el medio por medio fresco y se divide en las cajas bacteriológicas nuevas.

9.- Construcción de vectores.

Vector de recombinación homóloga

Este vector se construyó a partir de una librería genómica en el fago lambda que posee fragmentos del locus genómico de la catalasa perteneciente a la cepa de ratones 129. La Dra. Susana Castro subclonó 3 fragmentos en el vector *pKS Bluescript* llamándoles pCat1, pCat2 y pCat3 y que abarcan parte del gen como se ve en la siguiente figura:



Estos plásmidos se emplearon para aislar los brazos de homología (marcados en negro) así como para la obtención de sondas (regiones punteadas) para la identificación de colonias de células ES recombinantes.

Primeramente se subclonó el casete de TK (*timidina cinasa*; casete *MCITKpA*: Hasty, P, et al 1991. *Nature*(30): 243-246), partiendo del vector *pUNivec* (Ramiro Ramírez Solís) en el vector *pKS-Bluescript* usando los sitios BamHI-XbaI. A este nuevo vector se le denominó de recombinación. Mas tarde se aisló el brazo de homología 3' del vector pCat3 (BglIII-BamHI), y se subclonó en el vector de recombinación en el sitio de corte de BamHI. Se procedió a remover el sitio EcoRV del vector *PGKNeoloxPA* (Yuji Mishina), usando adaptadores ClaI-EcoRI, para permitir ver una diferencia en tamaños en el análisis de *Southern-blot* de las colonias de células ES resistentes a neomicina, Este casete de neomicina sin EcoRV fue cortado con XhoI y subclonado en el vector de recombinación en el sitio Sall. Finalmente se adiciono el brazo 5', cortado con EcoRV, al vector de recombinación que fue cortado con XhoI y los extremos rellenados con la enzima Klenow. Para la transformación, el vector se linearizó con la enzima NotI.

Vectores de sobreexpresión

Para la construcción de los vectores de sobre-expresión (pCAT^P y pCat^C) se utilizó el promotor híbrido de citomegalovirus/actina (vector *pCCALL*) dirigiendo la expresión del ADNc de la catalasa de humano (vector *pCAT10*; American type culture collection), y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (*PGKNeobpA*). La forma citosólica de la catalasa se generó eliminando la señal de importe al peroxisoma (KANL), localizada en la región 3' terminal. Brevemente, se generó un producto de PCR de 465pb empleando como cebadores: 5'TACCTGTGAACTGTCCCTACCG3', 5'CACAGATCTGCCACTCCATGGCCG3', y de templado el vector *pCAT10*. El primer 3' contiene la secuencia que cambia el aminoácido lisina por el codón de término ámbar (AAG a UAG) y un sitio NcoI para facilitar la identificación del plásmido. Finalmente, el producto de PCR fue digerido con SspI-BglII y reemplazó la secuencia 3' de la catalasa en el vector pCAT^P. A ambas construcciones se les adicionó el casete de resistencia a Neomicina (*PGKNeoloxpB*, Yuji Mishina) para permitir la selección en las células ES.

REFERENCIAS.

- 1.- Allan, D.J., Harmon, B.V. and Kerr, J.F.R: (1987). Cell death in spermatogenesis. In perspective on mammalian cell death, C.S.Potten, ed.(London:Oxford Univ. Press). 229-258
- 2.- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. and Steller, H. 1993. Programmed cell death during Drosophila embryogenesis. Development **117**(1): 29-43.
- 3.- Ameisen, J. C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J. P., Potentier, A. and Ouaisi, A. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. Cell Death Differ **2**(4): 285-300.
- 4.- Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F. and Fassler, R. 2000. Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. J Cell Sci **113 Pt 2**: 259-68.
- 5.- Bai, J. and Cederbaum, A. I. 2003. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. J Biol Chem **278**(7): 4660-7.
- 6.- Barkla, D. H. and Gibson, P. R. 1999. The fate of epithelial cells in the human large intestine. Pathology **31**(3): 230-8.
- 7.- Belizario, J. E., Alves, J., Occhiucci, J. M., Garay-Malpartida, M. and Sesso, A. 2007. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. Braz J Med Biol Res **40**(8): 1011-24.
- 8.- Bertling, C. J., Lin, F. and Girotti, A. W. 1996. Role of hydrogen peroxide in the cytotoxic effects of UVA/B radiation on mammalian cells. Photochem Photobiol **64**(1): 137-42.
- 9.- Bienert, G. P., Moller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Moller, I. M., Schjoerring, J. K. and Jahn, T. P. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J Biol Chem **282**(2): 1183-92.
- 10.- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P. and Lipton, S. A. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7162-6.
- 11.- Brezniceanu, M. L., Liu, F., Wei, C. C., Chenier, I., Godin, N., Zhang, S. L., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R. and Chan, J. S. 2008. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. Diabetes **57**(2): 451-9.
- 12.- Brezniceanu, M. L., Liu, F., Wei, C. C., Tran, S., Sachtelli, S., Zhang, S. L., Guo, D. F., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R. and Chan, J. S. 2007. Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. Kidney Int **71**(9): 912-23.
- 13.- Brown, D., Yu, B. D., Joza, N., Benit, P., Meneses, J., Firpo, M., Rustin, P., Penninger, J. M. and Martin, G. R. 2006. Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9918-23.
- 14.- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 269-90.
- 15.- Cain, K., Bratton, S. B. and Cohen, G. M. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. Biochimie **84**(2-3): 203-14.
- 16.- Cassens, U., Lewinski, G., Samraj, A. K., von Bernuth, H., Baust, H., Khazaie, K. and Los, M. 2003. Viral modulation of cell death by inhibition of caspases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **51**(1): 19-27.
- 17.- Castro-Obregon, S. and Covarrubias, L. 1996. Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation. FEBS Lett **381**(1-2): 93-7.
- 18.- Clanton, T. L. 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. J Appl Physiol **102**(6): 2379-88.

- 19.- **Codogno, P. and Meijer, A. J.** 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. Cell Death Differ **12 Suppl** 21509-18.
- 20.- **Coucovanis, E. and Martin, G. R.** 1995. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. Cell **83**(2): 279-87.
- 21.- **Coucovanis, E. and Martin, G. R.** 1999. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. Development **126**(3): 535-46.
- 22.- **Covarrubias, L., Hernandez-Garcia, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E. and Castro-Obregon, S.** 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? Dev Biol **320**(1): 1-11.
- 23.- **Cregan, S. P., Dawson, V. L. and Slack, R. S.** 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. Oncogene **23**(16): 2785-96.
- 24.- **Chang, D. J., Ringold, G. M. and Heller, R. A.** 1992. Cell killing and induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor-alpha is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. Biochem Biophys Res Commun **188**(2): 538-46.
- 25.- **Chen, X., Mele, J., Giese, H., Van Remmen, H., Dolle, M. E., Steinhilber, M., Richardson, A. and Vijg, J.** 2003. A strategy for the ubiquitous overexpression of human catalase and CuZn superoxide dismutase genes in transgenic mice. Mech Ageing Dev **124**(2): 219-27.
- 26.- **Chen, Y., Li, X., Eswarakumar, V. P., Seger, R. and Lonai, P.** 2000. Fibroblast growth factor (FGF) signaling through PI 3-kinase and Akt/PKB is required for embryoid body differentiation. Oncogene **19**(33): 3750-6.
- 27.- **Chen, Y., Yu, A., Saari, J. T. and Kang, Y. J.** 1997. Repression of hypoxia-reoxygenation injury in the catalase-overexpressing heart of transgenic mice. Proc Soc Exp Biol Med **216**(1): 112-6.
- 28.- **Deisseroth, A. and Dounce, A. L.** 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. Physiol Rev **50**(3): 319-75.
- 29.- **Dwivedi, S., Sharma, A., Patrick, B., Sharma, R. and Awasthi, Y. C.** 2007. Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling. Redox Rep **12**(1): 4-10.
- 30.- **el-Hage, S. and Singh, S. M.** 1990. Temporal expression of genes encoding free radical-metabolizing enzymes is associated with higher mRNA levels during in utero development in mice. Dev Genet **11**(2): 149-59.
- 31.- **El-Shershaby, A. M. and Hinchliffe, J. R.** 1974. Cell redundancy in the zona-intact preimplantation mouse blastocyst: a light and electron microscope study of dead cells and their fate. J Embryol Exp Morphol **31**(3): 643-54.
- 32.- **Ellis, R. E. and Horvitz, H. R.** 1991. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. Development **112**(2): 591-603.
- 33.- **Farquhar, J., Peters, M., Johnston, D. T., Strauss, H., Masterson, A., Wiechert, U. and Kaufman, A. J.** 2007. Isotopic evidence for Mesoarchaeal anoxia and changing atmospheric sulphur chemistry. Nature **449**(7163): 706-9.
- 34.- **Fita, I. and Rossmann, M. G.** 1985. The active center of catalase. J Mol Biol **185**(1): 21-37.
- 35.- **Fujisawa, T. and David, C. N.** 1984. Loss of differentiating nematocytes induced by regeneration and wound healing in Hydra. J Cell Sci **68**:243-55.
- 36.- **Goth, L.** 1991. Serum catalase: reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. Clin Chem **37**(12): 2043-7.
- 37.- **Gottlieb, R. A.** 2003. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. Basic Res Cardiol **98**(4): 242-9.
- 38.- **Gramzinski, R. A., Parchment, R. E. and Pierce, G. B.** 1990. Evidence linking programmed cell death in the blastocyst to polyamine oxidation. Differentiation **43**(1): 59-65.
- 39.- **Greenlund, L. J., Deckwerth, T. L. and Johnson, E. M., Jr.** 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. Neuron **14**(2): 303-15.
- 40.- **Grieshaber, C. K. and Hoffman, H. A.** 1975. Genetic regulation of the expression of catalase activity in murine red blood cells. Biochem Genet **13**(7-8): 447-56.

- 41.- Griswold, C. M., Matthews, A. L., Bewley, K. E. and Mahaffey, J. W. 1993. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. Genetics **134**(3): 781-8.
- 42.- Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Nagy, A. 1998. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. Mech Dev **76**(1-2): 79-90.
- 43.- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M. and Mak, T. W. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. Cell **94**(3): 339-52.
- 44.- Hanada, H., Kashiwagi, A., Takehara, Y., Kanno, T., Yabuki, M., Sasaki, J., Inoue, M. and Utsumi, K. 1997. Do reactive oxygen species underlie the mechanism of apoptosis in the tadpole tail? Free Radic Biol Med **23**(2): 294-301.
- 45.- Heller, R. A. and Kronke, M. 1994. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. J Cell Biol **126**(1): 5-9.
- 46.- Hiraku, Y. and Kawanishi, S. 1996. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. Cancer Res **56**(22): 5172-8.
- 47.- Hirono, A., Sasaya-Hamada, F., Kanno, H., Fujii, H., Yoshida, T. and Miwa, S. 1995. A novel human catalase mutation (358 T-->del) causing Japanese-type acatalasemia. Blood Cells Mol Dis **21**(3): 232-4.
- 48.- Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A. and Ho, D. S. 2004. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. J Biol Chem **279**(31): 32804-12.
- 49.- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell **75**(2): 241-51.
- 50.- Hoffman, H. A. and Grieshaber, C. K. 1974. Genetic studies of murine catalase. Liver and erythrocyte catalase controlled by independent loci. J Hered **65**(5): 277-9.
- 51.- Horvitz, H. R. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Cancer Res **59**(7 Suppl): 1701s-1706s.
- 52.- Islam, K. N., Kayanoki, Y., Kaneto, H., Suzuki, K., Asahi, M., Fujii, J. and Taniguchi, N. 1997. TGF-beta1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. Free Radic Biol Med **22**(6): 1007-17.
- 53.- Iwai, K., Kondo, T., Watanabe, M., Yabu, T., Kitano, T., Taguchi, Y., Umehara, H., Takahashi, A., Uchiyama, T. and Okazaki, T. 2003. Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis. J Biol Chem **278**(11): 9813-22.
- 54.- Jacobson, M. D. and Raff, M. C. 1995. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. Nature **374**(6525): 814-6.
- 55.- Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. Cell **88**(3): 347-54.
- 56.- Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T. and Bredesen, D. E. 1993. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. Science **262**(5137): 1274-7.
- 57.- Kannan, R., Jin, M., Gamulescu, M. A. and Hinton, D. R. 2004. Ceramide-induced apoptosis: role of catalase and hepatocyte growth factor. Free Radic Biol Med **37**(2): 166-75.
- 58.- Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T. and Taniguchi, N. 1997. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. Blood **89**(5): 1748-53.
- 59.- Kataoka, T. 2005. The caspase-8 modulator c-FLIP. Crit Rev Immunol **25**(1): 31-58.
- 60.- Kawada, Y., Khan, M., Sharma, A. K., Ratnayake, D. B., Dobashi, K., Asayama, K., Moser, H. W., Contreras, M. A. and Singh, I. 2004. Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients. Mol Genet Metab **83**(4): 297-305.

- 61.- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- 62.- Kirk, D. L. 1994. Germ cell specification in *Volvox carter*. Ciba Found Symp **182**:15-15; discussion 15-30.
- 63.- Kitagawa, K. and Niikura, Y. 2008. Caspase-independent mitotic death (CIMD). Cell Cycle **7**(8): 1001-5.
- 64.- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P. and Flavell, R. A. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell **94**(3): 325-37.
- 65.- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R. A. 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature **384**(6607): 368-72.
- 66.- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhashi, T. and Mizushima, N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature **432**(7020): 1032-6.
- 67.- Lambeth, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol **4**(3): 181-9.
- 68.- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., Vandenberghe, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation, Cell Death Differ **14**(1): 44-55.
- 69.- Lapointe, S., Legare, C., Gaudreault, C., Sullivan, R. and Sirard, M. A. 1998. cDNA sequence and deduced amino acid sequence of bovine oviductal fluid catalase. Mol Reprod Dev **51**(3): 265-73.
- 70.- Lemasters, J. J. 1999. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. Am J Physiol **276**(1 Pt 1): G1-6.
- 71.- Lenzen, S., Drinkgern, J. and Tiedge, M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. Free Radic Biol Med **20**(3): 463-6.
- 72.- Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X. and Williams, R. S. 2000. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. Cell **101**(4): 389-99.
- 73.- Li, P. F., Dietz, R. and von Harsdorf, R. 1997. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. Circulation **96**(10): 3602-9.
- 74.- Li, P. F., Dietz, R. and von Harsdorf, R. 1997. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. FEBS Lett **404**(2-3): 249-52.
- 75.- Lin, S. J., Shyue, S. K., Liu, P. L., Chen, Y. H., Ku, H. H., Chen, J. W., Tam, K. B. and Chen, Y. L. 2004. Adenovirus-mediated overexpression of catalase attenuates oxLDL-induced apoptosis in human aortic endothelial cells via AP-1 and C-Jun N-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways. J Mol Cell Cardiol **36**(1): 129-39.
- 76.- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R. and Thompson, C. B. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. Mol Cell **6**(6): 1389-99.
- 77.- Lockshin, R. A. and Williams, C. M. 1965. Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. J Insect Physiol **11**(7): 831-44.
- 78.- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 545-50.
- 79.- Lorenzo, H. K. and Susin, S. A. 2007. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. Drug Resist Updat **10**(6): 235-55.

- 80.- Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. and Roth, G. S.** 1998. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. J Biol Chem **273**(6): 3756-64.
- 81.- Lledias, F., Rangel, P. and Hansberg, W.** 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. J Biol Chem **273**(17): 10630-7.
- 82.- Macdonell, R. A., Donnan, G. A. and Bladin, P. F.** 1989. A comparison of somatosensory evoked and motor evoked potentials in stroke. Ann Neurol **25**(1): 68-73.
- 83.- Mate, M. J., Ortiz-Lombardia, M., Boitel, B., Haouz, A., Tello, D., Susin, S. A., Penninger, J., Kroemer, G. and Alzari, P. M.** 2002. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. Nat Struct Biol **9**(6): 442-6.
- 84.- Melendez, A. and Neufeld, T. P.** 2008. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. Development **135**(14): 2347-60.
- 85.- Melino, G., Knight, R. A. and Nicotera, P.** 2005. How many ways to die? How many different models of cell death? Cell Death Differ **12 Suppl** 21457-62.
- 86.- Meurette, O., Huc, L., Rebillard, A., Le Moigne, G., Lagadic-Gossmann, D. and Dimanche-Boitrel, M. T.** 2005. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induces necrosis-like cell death in tumor cells at acidic extracellular pH. Ann N Y Acad Sci **1056**379-87.
- 87.- Misra, R. P., Bronson, S. K., Xiao, Q., Garrison, W., Li, J., Zhao, R. and Duncan, S. A.** 2001. Generation of single-copy transgenic mouse embryos directly from ES cells by tetraploid embryo complementation. BMC Biotechnol **112**.
- 88.- Mollen, K. P., McCloskey, C. A., Tanaka, H., Prince, J. M., Levy, R. M., Zuckerbraun, B. S. and Billiar, T. R.** 2007. Hypoxia activates c-Jun N-terminal kinase via Rac1-dependent reactive oxygen species production in hepatocytes. Shock **28**(3): 270-7.
- 89.- Muschel, R. J., Bernhard, E. J., Garza, L., McKenna, W. G. and Koch, C. J.** 1995. Induction of apoptosis at different oxygen tensions: evidence that oxygen radicals do not mediate apoptotic signaling. Cancer Res **55**(5): 995-8.
- 90.- Nagababu, E., Chrest, F. J. and Rifkind, J. M.** 2003. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta **1620**(1-3): 211-7.
- 91.- Nalepa, G. and Zukowska-Szczechowska, E.** 2002. [Caspases and apoptosis: die and let live]. Wiad Lek **55**(1-2): 100-6.
- 92.- Neufeld, T. P. and Baehrecke, E. H.** 2008. Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila*. Autophagy **4**(5): 557-62.
- 93.- Nicotera, P. and Leist, M.** 1997. Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. Cell Death Differ **4**(6): 435-42.
- 94.- Ogata, M.** 1991. Acatlasemia. Hum Genet **86**(4): 331-40.
- 95.- Oh, S. H. and Lim, S. C.** 2006. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. Toxicol Appl Pharmacol **212**(3): 212-23.
- 96.- Olie, R. A., Durrieu, F., Cornillon, S., Loughran, G., Gross, J., Earnshaw, W. C. and Golstein, P.** 1998. Apparent caspase independence of programmed cell death in *Dictyostelium*. Curr Biol **8**(17): 955-8.
- 97.- Penaloza, C., Lin, L., Lockshin, R. A. and Zakeri, Z.** 2006. Cell death in development: shaping the embryo. Histochem Cell Biol **126**(2): 149-58.
- 98.- Percy, M. E.** 1984. Catalase: an old enzyme with a new role? Can J Biochem Cell Biol **62**(10): 1006-14.
- 99.- Perez-Cruz, I., Carcamo, J. M. and Golde, D. W.** 2007. Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase. Apoptosis **12**(1): 225-34.
- 100.- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M. D. and Remacle, J.** 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mech Ageing Dev **51**(3): 283-97.

- 101.- Purdue, P. E. and Lazarow, P. B. 1996. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. J Cell Biol **134**(4): 849-62.
- 102.- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D. and Freeman, B. A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. J Biol Chem **266**(32): 22028-34.
- 103.- Ratan, R. R., Murphy, T. H. and Baraban, J. M. 1994. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. J Neurochem **62**(1): 376-9.
- 104.- Reape, T. J., Molony, E. M. and McCabe, P. F. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. J Exp Bot **59**(3): 435-44.
- 105.- Reimer, D. L., Bailey, J. and Singh, S. M. 1994. Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene. Genomics **21**(2): 325-36.
- 106.- Reimer, D. L. and Singh, S. M. 1996. Distinct mRNA-binding proteins interacting with short repeat sequences of the 3' UTR may be involved in the post-transcriptional regulation of the mouse catalase gene, Cas-1. DNA Cell Biol **15**(4): 317-28.
- 107.- Reynaud, K. and Driancourt, M. A. 2000. Oocyte attrition. Mol Cell Endocrinol **163**(1-2): 101-8.
- 108.- Rezvani, H. R., Ged, C., Bouadjar, B., de Verneuil, H. and Taieb, A. 2008. Catalase overexpression reduces UVB-induced apoptosis in a human xeroderma pigmentosum reconstructed epidermis. Cancer Gene Ther **15**(4): 241-51.
- 109.- Rezvani, H. R., Mazurier, F., Cario-Andre, M., Pain, C., Ged, C., Taieb, A. and de Verneuil, H. 2006. Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. J Biol Chem **281**(26): 17999-8007.
- 110.- Roach, H. I. and Clarke, N. M. 2000. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. J Bone Joint Surg Br **82**(4): 601-13.
- 111.- Rubin, R. and Farber, J. L. 1984. Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Arch Biochem Biophys **228**(2): 450-9.
- 112.- Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregon, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D. and Covarrubias, L. 1998. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. Exp Cell Res **238**(1): 136-47.
- 113.- Sánchez-Carbente, M. R., Castro-Obregon, S., Covarrubias, L. and Narvaez, V. 2005. Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. Cell Death Differ **12**(3): 279-91.
- 114.- Schlesinger, T. K., Fanger, G. R., Yujiri, T. and Johnson, G. L. 1998. The TAO of MEKK. Front Biosci **3D1181-6**.
- 115.- Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Narvaez, V., Sánchez-Carbente Mdel, R., Hernandez-Garcia, D., Cuervo, R. and Covarrubias, L. 2006. Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. Dev Biol **291**(2): 291-9.
- 116.- Schratt, G., Philippar, U., Hockemeyer, D., Schwarz, H., Alberti, S. and Nordheim, A. 2004. SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. Embo J **23**(8): 1834-44.
- 117.- Schriener, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C. and Rabinovitch, P. S. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. Science **308**(5730): 1909-11.
- 118.- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A. C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W. A. and Fiers, W. 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. J Biol Chem **267**(8): 5317-23.
- 119.- Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell **9**(3): 459-70.
- 120.- Shi, Y. 2008. Apoptosome assembly. Methods Enzymol **442**:141-56.

- 121.- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. and Tsujimoto, Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. Nat Cell Biol **6**(12): 1221-8.
- 122.- Singh, R., Czaja, M. J. 2007. Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. J Gastroenterol Hepatol **22**(1): S45-8.
- 123.- Smith, D. J., Ng, H., Kluck, R. M. and Nagley, P. 2008. The mitochondrial gateway to cell death. IUBMB Life **60**(6): 383-9.
- 124.- Starke, P. E. and Farber, J. L. 1985. Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. J Biol Chem **260**(1): 86-92.
- 125.- Starke, P. E. and Farber, J. L. 1985. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. J Biol Chem **260**(18): 10099-104.
- 126.- Steller, H. 2008. Regulation of apoptosis in Drosophila. Cell Death Differ **15**(7): 1132-8.
- Tharappel, J. C., Nalca, A., Owens, A. B., Ghabrial, L., Konz, E. C., Glauert, H. P. and Spear, B. T. 2003. Cell proliferation and apoptosis are altered in mice deficient in the NF-kappaB p50 subunit after treatment with the peroxisome proliferator ciprofibrate. Toxicol Sci **75**(2): 300-8.
- 127.- Tohyama, Y., Takano, T. and Yamamura, H. 2004. B cell responses to oxidative stress. Curr Pharm Des **10**(8): 835-9.
- 128.- Tome, M. E., Lutz, N. W. and Briehl, M. M. 2003. Overexpression of catalase or Bcl-2 delays or prevents alterations in phospholipid metabolism during glucocorticoid-induced apoptosis in WEHI7.2 cells. Biochim Biophys Acta **1642**(3): 149-62.
- 129.- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. Cell Death Differ **12 Suppl** 21528-34.
- 130.- Vanden Berghe, T., van Loo, G., Saelens, X., Van Gurp, M., Brouckaert, G., Kalai, M., Declercq, W. and Vandenabeele, P. 2004. Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD. J Biol Chem **279**(9): 7925-33.
- 131.- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. and Wallach, D. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. Immunity **9**(2): 267-76.
- 132.- Vaux, D. L. and Silke, J. 2003. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 499-504.
- 133.- Widlak, P. and Garrard, W. T. 2005. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. J Cell Biochem **94**(6): 1078-87.
- 134.- Xu, B., Moritz, J. T. and Epstein, P. N. 1999. Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. Free Radic Biol Med **27**(7-8): 830-7.
- 135.- Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ **12 Suppl** 21542-52.
- 136.- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M. and Mak, T. W. 1998. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell **94**(6): 739-50.
- 137.- Yu, S. and Reddy, J. K. 2007. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. Biochim Biophys Acta **1771**(8): 936-51.
- 138.- Yuce, O. and Sadler, K. C. 2001. Postmeiotic unfertilized starfish eggs die by apoptosis. Dev Biol **237**(1): 29-44.
- 139.- Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T. and Reed, J. C. 1996. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. J Biol Chem **271**(13): 7440-4.

140.- Zhang, X., Vallabhaneni, R., Loughran, P. A., Shapiro, R., Yin, X. M., Yuan, Y. and Billiar, T. R. 2008. Changes in FADD levels, distribution, and phosphorylation in TNFalpha-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3, caspase-8 and BID dependent. Apoptosis **13**(8): 983-92.

141.- Zitvogel, L., Casares, N., Pequignot, M. O., Chaput, N., Albert, M. L. and Kroemer, G. 2004. Immune response against dying tumor cells. Adv Immunol **84**131-79.

Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death

Denhí Schnabel^a, Enrique Salas-Vidal^a, Verónica Narváez^b, María del Rayo Sánchez-Carbente^a, David Hernández-García^a, Rodrigo Cuervo^a, Luis Covarrubias^{a,*}

^a *Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México*

^b *Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62210, México*

Received for publication 8 October 2005; revised 9 December 2005; accepted 12 December 2005

Available online 27 January 2006

Abstract

Vertebrate limb development is a well-studied model of apoptosis; however, little is known about the intracellular molecules involved in activating the cell death machinery. We have shown that high levels of reactive oxygen species (ROS) are present in the interdigital ‘necrotic’ tissue of mouse autopod, and that antioxidants can reduce cell death. Here, we determined the expression pattern of several antioxidant enzymes in order to establish their role in defining the areas with high ROS levels. We found that the genes encoding the superoxide dismutases and catalase are expressed in autopod, but they are downregulated in the interdigital regions at the time ROS levels increased and cell death was first detected. The possible role of superoxide and/or peroxide in activating cell death is supported by the protective effect of a superoxide dismutase/catalase mimetic. Interestingly, we found that peroxidase activity and glutathione peroxidase-4 gene (*Gpx4*) expression were restricted to the non-apoptotic tissue (e.g., digits) of the developing autopod. Induction of cell death with retinoic acid caused an increase in ROS and decrease in peroxidase activity. Even more inhibition of glutathione peroxidase activity leads to cell death in the digits, suggesting that a decrease in antioxidant activity, likely due to *Gpx4*, caused an increase in ROS levels, thus triggering apoptosis.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Mouse; Autopod; Morphogenesis; Digits; Death; Apoptosis; Oxidative stress; Peroxidase; Catalase; Superoxide dismutase; Reactive oxygen species; Apoptosis; Limb development; Mercaptosuccinate

Introduction

During development, abundant cell death is associated with several morphogenetic processes (Clarke, 1990). Despite this observation, the actual function of this cell death has only been experimentally established in few cases. Furthermore, although some growth factors that appear to participate in controlling the death fate in morphogenetic processes have been identified, the complete set of molecules defining the ‘death environment’ in no case has been defined (see for instance Zuzarte-Luis and Hurlé, 2002). Even less well characterized is the transducing signals that emerge in response to extracellular factors that trigger death within

cells. In the limb, we proposed that cell death influences digit individualization by restricting interdigit growth and promoting regression of interdigital tissue in contrast to the traditional purely sculpting model (Salas-Vidal et al., 2001). Among the molecules regulating the death fate of interdigital cells are members of the fibroblast growth factor (Fgf) and bone morphogenetic protein (Bmp) families, as well as retinoic acid (RA), though the mechanism by which they turn on the death process is not known (Zuzarte-Luis and Hurlé, 2002).

Reactive oxygen species (ROS) are generated in all aerobic organisms during normal respiratory metabolism. ROS are known to affect cells in different ways by directly oxidizing and damaging diverse cellular components like DNA, proteins, and lipids (Bokov et al., 2004). However, recent findings show that ROS also act as major intracellular signals involved in the regulation of key cellular process such as cell

* Corresponding author. Fax: +52 73 17 2388.

E-mail address: covs@ibt.unam.mx (L. Covarrubias).

proliferation, cell differentiation, senescence, and apoptosis (Esposito et al., 2004; Jabs, 1999). Intracellular concentration of ROS can be modulated by controlling the sites and amounts of their synthesis or by inactivating them with antioxidant molecules (e.g., glutathione, thioredoxin) directly or with the help of antioxidant enzymes. Due to the difficulty in determining ROS concentration *in vivo*, frequently, the redox state of a cell or tissue is estimated indirectly by measuring the amount of oxidized molecules or the activity of different antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (Sod), catalase, and peroxidases (see for instance Brandes and Janiszewski, 2005 and references herein).

Pro-oxidant states are known to occur previous to the onset of cell death in several cell types like neurons (Greenlund et al., 1995), monocytes (Baran et al., 2004), tumor cells (Djavaheri-Mergny et al., 2004), and embryonic stem cells (Castro-Obregón and Covarrubias, 1996) among many other cell types. It is also known that overexpressing antioxidant enzymes can suppress apoptosis; for example, neurons overexpressing *Sod1* display delayed apoptosis induced by Ngf removal (Greenlund et al., 1995), and Tnf α -induced apoptosis is completely suppressed by overexpressing *Sod2* (Manna et al., 1998). These observations indicate that intracellular modulation of ROS concentration is of major importance for cell survival.

The relevance of the redox state in cell survival *in vivo* is hard to establish. However, the observation that mutations in mouse genes encoding molecules involved in typical antioxidant systems are embryonic lethal could indicate that strict control of ROS level is required for the survival of the highly metabolically active developing cells (Imai et al., 2003; Matsui et al., 1996). ROS have been proposed to participate in several neurodegenerative diseases, but a common cause–effect mechanism has not been defined (Andersen, 2004). Oxidative stress or accumulative damage by ROS could increase the risk of a cell to die in those pathological conditions. Alternatively, as mentioned above, ROS could act as signal transducing molecules directly modulating the cell death process. We have previously observed that during mouse development, many tissues undergoing apoptosis show increased levels of ROS; the cell death in at least one of these embryonic tissues (i.e., autopod interdigital tissue) is inhibited when treated with antioxidants (Salas-Vidal et al., 1998).

In the present study, we focused on the characterization of several antioxidant enzymes and their relationship to cell death during interdigital regression of mouse limbs. The three genes encoding Sod (*Sod1-3*), the catalase gene (*Cas1*), and the gene encoding the glutathione peroxidase 4 (*Gpx4*) were expressed in the digits. Their transcripts as well as peroxidase activity were complementary with high ROS level and areas containing dying cells. In agreement with a role of peroxidase activity in the control of interdigital cell death, cell death activation in limbs by RA spatially correlated with peroxidase activity down-regulation. More importantly, inhibition of glutathione peroxidase activity dramatically increased cell death in the normally non-dying distal digital tissue. These data suggest that peroxidase activity, likely due to *Gpx4*, determines ROS and cell death patterns in the developing autopod.

Materials and methods

Animals

Mouse strain CD-1 was used in this study. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation from 12.5 to 14.5 days post-coitus (*dpc*; day 0.5 of *coitus* was the day on which vaginal plug was found). The embryos were removed, and the forelimbs were dissected in L15 medium (Microlab, México) and staged according to the limb bud development staging system of Wanek et al. (1989).

Limb culture

The protocol used to culture embryonic limbs is based on the embryonic gonad organotypic culture described by Taketo and Koide (1981) with slight modifications (Salas-Vidal et al., 1998). The staged mouse embryonic forelimbs were cultured on 0.45- μ m pore Durapore polycarbonate membrane filters (Millipore) floating on Mc-Coy's 5a modified medium (Microlab, México) without serum and supplemented 200 UI/ml penicillin G sodium, 200 mg/ml streptomycin sulfate, and 2 mM glutamine (GIBCO, USA). In some cases, RA (1 μ M), mercaptosuccinate (MS; 1–100 mM), or hydroperoxide (H_2O_2 ; 5–500 mM) was added to the culture medium.

In vivo peroxidase activity, cell death, and ROS detection

Peroxidase activity was determined by incubation of forelimbs for 30 min at 37°C in PBS pH 6.5 with 50 mM H_2O_2 (hydroperoxide) and either 40 μ M dichlorofluorescein (DCF; Molecular Probes) (Burow and Valet, 1987) or diaminobenzidine followed by two washes in PBS. Regions of cell death in freshly dissected embryonic limbs were visualized with acridine orange (AO; Sigma) staining by the protocol described by Abrams et al. (1993) and validated to detect cell death in mouse embryos by Salas-Vidal et al. (1998). Briefly, the tissues were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS: 0.2% KH_2PO_4 , 0.115 Na $2HPO_4$, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, pH 7.4) stained with AO at 5 μ g/ml in PBS, for 30 min at 37°C and observed under standard fluorescence microscopy. For more detailed studies, the tissues were analyzed by confocal microscopy as described below. To determine apoptosis and ROS levels, forelimbs were incubated 20 min in 5 μ g/ml acridine orange (AO) and 1 μ M dihydroethidium (DHE) or dihydrorhodamine (DHR), respectively, in PBS pH 6.5 at room temperature, followed by two washes in PBS. Detection of fragmented DNA was performed on 4% paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded 10- μ m serial sections of complete forelimbs with the TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method, as described by the manufacturer (Roche). Limbs were sectioned perpendicular to the proximo-distal axis such that the dorso-ventral cell death pattern could be observed. The complete series were analyzed (representative images are shown).

Catalase activity

Equal amounts (150 μ g) of protein were loaded onto a 10% native polyacrylamide gel. After electrophoresis, gel was soaked in 5% methanol for 3 min and then incubated with 0.03% hydrogen peroxide. Catalase activity was revealed by incubating gel in a fresh mixture of 40 mg/ml Iron (III) chloride and 40 mg/ml potassium ferricyanide.

Confocal laser scanning microscopy

Developing limbs were observed in a Bio-Rad MRC-600 confocal laser scanning system equipped with a krypton/argon laser and coupled to an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) with PlanNeofluar 5 \times (aperture 0.15), 10 \times (aperture 0.30), and 20 \times (aperture 0.5) objectives. BHS filter and a 488-nm excitation wavelength were used for detection of oxidized DCF, the RHS filter, and a 488-nm excitation wavelength for AO, and the YHS filter and 568-nm excitation wave length for oxidized DHE. The pinhole aperture was maintained at 5. Serial optical sections were produced at 15 and 30 μ m as the z-step.

Cartilage staining with Alcian blue

Skeletal preparations were made following the procedure described by Wallin et al. (1994). Briefly, limbs were fixed in 99% ethanol for 24 h and in acetone for another 24 h with constant shaking. Afterwards, they were incubated in the staining solution (1 vol. of 0.3% Alcian blue in 70% ethanol, 1 vol. of 0.1% alizarin red S in 96% ethanol, 1 vol. absolute acetic acid, and 17 vol. of 70% ethanol) at 37°C for 4–6 h and then overnight at room temperature with constant shaking. Samples were rinsed in water and cleared in 1% potassium hydroxide and 20% glycerol in water at room temperature. For long-term storage, specimens were transferred into 50%, 80%, and finally 100% glycerol.

Image analysis

Image analysis by superimposition of two-dimensional (2D) limb confocal images was performed as previously described by Salas-Vidal et al. (1998). Briefly, images were displayed on a Macintosh G3 computer at 300 MHz, using Adobe Photoshop software, version 3.02. Images of interest were superimposed, and the overlying image opacity was reduced to 50%. The overlying image was rotated and moved vertically and horizontally until got completely aligned with the underlying image. In some superimpositions, the cartilage condensations were used for the alignment; images were first aligned using the wrist and middle digit and then improved image alignment using the cartilage condensation. In some images where the limbs were treated with the glutathione peroxidase inhibitor, MS, it was necessary to highlight the limb contour by delineating it with dots, since for comparative purposes, the confocal sensitivity was maintained during the image acquisition and when the glutathione peroxidase activity was completely abolished the signal was extremely low.

Detection of gene expression by RT-PCR

Reverse transcriptase (RT) reaction was performed with 1 µg of total RNA, and the resultant cDNA was subjected to PCR. To amplify a region corresponding to the mRNA of *Gpx1*, *Gpx2*, *Gpx3*, *Gpx4*, *Sod1*, *Sod2*, *Sod3*, and *Cas1*, the following primers were used: *Gpx1* forward 5'-ACACCGCT-TACTTTCTCTCT and *Gpx1* reverse 5'-TCCTCTTACCGTTCTTACTTC (expected product size, 185 bp); *Gpx2* forward 5'-ACATTGCCAAGTCGTTCTACG and *Gpx2* reverse 5'-GAGCAGCTCTCATCTAGATGG (expected product size, 580 bp); *Gpx3* forward 5'-CATTGGCTTGGTCATTCTGG and *Gpx3* reverse 5'-CTTGCCCTCTTCTCGTCTT (expected product size, 169 bp); *Gpx4* forward 5'-GCAATGAGGCAAACTGA and *Gpx4* reverse 5'-GGACGGCAGCATAGAGAT (expected product size, 382 bp); *Sod1* forward 5'-AGTATGGGGACAATA-CACAAGG and *Sod1* reverse 5'-CAGTCAAAGGCGTCACACAGTTAC (expected product size, 439 bp); *Sod2* forward 5'-TCAACGCCACCGAGGAGA and *Sod2* reverse 5'-CCCCAGCAGCGGAATAAG (expected product size, 358 bp); *Sod3* forward 5'-GAGAAGATAGGCGACACGCA and *Sod3* reverse 5'-CTCCCGCCGCGTTCTTGC (expected product size, 600 bp); *Cas1* forward 5'-TACCTGTGAAGTGTCCCTACCG and *Cas1* reverse 5'-GAATTGCGTTCT-TAGGCTTCTC (expected product size 411 bp). Polymerase chain reaction conditions used were 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min for up to 30 cycles. The RT-PCR conditions were set in control tissues (i.e., liver, intestine, kidney, and testis) where the different antioxidant enzymes are expressed (data not shown).

Whole-mount in situ hybridization

Mouse embryonic forelimbs were dissected in cold PBS and fixed overnight in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS. Whole-mount in situ hybridization was performed according to Wilkinson and Nieto (1993). Using digoxigenin-labeled antisense riboprobes, specific hybridization was detected with an antidigoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase. Proteinase K treatment was titrated to prevent damage to superficial ectoderm structures such as the apical ectodermal ridge and was adjusted, for comparative analysis, to simultaneously obtain the best detection at the different limb developmental stages. For all genes tested, an in situ hybridization with a specific sense or not related riboprobes was performed as a control of procedure specificity (data not

shown). The probes used correspond to the regions between positions: 213 to 576 of *Gpx4* mRNA (gene bank accession number: BC083137); 128 to 609 of *Gpx3* mRNA (gene bank accession number: BC037027); 618 to 1140 of *Cas1* mRNA (gene bank accession number: BC013447); 152–490 of *Sod1* mRNA (gene bank accession number: BC048874); 235–574 of *Sod2* mRNA (gene bank accession number: BC010548); 405–1004 of *Sod3* mRNA (gene bank accession number: NM_011435).

Results

Peroxidase activity pattern in limbs is complementary to that of ROS levels and cell death

During mouse limb development, at stages 9 through 11 [S9–S11; as classified by Wanek et al. (1989)], apoptosis is located in the interdigital regions as detected by TUNEL or by

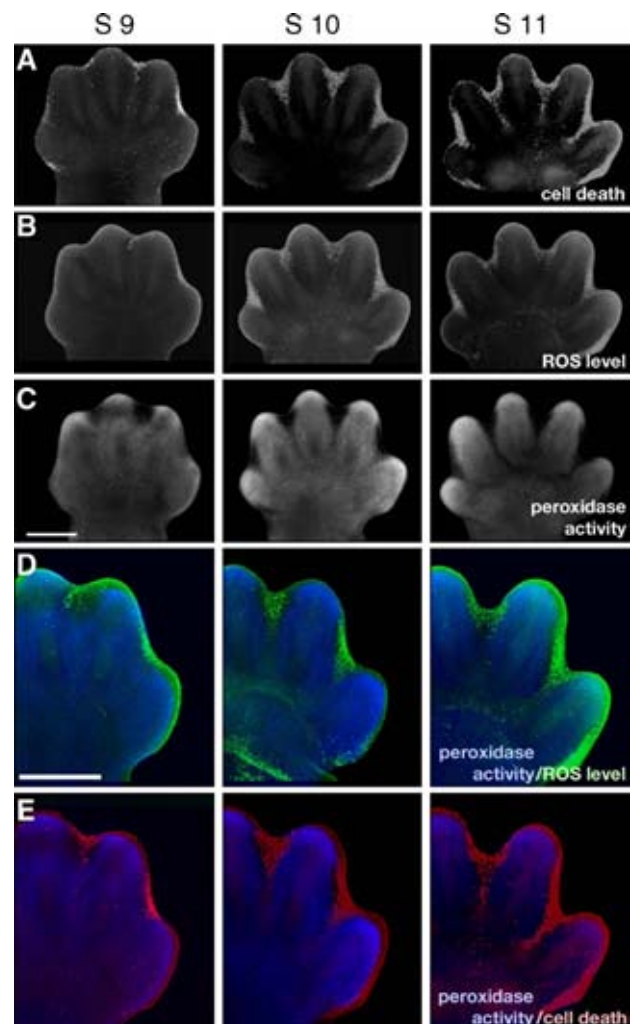


Fig. 1. Cell death, ROS, and peroxidase activity patterns during autopod development. Forelimbs at stages S9, S10, and S11 were stained with AO to detect cell death (A; red in E), with DHE to detect ROS levels (B; green in D), or with DCF in the presence of hydroperoxide to detect peroxidase activity (C; blue in D and E). Peroxidase activity was observed in the digital tissue with the most intense level at the tips. No peroxidase activity was detected at the interdigits such that its pattern is complementary with that of ROS and cell death as shown by the superimpositions of the corresponding patterns (D and E, respectively). All limbs are oriented with the anterior side to the left. Scale bar = 500 µm.

staining with acridine orange (Salas-Vidal et al., 2001; Fig. 1A). Here, using the redox-sensitive dye dihydroethidium, we confirmed our previous observations showing oxidative stress in the regions undergoing cell death (Salas-Vidal et al., 1998; Fig. 1B). Furthermore, in agreement with the participation of superoxide and peroxide in promoting cell death in the interdigital regions, a Sod/catalase mimetic, EUK-134, reduced cell death as measured by acridine orange staining and TUNEL, and developing limbs displayed a reduction in interdigital tissue regression (Fig. 2).

Peroxidase activity (the reduction of peroxide using a reducing substrate) is the major antioxidant activity found in cells. This activity could be due to different classes of peroxidase, each characterized by the distinct substrate it uses. In order to determine whether this activity participates in defining the ROS pattern, we assessed general peroxidase activity in situ. Peroxidase activity was assayed by using either diaminobenzidine (data not shown) or 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCF) as substrates, as it has been previously described by Burow and Valet (1987). As these are small substrates, it is expected that several peroxidases could use them to reduce hydroperoxide. As shown in Fig. 1C, in S9 through S11 limbs, peroxidase activity is restricted to the future digital tissue and is excluded from the interdigital tissue. This distinct pattern is complementary to the ROS level and cell death patterns (Figs. 1D and E, respectively). Interestingly by S9, peroxidase activity is already strong along the whole digital rays, whereas the cell death is still restricted to the most distal interdigital region.

To analyze in more detail the pattern of peroxidase activity, we superimposed images of Alcian blue stained limbs (Fig. 3A), which use cartilage condensations as reference for the position of peroxidase activity images. These superimpositions show that interdigital peroxidase activity decreased at up to the distal level of phalange 1 at S9, up to the proximal level of phalange 1 by S10, and up to the level of articulation between phalange 1 and metacarpals by S11. Thus, endogenous peroxidase activity down regulation occurs in a disto-proximal pattern, similar to the one that follows cell death (Salas-Vidal et al., 2001). Additionally by analyzing the dorsal and the ventral sides of the

same limbs, we observed that peroxidase activity exhibit a dorso-ventral asymmetry, covering most of the dorsal interdigital tissue in the dorsal side compared to the ventral one; a v-shaped region devoid of activity is observed, same area in which cell death takes place (Fig. 3B). This dorso-ventral pattern of peroxidase activity is opposite to the dorso-ventral cell death pattern [see also Salas-Vidal et al. (2001)].

RA has been proposed to mediate interdigital cell death (Dupe et al., 1999; Rodriguez-Leon et al., 1999). In addition, RA increases interdigital cell death and causes ectopic cell death at the tip of digits (Crocoll et al., 2002; Rodriguez-Leon et al., 1999; data not shown). Using whole-mount staining with DHR, we observed that limbs treated with RA for 8 h showed increased ROS levels within the interdigital region and also at the tip of digits (Fig. 4). This increase in ROS correlated with a decrease in peroxidase activity, including the tip of digital areas. Therefore, as in intact limbs, low peroxidase activity is associated with high ROS levels and cell death in RA-treated limbs.

Gpx4 is responsible for most of the peroxidase activity in developing limbs

Several enzymes could be responsible for the observed peroxidase activity: any one belonging to the peroxidase groups and/or catalase (which, under certain conditions, can have peroxidase activity; LeHir et al., 1979). Catalase activity cannot be easily detected in situ, but a specific gel activity assay demonstrated significant levels of catalase activity during the S9 to S11 period (Fig. 5A). Some general but specific biochemical characteristics of peroxidases and catalases could allow us to determine which enzyme was responsible of the peroxidase activity detected in situ in whole developing limbs. For instance, different pH and hydroperoxide concentration are necessary to get the optimal activity of peroxidases or catalases. Peroxidases are active at acidic pH and low hydroperoxide concentration (1.5–50 mM); these enzymes are inactivated at high hydroperoxide concentration. On the other hand, catalase is active at basic pH, and the enzyme is not inhibited by high hydroperoxide concentration (up to 4 M) (Herzog and Fahimi,

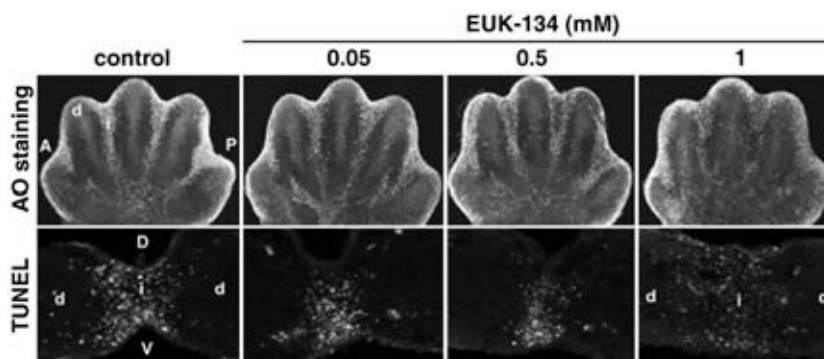


Fig. 2. Cell death upon autopod treatment with EUK-134. Limbs at S9 were cultured in the presence of increasing concentrations (0.05–1 mM) of the sod/catalase mimetic compound EUK-134. After 24 h in culture, cell death was evaluated by AO staining on whole limbs and TUNEL on transverse sections (see Materials and methods). Reduction in cell death (bright dots) was observed in the interdigital areas as EUK-134 concentration increased (in the case of AO staining, ventral view is shown). Note that accompanying the reduction in dying cells, interdigital regression was also reduced, in both disto-proximal (AO staining) and dorso-ventral axis (TUNEL). A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral; d, digit; i, interdigit.

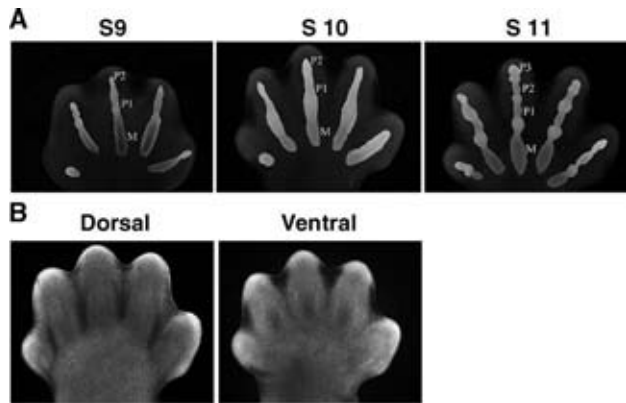


Fig. 3. Image analysis of peroxidase activity and cell death patterns during autopod development. (A) Peroxidase activity and cartilage condensations. Peroxidase activity patterns for S9–S11 stages were superimposed with the corresponding patterns of cartilage condensations as described in Materials and methods. Using phalanges (P1–P3) and metacarpals (M) as reference, note that down regulation of peroxidase activity in the interdigital areas followed a disto-proximal behavior (see text for details). (B) Dorso-ventral pattern of peroxidase activity. Picture shows the dorsal and ventral view of limbs stained for peroxidase activity at stage S10. Note that the ventral interdigital region devoid of peroxidase activity reached a more proximal region than the dorsal one. All limbs are oriented with the anterior side to the left.

1976). We found that the activity we detected corresponds to that of a peroxidase since DCF fluorescence in the presence of hydroperoxide was evident at pH 6.5, whereas at pH 8 and 10, it was undetectable (Fig. 5B). Furthermore, at low hydroperoxide concentration (5 and 50 mM), the activity was readily detected, whereas at 500 mM, it was undetectable (Fig. 5B).

There are three major families of peroxidases: the hemo-containing group (e.g., iodoperoxidase, lactoperoxidase, and myeloperoxidase), the peroxiredoxins, and the group that uses glutathione as reducing agent (Gpxs). There are four known seleno-cysteine Gpxs, all sensitive to mercaptosuccinate (MS) (Arthur, 2000; Chaudiere et al., 1984). In order to determine which peroxidase was responsible for the activity, we cultured autopods in the presence of different concentrations of MS (1 to

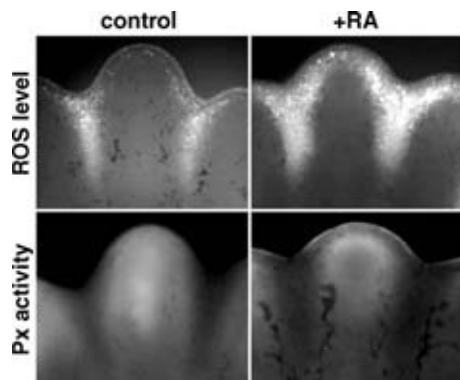


Fig. 4. Regulation of peroxidase activity and ROS level upon autopod treatment with retinoic acid. Limbs at S9 were treated with retinoic acid (RA) for 8 h and then stained either for ROS with DHR (upper panels) or for peroxidase activity with DCF (lower panels). In the presence of RA, an evident increase in ROS and a decrease in peroxidase activity are observed at tip of digits and within the interdigital area.

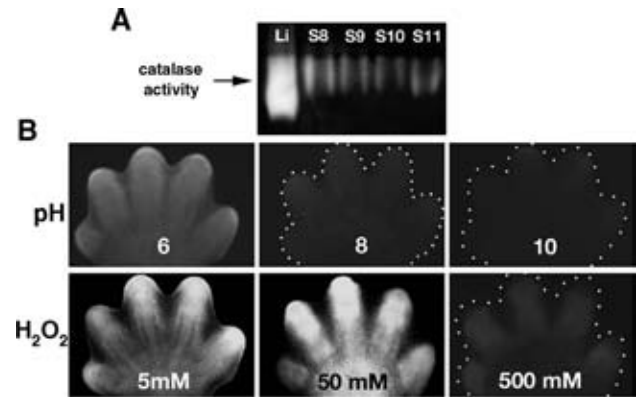


Fig. 5. Biochemical characterization of catalase and peroxidase activity of embryonic mouse autopods. (A) Catalase activity in the developing limb. Catalase specific zymography was performed using protein extracts from limbs at the stages indicated. Liver (Li), the organ with highest catalase activity, was used as a reference. Observe the significant catalase activity in the developing limbs tested. (B) Sensitivity of peroxidase activity to pH and hydrogen peroxide. Peroxidase activity was determined at different pH or at different peroxide concentration. Note that peroxidase activity was detected at an acidic pH and at a low peroxide concentration, conditions at which catalase is inactive and, in general, peroxidases are active.

200 mM) for 30 min and then determined peroxidase activity. Our results show a dose-dependent inhibition of the activity, which was completely abolished at 100 mM (Fig. 6A). When incubation was extended to 6 h, peroxidase activity was completely inhibited, even at concentrations as low as 1 mM of MS (Fig. 6B). With this experiment, we exclude the possibility that the activity detected was due to peroxidases from the hemo-family or the peroxiredoxins. Therefore, four criteria confirm that we were observing Gpx activity: the coupling of hydrogen peroxide metabolism with DCF oxidation, the optimal pH, the inhibition at high concentration of hydroperoxide, and the inhibition by MS.

To determine which of the four Gpxs was responsible for the activity observed, we performed a specific RT-PCR using RNA from 11 *dpc* mouse limbs; as a control for the different Gpxs, RNA from liver, intestine, kidney, and testis were used (data not shown). We observed expression of all of the Gpxs, but, interestingly, we found abundant *Gpx4* expression as compared with the other three genes coding for Gpxs (Fig. 7A).

Whole-mount in situ hybridization was used in order to detect the expression pattern of *Gpx4* in the whole mouse limb. We detected a strong expression of *Gpx4* in the digits, mainly at the tips (Fig. 7B). This pattern of expression corresponded to the peroxidase activity pattern. Expression of *Gpx3* was much lower and did not match the activity profile (data not shown). We did not perform in situ hybridization for *Gpx1* and *Gpx2* because they are hardly detectable by RT-PCR. Therefore, the results suggest that the activity we detected during limb development is due mainly to Gpx4.

Interestingly, although the peroxidase activity detected in whole limbs was not due to catalase (see also data below), the gene expression level (Fig. 8A) and pattern (Fig. 8B) of this enzyme were similar to those determined for Gpx4, being highest around digits and low in interdigital regions at the time

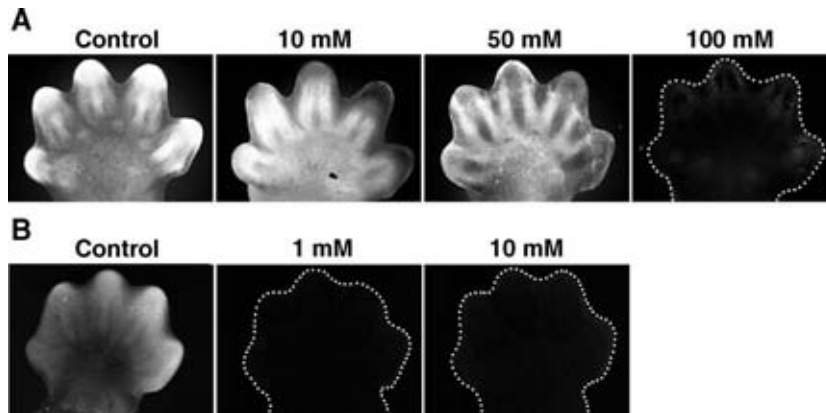


Fig. 6. Effect of mercaptosuccinate on the autopod peroxidase activity. Autopods were cultured in the presence of different concentrations (10–100 mM) of mercaptosuccinate (MS), an inhibitor of selenium-containing Gpxs, for 30 min (A) and for 6 h (B). Peroxidase activity was determined in the presence of the inhibitor. When incubation was carried out for 30 min, 100 mM MS was required for complete peroxidase activity inhibition, but 1 mM MS was sufficient for complete inhibition when incubation was for 6 h.

cell death is occurring (Fig. 8). In addition, the three genes encoding the three Sods known, *Sod1*, *Sod2*, and *Sod3*, also show significant expression level and similar expression pattern (Fig. 8). Thus, down-regulation of several antioxidant enzymes contributes to generate oxidative stress in the interdigital area.

Inhibition of Gpx activity induces an increase of apoptosis in the digits

If the Gpx activity modulates ROS levels, which in turn regulates apoptosis, we expected to affect the apoptosis pattern by inhibiting this peroxidase activity. With this aim, we cultured limbs for 24 h with MS and stained them afterwards with

acridine orange to visualize the apoptosis pattern. We found that apoptosis increased in a dose-dependent manner, specifically in the tips of digits, where peroxidase activity is inhibited (Fig. 9). These results suggest that peroxidase activity, likely due to Gpx4, could be involved in the down-regulation of ROS levels in the digits, therefore preventing the activation of the apoptotic process by ROS, normally occurring in the interdigits during autopod development.

Discussion

We previously showed that many embryonic regions with increased ROS levels coincide with apoptotic areas, including the interdigital regions of the developing limb (Salas-Vidal et al., 1998). In the limb, interdigital cell death can be reduced by chemical antioxidants such as phenol and dimethylsulfoxide. In the present work, we confirmed the presence of high ROS levels in interdigital areas and showed that an antioxidant with very low toxicity (EUK134, a sod/catalase mimetic; Jung et al., 2001; Rong et al., 1999) can prevent cell death. More important, our data suggest that Gpx4 is an essential antioxidant enzyme responsible for setting the ROS levels and, consequently, the cell death pattern in the autopod, supporting the critical contribution of oxidative stress in triggering interdigital cell death.

By definition, ROS are molecules that react with nearby cellular components (e.g., proteins, lipids, and DNA), resulting in damage that can affect their function. ROS include a number of chemically reactive molecules derived from oxygen. Among the major ROS are superoxide, nitric oxide, hydroxyl radical, hydroperoxide, and peroxynitrite. Some of these species can be produced by redox reactions between them. For instance, superoxide can generate hydroperoxide when reacts with water (reaction catalyzed by Sod), and peroxynitrite when it reacts with nitric oxide. Peroxide can produce the very reactive hydroxyl radical in the presence of reduced metal ions such as ferrous iron. Catalase and peroxidases catalyze the oxidation of hydroperoxide to produce water. Most cellular ROS are produced as by-products of oxygen metabolism (e.g., incomplete reduction of oxygen to water) and are highly toxic to cells.

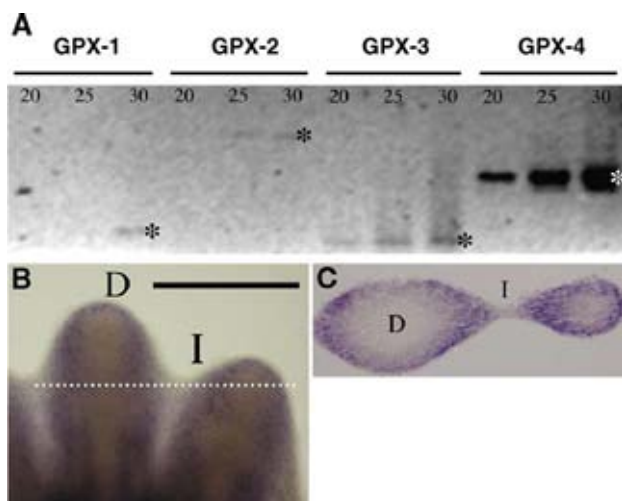


Fig. 7. *Gpx4* expression in the developing autopod. (A) RT-PCR analysis. An RT-PCR protocol was performed for each known seleno-cysteine Gpx using total mouse autopod RNA. Samples of the RT-PCR reaction were taken at the number of cycles indicated (20, 25, 30). The specific RT-PCR products (indicated by *) were obtained for the mRNAs of the four Gpxs, however, a much higher amount of the Gpx4 RT-PCR product was obtained. (B, C) In situ hybridization analysis. Whole-mount in situ hybridization for *Gpx4* was performed on S10 autopods. The expression of *Gpx4* was observed surrounding the digits. A section of the stained autopod shows in more detail the *Gpx4* expression pattern. D, digit; I, interdigit. Scale bar = 500 μ m.

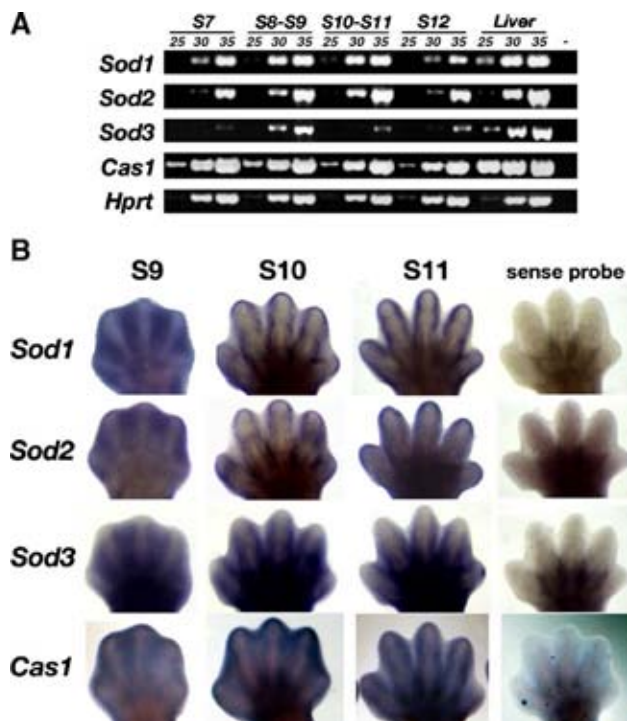


Fig. 8. Superoxide dismutases and catalase gene expression in the developing autopod. (A) RT-PCR analysis. An RT-PCR protocol was performed for each antioxidant enzyme indicated using total mouse autopod RNA. Samples of the RT-PCR reaction were taken at the number of cycles indicated (25, 30, 35). The specific RT-PCR products were obtained for the mRNAs of the enzymes tested (see Materials and methods). All *Sods* were expressed along limb development but, apparently, the *Cas1* was expressed at higher levels. (B) In situ hybridization analysis. Whole-mount in situ hybridization for the genes indicated was performed on S9-S12 autopods. Initially, expression was detected in all distal regions, but downregulation was evident at the time interdigital cell death appears; the latter event limited the expression around the digits.

When the level of ROS is relatively high, cells defend themselves by activating antioxidant and repair mechanisms. In the limb, the expression of several antioxidant enzymes in the distal region previous to the onset of interdigital cell death may reflect this defense response to the oxidative stress condition present in proliferating cells (Niswander et al., 1994). The presence of superoxide, hydroperoxide, or both is supported by the protective effect of the antioxidant sod/catalase mimetic used in the present work, resulting in similar phenotype (i.e., syndactyly) as we previously reported with other antioxidants that decrease cell death (Salas-Vidal et al., 1998). Relevant to mention is that, despite the presence of these ROS, mice homozygous for null alleles in the genes encoding the three *Sods* (Carlsson et al., 1995; Lebovitz et al., 1996; Reaume et al., 1996) and catalase (Ho et al., 2004; D. H.-G. and L. C., unpublished observations) are viable with no evident abnormal phenotype in limbs.

It was interesting to observe high peroxidase activity in the limb, which was complementary to the areas under oxidative stress. Initially, peroxidase activity was elevated in the distal region of the developing autopod and then, at the time cell death was detected in the interdigits, the activity was only observed in the digits. A common characteristic of peroxidases is that they

use an electron donor substrate to oxidize hydroperoxides. In order to detect peroxidase activity, we used two unspecific substrates that, when reduced in the presence of hydrogen peroxide, generate a fluorescent compound (DCF) or a precipitate (diaminobenzidine; not shown). Because these substrates are small, they could have access to the active site of different peroxidases and possibly also to that of catalase (LeHir et al., 1979). The specificity of our assay for peroxidases and not catalase is supported by the biochemical properties determined (i.e., hydroperoxide inhibiting concentration and pH).

All peroxidases can be grouped in three large families: the heme-peroxidases (Isaac and Dawson, 1999; O'Brien, 2000), peroxiredoxins (Rhee et al., 2001), and the Gpxs (Arthur, 2000). In contrast with heme-peroxidases that use a variety of substrates, peroxiredoxins and Gpxs typically use a specific substrate: thioredoxin (except peroxiredoxin VI) and glutathione. Thioredoxin and glutathione are major reducing agents within the cell, and it has been proposed that, under physiological conditions, the intracellular reducing environment of most cells is maintained by the disulfide/dithiol-reducing activity of the glutathione and thioredoxin systems. In agreement with the relevance of these compounds, peroxiredoxins and Gpxs are widely expressed in embryo and adult tissues (Arthur, 2000; Rhee et al., 2001). Nonetheless, the function of these enzymes is not always redundant since, for instance, mice carrying targeted deletions in the genes encoding thioredoxin (Matsui et al., 1996), γ -glutamylcysteine synthetase (rate-limiting enzyme in GSH biosynthesis; Shi et al., 2000), or Gpx4 (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003) die early in development. In the autopod, at the stage of digit individualization, Gpxs appear to be the relevant enzymes in charge of oxidizing hydroperoxides, since peroxidase activity is markedly reduced in the presence of MS, an inhibitor of selenium-containing Gpxs.

To date, at least four conserved selenium-containing Gpxs have been described which catalyze the reduction of peroxide and use glutathione as a co-factor (Arthur, 2000; Imai and Nakagawa, 2003). This family comprises Gpx1, a cytosolic peroxidase; Gpx2, a gut epithelium specific peroxidase; Gpx3, an extracellular peroxidase; and Gpx4, which is a major phospholipid hydroperoxide reducing enzyme. Although three out of the four Gpx genes were found expressed in the limb, the expression level of *Gpx4* was the highest and closely correlated with the peroxidase activity pattern determined.

Three isoforms have been reported for Gpx4 that result from alternative transcription initiation and splicing of the first exon

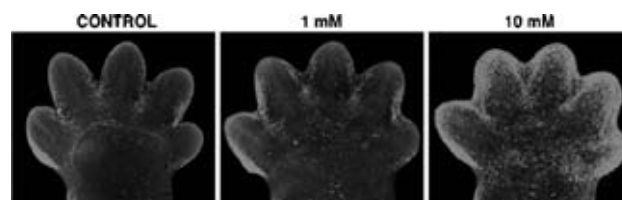


Fig. 9. Effect of seleno-cysteine Gpx activity inhibition on autopod cell survival. Autopods were cultured in the absence (Control) or presence of 1 mM or 10 mM MS for 24 h. After this period, autopods were stained with AO to detect cell death. Observe the MS dose-dependent increase in cell death. Scale bar = 500 μ m.

of a common gene (Imai and Nakagawa, 2003); they are located in different cellular compartments: cytosol, mitochondria, and nucleolus. In contrast to the other three Gpx that are active as tetramers, Gpx4 is active as a monomer. Gpx4 is the only Gpx able to directly reduce the peroxidized lipids produced in cell membranes. This property may be due to the small size of the active enzyme. In support of the essential role of Gpx4 in development, *Gpx4*^{-/-} embryos die around 7 dpc (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). In contrast, mice carrying null mutations in the genes encoding Gpx1, the major Gpx isoform expressed in most cell types, and Gpx2 apparently develop normally, are fertile, and only show ‘mild’ abnormalities during adult life (Esworthy et al., 2001; Ho et al., 1997).

We propose that Gpx4 provides at least one likely essential antioxidant activity that controls ROS level and cell death in the developing autopod. Other antioxidant enzymes contributing to this process are Sods, catalase (this work), and peroxiredoxin 1 (Shan et al., 2005), though none of these appear to be essential (Carlsson et al., 1995; Ho et al., 2004; Lebovitz et al., 1996; Reaume et al., 1996); D. H.-G. and L. C., unpublished observations). Lipid peroxidation is a common characteristic of cells under oxidative stress; high levels of peroxidized lipids can disrupt both the plasma membrane and membranes that are components of cellular organelles, such as the mitochondria, causing cell death (Keller and Mattson, 1998). In concordance with this proposal, several reports have stressed the relevance of Gpx4 in cell survival (Nomura et al., 2001). For instance, embryonic fibroblast cells derived from *Gpx4*^{-/+} mice are highly sensitive to oxidative insults (Yant et al., 2003). On the other hand, overexpression of the mitochondrial Gpx4, but not the cytosolic isoform, is able to reduce the appearance of typical markers of apoptosis like cytochrome *c* release, caspase activation, and DNA fragmentation in response to glucose deprivation and treatment with etoposide, staurosporine, UV irradiation, cycloheximide, and actinomycin D, stimuli that induce apoptosis by the intrinsic pathway (Nomura et al., 1999). Interestingly, this phenomenon was associated with the activity of the mitochondrial Gpx4 that appears to be responsible for the reduction of peroxidized cardiolipin (Nomura et al., 2000).

Oxidative stress in the autopod could be generated as a consequence of the high metabolism associated with the rapid growth occurring in its distal region (Niswander et al., 1994). Alternatively, enzymes that produce ROS such as NADPH oxidase could be activated in restricted regions in response to specific growth factors (Balaban et al., 2005; Kreuzer et al., 2003). The present work did not investigate the source of ROS but established that antioxidant enzymes, mainly Gpx4, modulate the ROS levels in specific areas of the autopod. Several molecules have been shown to participate in the control of cell death in the developing limbs. Among the most important are retinoic acid and members of the Tgfβ (e.g., Bmps) and Fgf (e.g., Fgf8) superfamilies (Zuzarte-Luis and Hurler, 2002). These factors could regulate directly or indirectly the production of ROS and/or the levels of antioxidant enzymes. In our study, we show that RA can cause cell death in digit tips, and this effect is associated with an increase in ROS level and peroxidase activity down-regulation. Therefore, in the limb, RA could promote cell

death by generating oxidative stress, perhaps by down-regulating *Gpx4* expression. Previous work from our group has shown that death of embryonic stem cells caused by RA correlates with increase in ROS levels and can be prevented by addition of antioxidants to the culture medium (Castro-Obregón and Covarrubias, 1996).

To warrant survival, a developing cell must finely tune the concentration of ROS by altering antioxidant activity in response to the continuous changes in ROS production during growth and differentiation. This ancient cell survival response probably was a target for the evolution of the signaling cascades that cause the cell death required for proper development of multicellular organisms. The present work supports this view and suggests that Gpx4 is at least one of the key enzymes in this regard.

Acknowledgments

We thank Elizabeth Mata, Sergio González, Graciela Cabeza, Xochitl Alvarado, and Concepción Valencia for their technical assistance, and Minerva Carcaño for her secretarial support. We are also grateful to Eric Arnoys and Michael K. Richardson for the careful reading of the manuscript and Dr. Tomomi Ookawara for the Sod3 plasmid. Eukarion, Inc. kindly provided the superoxide dismutase and catalase mimetics EUK-134. This work was supported by DGAPA (IN208697 and IN210600) and CONACyT (39930-Q).

References

- Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.I., Steller, H., 1993. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117, 29–43.
- Andersen, J.K., 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10, S18–S25 (Suppl.).
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1825–1835.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Baran, C.P., Zeigler, M.M., Tridandapani, S., Marsh, C.B., 2004. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr. Pharm. Des.* 10, 855–866.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A., 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* 125, 811–826.
- Brandes, R.P., Janiszewski, M., 2005. Direct detection of reactive oxygen species ex vivo. *Kidney Int.* 67, 1662–1664.
- Burow, S., Valet, G., 1987. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF). *Eur. J. Cell Biol.* 43, 128–133.
- Carlsson, L.M., Jonsson, J., Edlund, T., Marklund, S.L., 1995. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6264–6268.
- Castro-Obregón, S., Covarrubias, L., 1996. Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation. *FEBS Lett.* 381, 93–97.
- Chaudiere, J., Wilhelmson, E.C., Tappel, A.L., 1984. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J. Biol. Chem.* 259, 1043–1050.
- Clarke, P.G., 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181, 195–213.
- Crocoll, A., Herzer, U., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., Cato, A.C., 2002.

- Interdigital apoptosis and downregulation of BAG-1 expression in mouse autopods. *Mech. Dev.* 111, 149–152.
- Djavaheri-Mergny, M., Javelaud, D., Wietzerbin, J., Besancon, F., 2004. NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett.* 578, 111–115.
- Dupe, V., Ghyselinck, N.B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P.J., Chambon, P., Mark, M., 1999. Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev. Biol.* 208, 30–43.
- Eposito, F., Ammendola, R., Faraonio, R., Russo, T., Cimino, F., 2004. Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem. Res.* 29, 617–628.
- Esworthy, R.S., Aranda, R., Martin, M.G., Doroshov, J.H., Binder, S.W., Chu, F.F., 2001. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G848–G855.
- Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L., Johnson Jr., E.M., 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303–315.
- Herzog, V., Fahimi, H.D., 1976. Intracellular distinction between peroxidase and catalase in exocrine cells of rat lacrimal gland: a biochemical and cytochemical study. *Histochemistry* 46, 273–286.
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D., 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 16644–16651.
- Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., Ho, D.S., 2004. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem.* 279, 32804–32812.
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biol. Med.* 34, 145–169.
- Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., Kitamoto, T., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Nakagawa, Y., 2003. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 278–286.
- Isaac, I.S., Dawson, J.H., 1999. Haem iron-containing peroxidases. *Essays Biochem.* 34, 51–69.
- Jabs, T., 1999. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* 57, 231–245.
- Jung, C., Rong, Y., Doctrow, S., Baudry, M., Malfroy, B., Xu, Z., 2001. Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Neurosci. Lett.* 304, 157–160.
- Keller, J.N., Mattson, M.P., 1998. Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system. *Rev. Neurosci.* 9, 105–116.
- Kreuzer, J., Viedt, C., Brandes, R.P., Seeger, F., Rosenkranz, A.S., Sauer, H., Babich, A., Nurnberg, B., Kather, H., Krieger-Brauer, H.I., 2003. Platelet-derived growth factor activates production of reactive oxygen species by NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells through Gi1,2. *FASEB J.* 17, 38–40.
- Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright Jr., J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M.M., 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9782–9787.
- LeHir, M., Herzog, V., Fahimi, H.D., 1979. Cytochemical detection of catalase with 3,3'-diaminobenzidine. A quantitative reinvestigation of the optimal conditions. *Histochemistry* 64, 51–66.
- Manna, S.K., Zhang, H.J., Yan, T., Oberley, L.W., Aggarwal, B.B., 1998. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J. Biol. Chem.* 273, 13245–13254.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., Taketo, M.M., 1996. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179–185.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Martin, G., 1994. Function of FGF-4 in limb development. *Mol. Reprod. Dev.* 39, 83–88 (discussion 88–89).
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M., Nakagawa, Y., 1999. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 29294–29302.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T., Nakagawa, Y., 2000. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.* 351, 183–193.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Nakagawa, Y., 2001. Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Biol. Signals Recept.* 10, 81–92.
- O'Brien, P.J., 2000. Peroxidases. *Chem. Biol. Interact.* 129, 113–139.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown Jr., R.H., Scott, R.W., Snider, W.D., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43–47.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W., Kim, K., 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52, 35–41.
- Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Ganán, Y., Santesteban, E., Hurler, J.M., 1999. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat. Cell Biol.* 1, 125–126.
- Rong, Y., Doctrow, S.R., Tocco, G., Baudry, M., 1999. EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9897–9902.
- Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D., Covarrubias, L., 1998. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell Res.* 238, 136–147.
- Salas-Vidal, E., Valencia, C., Covarrubias, L., 2001. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev. Dyn.* 220, 295–306.
- Shan, S.W., Tang, M.K., Cai, D.Q., Chui, Y.L., Chow, P.H., Grotewold, L., Lee, K.K., 2005. Comparative proteomic analysis identifies protein disulfide isomerase and peroxiredoxin 1 as new players involved in embryonic interdigital cell death. *Dev. Dyn.* 233, 266–281.
- Shi, Z.Z., Osei-Frimpong, J., Kala, G., Kala, S.V., Barrios, R.J., Habib, G.M., Lukin, D.J., Danney, C.M., Matzuk, M.M., Lieberman, M.W., 2000. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5101–5106.
- Taketo, T., 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., Koseki, H., Fritsch, R., Christ, B., 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., Bryant, S.V., 1989. A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* 249, 41–49.
- Wilkinson, D.G., Nieto, M.A., 1993. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* 225, 361–373.
- Yant, L.J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J.G., Motta, L., Richardson, A., Prolla, T.A., 2003. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radical Biol. Med.* 34, 496–502.
- Zuzarte-Luis, V., Hurler, J.M., 2002. Programmed cell death in the developing limb. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 871–876.

available at www.sciencedirect.com
www.elsevier.com/locate/ycexr

Research Article

Cell death activation during cavitation of embryoid bodies is mediated by hydrogen peroxide

David Hernández-García, Susana Castro-Obregón, Sandra Gómez-López, Concepción Valencia, Luis Covarrubias*

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

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 1 December 2007

Revised version received

5 March 2008

Accepted 6 March 2008

Available online 20 March 2008

Keywords:

Oxidative stress

Reactive oxygen species

Apoptosis

Programmed cell death

Cavitation

Morphogenesis

ABSTRACT

The formation of the proamniotic cavity is the first indication of programmed cell death associated to a morphogenetic process in mammals. Although some growth factors have been implicated in proamniotic cavitation, very little is known about the intracellular mechanisms that control the cell death process itself. Reactive oxygen species (ROS) are potent activators of cell death, thus, in the present work we evaluated the role of ROS during the cavitation of embryoid bodies (EBs), a common model to study proamniotic cavitation. During cavitation, ROS concentration increases in the inner cells of EBs, and this ROS accumulation appears to be associated with the mitochondrial respiratory activity. In agreement with a role of ROS in cavitation, EBs derived from ES cells that overproduce catalase, an enzyme that specifically degrades hydrogen peroxide, do not cavitate, and caspase activation and cell death is markedly decreased. Notably, cell death, but not the rise in ROS, during EB cavitation is caspase-dependent. The apoptosis-inducing factor (Aif) is released from the mitochondria during cavitation, but EBs derived from *Aif*^{-/-} ES cells cavitate and ROS levels in the inner cells remain high. We conclude that hydrogen peroxide is a cell death activating signal essential for EB cavitation, suggesting that cell death during proamniotic cavitation is mediated by ROS.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Programmed cell death (PCD) is an essential process for the development of all multicellular organisms [1]. Morphogenesis is among the most important functions of PCD, in which cell death causes growth restriction or tissue degeneration. According to the cell morphology, several forms of cell death have been identified in developing organisms. Some of these show characteristics of apoptosis, whereas others resemble

autophagic cells. From the molecular point of view, caspases are relevant enzymes in the execution of apoptotic cell death [2], however, caspase-independent apoptotic cell death has also been detected [3].

The formation of the proamniotic cavity is the earliest identified occurrence of PCD associated to a morphogenetic process in mammals [4]. Shortly before implantation, the mouse embryo consists of an outer trophoderm layer surrounding a cavity (i.e., the blastocoele) and a small group of

* Corresponding author. Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología/UNAM, AP 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, Mexico. Fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: covs@ibt.unam.mx (L. Covarrubias).

Abbreviations: PCD, programmed cell death; ROS, reactive oxygen species; H₂O₂, hydrogen peroxide; Cat, catalase; Wt, wild-type; EB, embryoid body; ES, embryonic stem.

cells (i.e., the inner cell mass) separated from a layer of primitive endoderm by a basal lamina. The cavity forms after implantation by cell death occurring within the core of the inner cell mass of the blastocyst at the time the primitive ectoderm and endoderm differentiate. After cavitation (the time at which the mouse embryo reaches the egg cylinder stage), the ectoderm consists of a pseudostratified epithelium in close contact with the visceral endoderm, together surrounding the proamniotic cavity. PCD associated with cavitation appears to be regulated by the distribution of cells within the epiblast such that differentiating ectodermal cells in contact with the basal lamina survive. This process requires the proper differentiation of the primitive endoderm to the visceral endoderm and involves the participation of growth factors such as BMPs [5] and FGFs [6]. At the intracellular level, very little is known about the molecular regulation of cell death during cavitation. Caspases-3, -8, and -9, considered to be central in apoptotic cell death, do not appear to be essential for cavitation [7]. Bcl-2, and to a lesser extent Bcl_x, appear to participate in preventing the death of differentiated epiblast cells [8].

Reactive oxygen species (ROS) are potent activators of cell death [9]. Cell death can be promoted by exogenous ROS such as hydrogen peroxide (H₂O₂) [10], or by increasing the intracellular ROS levels by uncoupling the respiratory chain [11]. In addition, an increase in ROS levels correlates with activation of cell death by conditions such as growth factor deprivation or treatment with certain growth factors (e.g., TNF; [12]. In some instances, cell death has been prevented by treatment with antioxidants or expression of antioxidant enzymes [13–16]. The prevalent concept is that ROS have the ability to turn on one or several signalling pathways [17], however, in most cases the direct ROS targets that mediate cell death activation are unknown.

Most of what we know about the participation of ROS in cell death has come from studies in cultured cells, and in animals displaying a pathological condition or carrying a mutation in a gene coding for an antioxidant enzyme. Some years ago we showed that mouse embryo regions with high density of dying cells also display high ROS concentration [18–20]. In some instances, we demonstrated that cell death can be reduced by treatment with antioxidants. Using EBs as a model of proamniotic cavitation, here we demonstrate that an increase in ROS is required for cell death and consequently for cavitation. Our data suggest that H₂O₂ activates a mostly caspase-dependent and AIF-independent cell death process. Therefore, the earliest morphogenetic process involving cell death, the formation of the proamniotic cavity, possibly requires H₂O₂ as an essential inducer of cell death.

Materials and methods

Construction of catalase expression vectors

The pCat⁺ vector was made by fusing the cDNA encoding the human catalase from the pCAT10 vector (American Type Culture Collection) to the cytomegalovirus (CMV)/chicken β -actin (CBA) hybrid promoter (from pCCALL), and the bovine growth hormone polyadenylation signal (from

pGKneo) and all were inserted in the pBluescript II KS. The cytosolic form of catalase (Cat^c) was produced by substituting the lysine codon of the peroxisomal signal sequence (KANL; [21]) located at the carboxy-end of wild-type catalase for the amber stop codon. Briefly, we generated a 465 bp PCR fragment using 5'TACCTGTGAAGTGTCCCTACCG3' and 5'CACAGATCTGCCACTCCATGGCCG3' as primers, and pCAT10 as template. The SspI–BglII restriction fragment from the PCR product was used to replace the corresponding 3' fragment of human catalase in pCat^c. In both constructs, we added the Neo resistance cassette from the pGKNeoloxPB (a gift of Dr. Yuji Mishina). For overexpression of Sod1-EGFP (encoding the superoxide dismutase-enhanced green fluorescent fusion protein), the CMV promoter in the pcDNA3-EGFP-SOD1 vector (gift of Dr. Takanori Yokota) was replaced by the CMV/CBA promoter.

Cell culture

The AB2.2 ES cell line was maintained on a mitomycin-treated STO feeder cell layer in M15 medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 15% FBS, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 80 μ M penicillin and 34 μ M streptomycin). Cell cultures were maintained at 37 °C in a humid 5% CO₂–95% air environment. For the different treatments performed the cells were seeded onto 24 well plates for 12 h (2 \times 10⁵ cells per well). Menadione sodium bisulfate, staurosporine, paraquat and H₂O₂ (Sigma) were added, and 24 h later the viability was measured by trypan blue exclusion and flow cytometry using propidium iodide (Sigma) staining. When needed, 100 μ M of zVAD-fmk (Biomol) was present 2 h before and during the drug treatment. For embryoid body formation, 1 \times 10⁷ ES cells were seeded in a 100 mm culture dish without a feeder layer, 72 h later (D3) the colonies formed were gently detached by pipetting several times, and transferred to non-adherent conditions (in bacteriological dishes) for further culture (from D3+1 to D3+7); M15 medium was replenished every 48 h. 0.5 mM H₂O₂, 0.5–2 μ M EUK134 (Eukarion, Inc.) or 10 μ M of q^{VD} (Kamiya Biomedical Co.) were added during this latter culture phase. ROS were detected indirectly by dihydroethidium (HE; Molecular Probes) staining; samples were incubated in 65 nM HE/PBS for 30 min at 37 °C, then washed and cells fixed with 4% paraformaldehyde. Areas with high ROS levels in EBs were visualized on 10 μ m cryostat slices, using confocal microscopy at 488/LP560 nm excitation/emission, respectively. For histological analysis, EBs were fixed as above, dehydrated, embedded in LR-White Resin (Electron Microscopy Science), and 1 μ m ultramicrotome slices of these were stained with toluidine blue.

Catalase activity

ES cells were sonicated in extraction buffer (200 mM HEPES, 1 mM DTT, 0.1 mM desferal mesylate and 1 mM PMSF) and centrifuged at 16,000 RFC. Protein from cell extracts (150 μ g as determined by the Bradford assay) were loaded in each well of non-denaturing polyacrylamide gels; gels were run at 150 V for 2.5 h. Immediately after electrophoresis, bands of catalase activity were detected following the procedure

reported by Navarro et. al [22], without sample boiling, and without β -mercaptoethanol. The gel was briefly soaked in 5% (v/v) methanol, and after rinsing with tap water, was incubated for 10 min in 10 mM H_2O_2 . For staining, the gel was incubated in a 1:1 mixture of freshly prepared 2% potassium ferric cyanide and 2% ferric chloride. Staining was stopped by soaking the gel in 10% acetic acid and 5% methanol solution.

Immunostaining

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min or 1 h for EBs at room temperature, and then washed 3 times with PBS. Immunocytochemistry using standard protocols was performed with polyclonal antibodies against human catalase (Calbiochem), AIF (Santa Cruz Biotechnology) and active caspase 3 (Promega). Cells and cryostat sections of tissue-tek embedded EBs were permeabilized using 1% Triton X-100 in PBS, blocked with 10% sheep serum (SS), 0.2% Triton X-100/PBS, incubated with the primary antibody diluted in SS/PBS for 2 h, washed in PBS, and incubated with anti-IgG Alexafluor-488 nm secondary antibody diluted in SS/PBS for 20 min. Finally, confocal microscopy images were captured for further analysis.

Results

Catalase overproduction reduces the cell death caused by H_2O_2

Proamniotic cavitation is difficult to study *in vivo*. Most of our knowledge of this process has come from studying embryoid bodies: structures derived from aggregation of ES cells in non-adherent conditions [23,24]. Embryoid body development reflects the process of formation of visceral endoderm, columnar epithelial ectoderm and proamniotic cavity [25]. Therefore, in order to test the role of ROS in the cell death associated with cavitation, we first engineered ES cells to overexpress an antioxidant enzyme. We selected catalase for our studies because: (a) unlike all members of the peroxidase family, catalase is an enzyme with the capacity to degrade H_2O_2 without requiring any additional substrate [26]; (b) no product of the enzymatic reaction is a ROS or a free radical, therefore, there is no possibility oxidative stress is generated due to enzyme overexpression, as it could happen when superoxide dismutase is overexpressed [27,28]; (c) by eliminating H_2O_2 , other very reactive ROS are also eliminated such as the hydroxyl radical; and (d) catalase activity is not very sensitive to inhibition by high H_2O_2 concentration as many peroxidases are [29], therefore, it may uphold greater antioxidant capacity upon oxidative stress. Two expression vectors were constructed (Fig. 1A), each carrying the sequence encoding different catalase forms under the control of a constitutive promoter that functions well in ES cells (CMV/CBA; [30]). The first contains the wild-type human catalase (Cat^P), which is normally located within peroxisomes. The second contains a truncated form of catalase (Cat^C) which lacks the last four carboxy-terminal amino acids required to target the enzyme to the peroxisome [21] and is, therefore, expected to be located in the cytoplasm. After electroporation with the two constructs, we selected six out of 60 lines, three for each construct, that displayed the highest amount of catalase

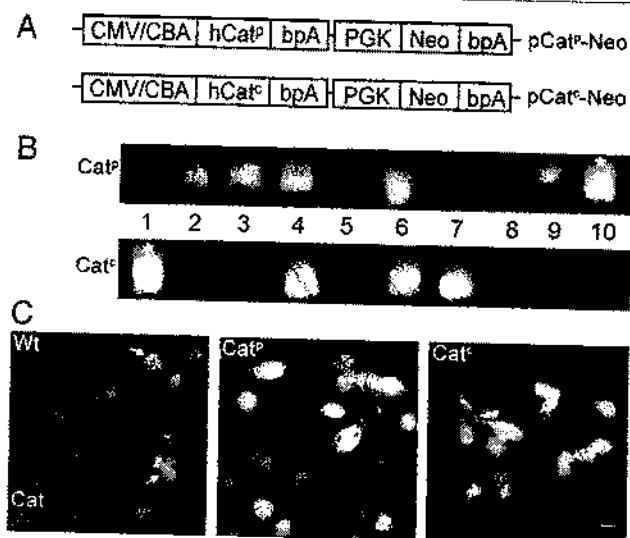


Fig. 1 – Over-production of catalase in ES cells. (A) Catalase expression vectors. Two vectors were constructed: one encodes the wild-type human catalase (Cat^P), whereas the other encodes a human catalase that lacks the peroxisome targeting signal (Cat^C). Expression of both catalase encoding sequences is directed by the constitutively active fused promoter CMV-CBA. (B) Catalase activity in transfected ES cells. ES cells were electroporated with p Cat^P -Neo or p Cat^C -Neo and screened by catalase activity in a non-denaturing gel. Pictures show the band of catalase activity of 10 lines for each construct. We selected clones ES- Cat^P -10, -14, and -20 and ES- Cat^C -1, -15, and -24 for further analysis; lane 10 in Cat^P and lane 1 in Cat^C (indicated by asterisks) show activity of clones ES- Cat^P -10 and ES- Cat^C -1, respectively. (C) Intracellular location of catalase in ES-Wt, ES- Cat^P -10 and ES- Cat^C -1 cells. Catalase (green) was detected by immunocytochemistry and nuclei (red) were stained with propidium iodide. Catalase in wild-type cells showed a punctate pattern, which may be due to its regular peroxisomal location. In contrast, cells overexpressing either Cat^P or Cat^C showed a diffuse pattern suggesting that most of them is located in the cytoplasm. Bar = 10 μ m.

activity (Fig. 1B). These lines were named ES- Cat^P -10, -14, and -20 and ES- Cat^C -1, -15, and -24. Endogenous catalase activity in ES-Wt cells was not detected under the conditions tested; however, catalase mRNA could be detected by RT-PCR (data not shown). This observation was confirmed by immunocytochemistry showing a punctate pattern expected for the peroxisomal distribution of endogenous catalase (Fig. 1C, left panel). Intracellular distribution of overexpressed catalase in both ES- Cat^P (Fig. 1C, center panel) and ES- Cat^C (Fig. 1C, right panel) lines showed a diffuse pattern indicating that a large amount of recombinant protein is located in the cytosolic compartment.

ES cells overexpressing catalase were exposed to different conditions that cause death of this cell type. In ES-Wt cells, efficient cell death occurred with H_2O_2 , menadione, staurosporine (Fig. 2 and Supplementary Material Fig. 9) and after serum deprivation (not shown). However, only death caused

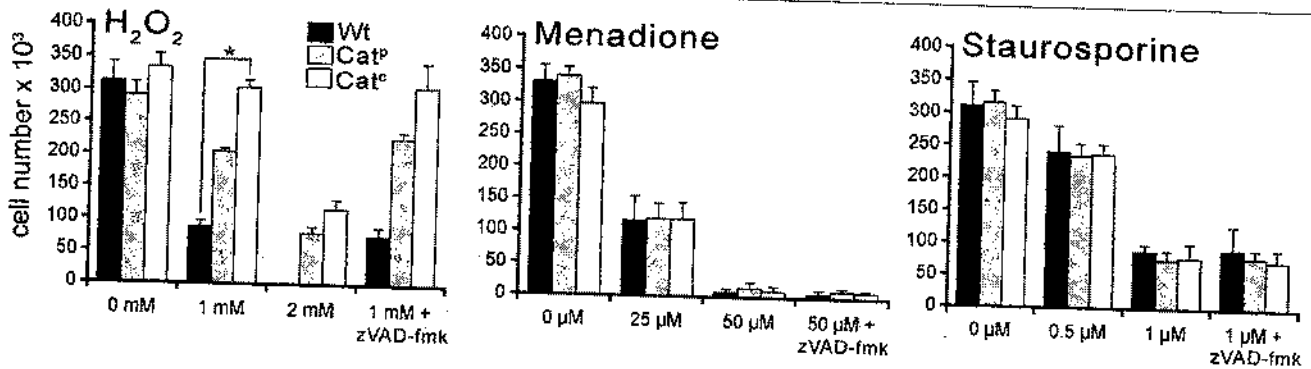


Fig. 2 – Survival of ES cells overproducing catalase in response to H₂O₂ and other death inducers. ES-Wt, ES-Cat^p-10 and ES-Cat^c-1 cells were seeded at a density 1×10^5 cells/cm² and the following day cultured for 24 h under the conditions indicated. Viability was determined by trypan blue exclusion or by flow cytometry using propidium iodide staining (Supplementary Material Fig. 9). Note that catalase was only protected from death induced by H₂O₂. * $P < 0.001$ ($n=6$).

by treatment with H₂O₂ was prevented by overexpression of catalase (Fig. 2, H₂O₂). Interestingly, zVAD, a broad-spectrum caspase inhibitor, did not inhibit cell death in any of the conditions tested, including the death of catalase-overexpressing cells when treated with menadione or staurosporine (Fig. 2 and Supplementary Material Fig. 9). Therefore, H₂O₂ can kill ES cells by a caspase-independent mechanism.

It was surprising that catalase did not reduce the cell death caused by the addition of menadione, since this compound, by uncoupling the respiratory chain, promotes the production of H₂O₂ and in many instances causes cell death [31,32]. In concordance with this mechanism of action, menadione and paraquat (another uncoupler of the respiratory chain) indeed generated oxidative stress in ES cells as determined by DHE staining (Fig. 3, Wt-Paraquat, Wt-Menadione), and this increase in ROS was largely reduced by catalase overexpression (Fig. 3, ES-Cat^c) as well as by the superoxide dismutase-catalase mimetic (Fig. 3, EUK134). Therefore, these compounds are able to kill ES cells by a mechanism independent of ROS production, confirming that catalase can only block cell death associated with H₂O₂ production.

Cavitation of embryoid bodies is reduced by overexpression of catalase

Embryoid bodies derived from ES-Wt, ES-Cat^p and ES-Cat^c (three lines for each construct) were generated and cavitation was evaluated at different EB developmental stages (Fig. 4). ES-Wt cells formed EBs that displayed an obvious cavity and columnar ectoderm at D3+5 stage, and by D3+7 most EBs were cystic (Fig. 4). In contrast EBs derived from ES-Cat^p and ES-Cat^c cells showed reduced cavitation and few cystic EBs were found at D3+7 stage of development (Fig. 4). This effect was more prominent with the cytosolic form of catalase in which case most EBs did not cavitate (Fig. 4). At the moment, it is unclear whether this is due to the amount of enzyme produced or to its intracellular localization. It is important to mention that ectoderm and visceral endoderm differentiation appears to occur normally in EBs derived from both ES-Cat^p and ES-Cat^c cells, since Fgf5 and Bmp2 were expressed at the same level as in Wt EBs (Supplementary Material Fig. 10); columnar epithelium was particularly evident in the few areas where cavitation was

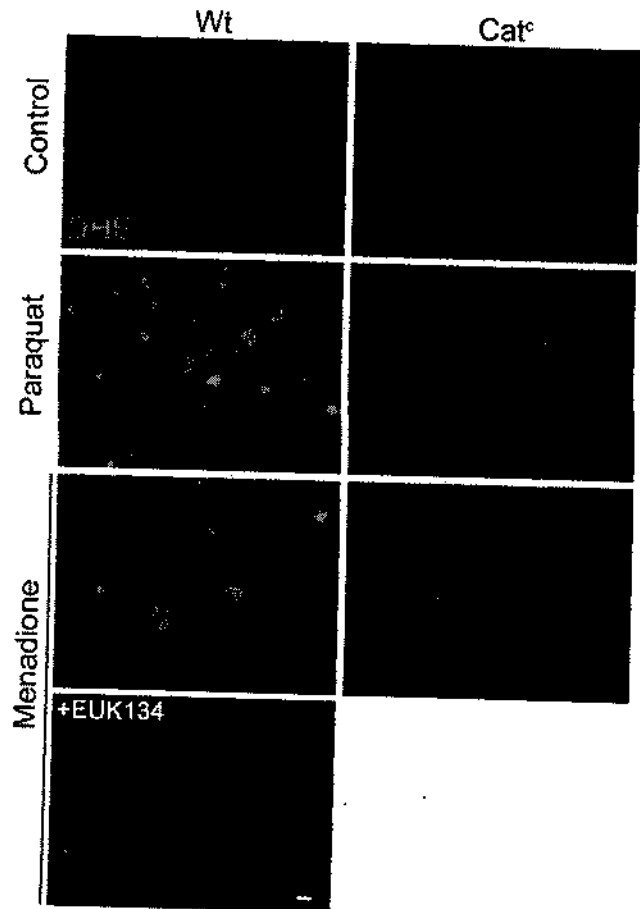


Fig. 3 – Antioxidant activity of catalase and EUK134 on ES treated with paraquat and menadione. ES-Wt and ES-Cat^c-1 cells were seeded at a density of 1.25×10^5 cells/cm² and the following day cultured for 6 h in the presence or absence of paraquat (0.8 mM) or menadione (50 μM); EUK134 (1.5 μM) was added 1 h before pro-oxidants. ROS were detected by staining with DHE. The oxidized DHE (bright signal in pictures) was detected in ES-Wt cells but not in ES-Cat^c-1 or ES-Wt treated with EUK134. Bar = 20 μm.

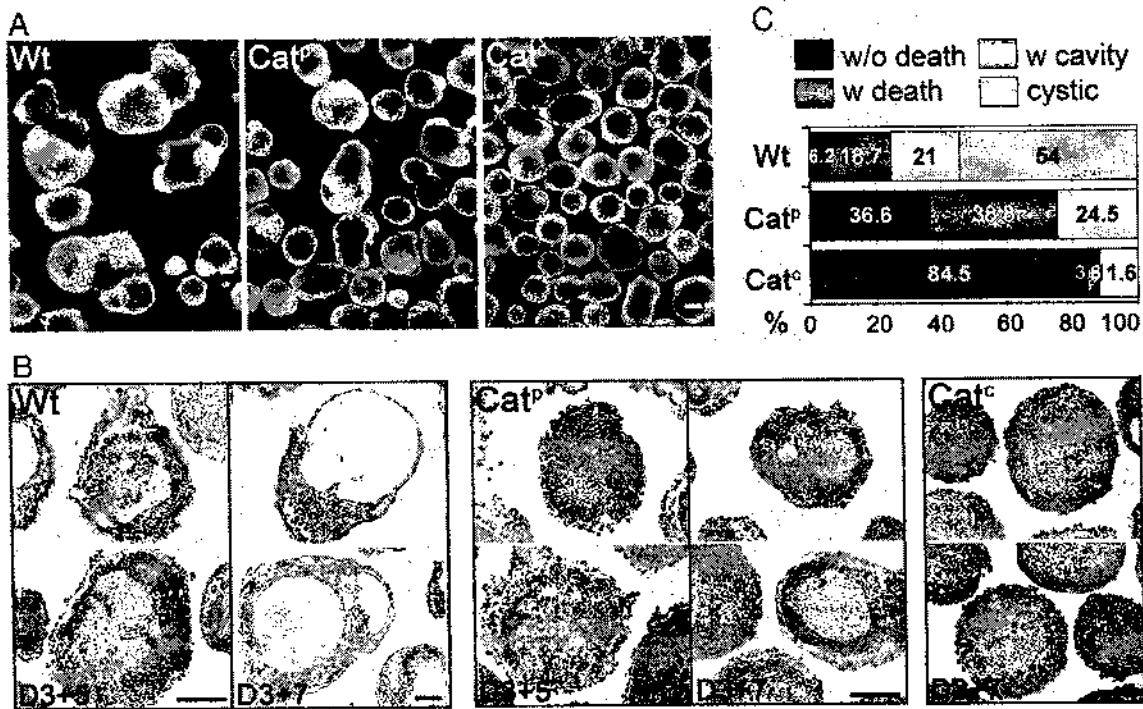


Fig. 4 – Cavitation of EBs from ES cells overproducing catalase. EBs were derived from ES-Cat^C-1, ES-Cat^P-10 or ES-Wt, and cavity formation visualized at different developmental stages by light transmission microscopy directly (A; D3+7) or in 1 μ m EB slices after staining with toluidine blue (B). Representative pictures are shown. Progress of cavity formation at D3+7 was estimated by quantifying the percentage of non-cavitated EBs without (w/o death) or with abundant cell death (w death; nuclear dark toluidine blue staining), EBs with an evident cavity (w cavity), and cystic EBs (C). Observe the ectodermal columnar epithelium (asterisks in pictures) in cavitated EBs. Most EBs from ES-Wt were cystic, whereas EBs from ES-Cat^C cells rarely cavitated and became cystic. Development of EBs from ES-Cat^P appeared delayed, resulting in some cavitated and few cystic EBs at D3+7. Apparent ectoderm can be distinguished in some non-cavitated EBs (asterisks). Bar = 100 μ m.

perceptible (Fig. 4B, asterisks). As with Wt EBs, most EBs expressing Cat^P or Cat^C were surrounded by the typical visceral endoderm (Fig. 4B). Furthermore, using specific differentiation protocols, these EBs could derive into neurons with similar efficiency as Wt EBs, and beating cardiocytes could be observed (data not shown).

That ROS are necessary for proper cavitation was confirmed by using the superoxide dismutase-catalase mimetic EUK134. This compound is permeable to cells and has very low toxicity [33]. Addition of EUK134 to the culture medium during development of EBs from ES-Wt resulted in a decrease in cell death and a less evident cavity at D3+5 (Fig. 5, Wt+EUK134). Interestingly, addition of H₂O₂ during Cat^C EB development increased death of inner cells and partially rescued cavitation (Fig. 5, Cat^C+H₂O₂), whereas this same treatment on Wt EBs accelerated cavitation (Fig. 5, Wt+H₂O₂). From these latter results, it seems that oxidative stress is generated in all cells of the EB, but ectodermal cells are protected through an anti-oxidant mechanism.

To assess whether the ROS involved in EB development is specifically H₂O₂, we derived EBs from ES cells overexpressing superoxide dismutase 1 (Supplementary Material Fig. 11). As with catalase, cells expressing the highest Sod1 activity were selected. In this case, although EBs were smaller and apparently the process proceeded slightly slower than in EBs from ES-Wt, cavitation occurred.

The previous data suggest that the cell death associated with cavitation is caused by an increase in H₂O₂ concentration. In agreement with this possibility, ROS concentration increased in the inner cells of EBs at the time cell death and cavitation occurred (D3+3; Fig. 6A). The mitochondria are considered the major source of ROS. In order to determine whether the high ROS levels detected during cavitation are derived from the respiratory chain, we inhibited complex I with rotenone at the time we detected the rise in ROS concentration (Fig. 6B). EBs treated with rotenone showed no DHE staining, suggesting that complex I is the source of ROS during cavitation. In agreement with this conclusion, inhibition of NADPH oxidases, another important source of ROS, with diphenyleneiodonium chloride (DPI; [34]) caused little or no effect on ROS levels associated with inner embryoid body cells (Supplementary Material Fig. 12).

Cell death during EB cavitation is caspase-dependent

Null mutants in genes encoding initiator and executioner caspases do not appear to affect cavitation (i.e., early embryos are viable). However, as previously reported [7], we detected active caspase 3 in inner cells, some of which showed condensed chromatin (Fig. 7A). Since it is possible that redundancy among different caspases exists during cavitation, we decided to inhibit caspase activity with q^{VD}, a broad-spectrum

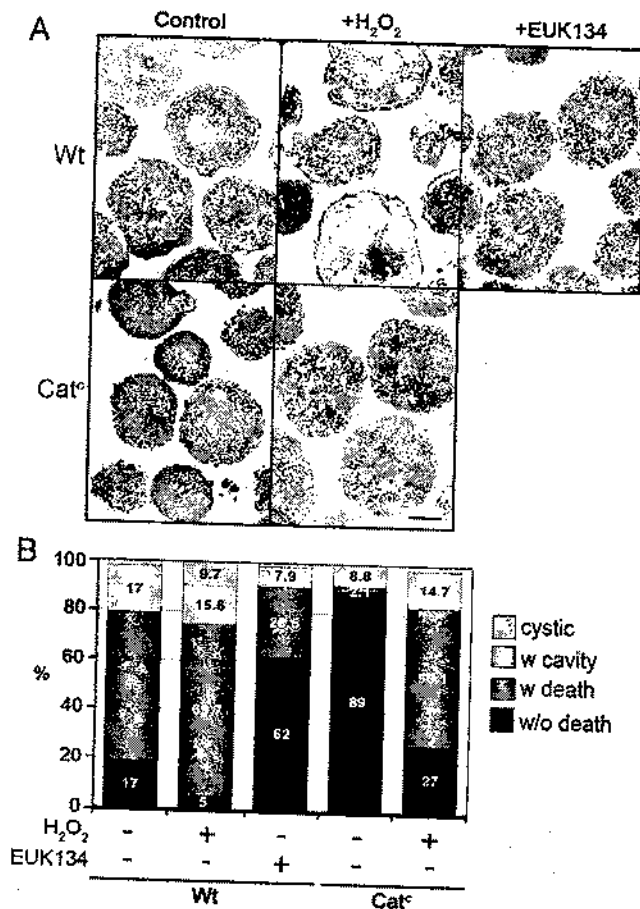


Fig. 5 – Antioxidant and H₂O₂ effects on EB cavitation. EBs from ES-Wt or ES-Cat^c cells were treated with H₂O₂ or with the antioxidant EUK134. Semi-thin slices of EBs at D3+5 were stained with toluidine blue (A). Cavitation and cell death were evaluated as described in Fig. 4 (B). Observe that H₂O₂ accelerated cavitation in Wt EBs, whereas partly rescued cavitation (i.e., increased death of inner cells—darker nuclei, arrowheads) in Cat^c EBs. On the contrary, EUK134 reduced cell death and cavitation. Bar = 100 μ m.

caspase inhibitor more specific and less toxic than zVAD [35]. q^{VD} efficiently blocked caspase 3 activation (Fig. 7A, +q^{VD}), and reduced cell death and EB cavitation (Fig. 7B). Therefore, cell death during cavitation appears to be mostly caspase-dependent, but contribution of a caspase-independent pathway cannot be discarded.

In agreement with an essential role of H₂O₂ in the cell death associated to cavitation, caspase 3 was not activated in EBs derived from ES-Cat^c (Fig. 7A, Cat^c). Interestingly, high ROS level in the inner cells of EBs was not affected by treatment with q^{VD} (Fig. 7C), thus the rise in ROS is not a consequence of caspase activation.

H₂O₂ cause AIF release during embryoid body cavitation

AIF is a mitochondrial protein that apparently needs to be released into the cytosol and translocated into the nucleus in order to induce cell death [36]. We tested whether AIF is

released in response to H₂O₂. As seen in Fig. 8A, AIF is released in response to H₂O₂ in ES-Wt cells but not in ES-Cat^c cells. Accordingly, inner cells of Wt EBs translocated AIF to the nucleus, but those of EBs overexpressing catalase did not (Fig. 8B). Interestingly, caspase inhibition did not affect AIF translocation (Fig. 8B), suggesting that AIF is released in response to the increase in H₂O₂ and not to the caspase activation occurring during EB cavitation.

Since EBs derived from ES cells lacking AIF can cavitate (Fig. 8C and [37]), AIF-mediated cell death is clearly not essential for cavitation. However, AIF still could affect the level of ROS during cavitation because, apart from its AIF function in cell death, this protein appears to have a broader role in the regulation of the respiratory chain [38,39]. This was not the case, given that EBs derived from ES cells lacking AIF produced similar levels of ROS as EBs derived from ES-Wt cells (Fig. 8D).

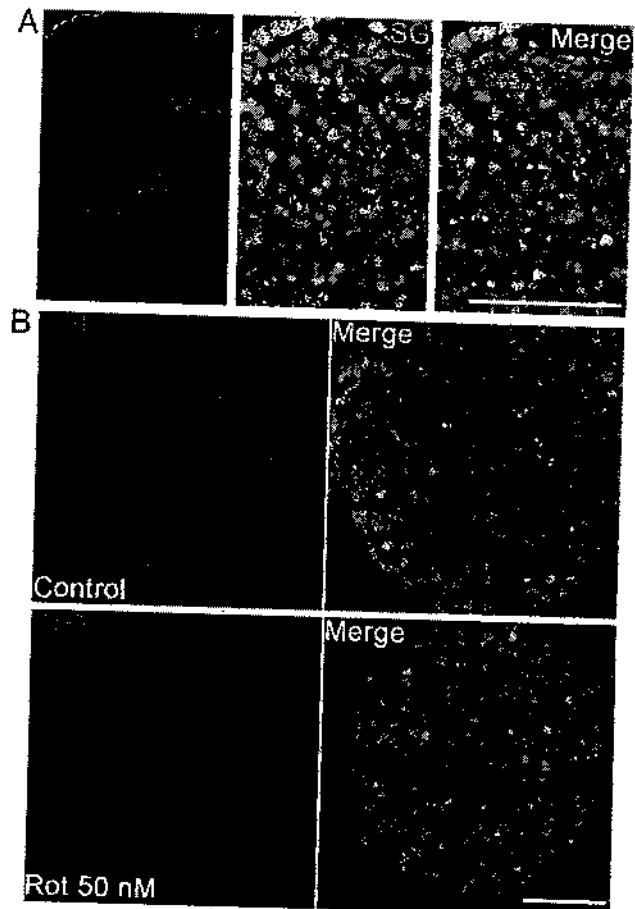


Fig. 6 – ROS level in EBs. EBs were formed under regular conditions up to D3+3 stage (A) or in the same conditions but treated with 50 nM of rotenone (Rot) for 6 h at the end of culture (B). EBs were stained in fresh with dihydroethidium (DHE) and after sectioning with SytoxGreen (SG) to detect ROS and to visualize nuclei, respectively. DHE staining was mostly observed in inner cells and rotenone caused an evident decrease in this staining. Bar = 50 μ m.

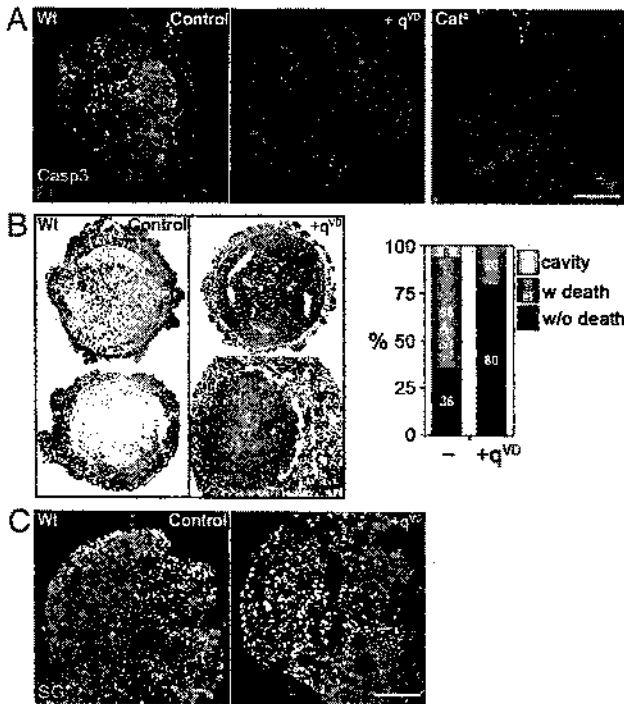


Fig. 7 – Caspase activation and function during EB cavitation. Active caspase 3 (green) was detected by immunocytochemistry in Wt EBs in the absence or presence of q^{VD} as well as in EBs overexpressing catalase; nuclei (red) were stained with propidium iodide (A). On the other hand, cell death and cavitation (B) or ROS levels (C) in q^{VD} -treated EBs were determined by toluidine blue staining (dark blue nuclei) on semi-thin slices or DHE staining, respectively (see also Supplementary Material Fig. 13). Note that q^{VD} reduced the levels of active caspase 3, cell death and cavitation, but not ROS amount in EB inner cells. Catalase overexpression decreased caspase activity to undetectable levels as q^{VD} . Bar = 50 μ m.

This result is in agreement with the requirement of ROS but not of AIF in the process of cavitation.

Discussion

Proamniotic cavitation is the earliest morphogenetic process that requires cell death to occur; in the absence of cavitation, the ectoderm would not organize properly and the embryo would die just after implantation. Despite the crucial role of cavitation, very little is known about the signals that trigger cell death. Some factors have been identified as relevant for epiblast survival during cavitation, but no molecule has been found to be indispensable in the cell death process. Here, we focused on determining the participation of ROS in this essential cell death process.

Role of ROS and caspases in cavitation

Since catalase is mainly located in peroxisomes, in order to remove H_2O_2 from most intracellular sources we expanded the

distribution of the overexpressed enzyme. ES cells overexpressing Cat^P showed catalase distributed within all the cytosol though, unexpectedly, Cat^P was also found in the cytosol. The low mRNA levels of catalase detected by PCR (data not shown) and the lack of catalase activity determined in our assay (Fig. 1) may indicate that ES cells hold few peroxisomes. Therefore, it is possible that the large amount of Cat^P produced in overexpressing cells saturated the peroxisome import system leaving most of it in the cytosol. In any case, for our studies, both types of cell lines were useful to determine the role of H_2O_2 in cavitation and cell death.

It was interesting to observe that overexpressed catalase only protected cells from death induced by H_2O_2 . Staurosporine, although known as a general cell death inducer with the ability to cause an increase in ROS [40], appeared to induce ES cell death by an oxidative stress-independent

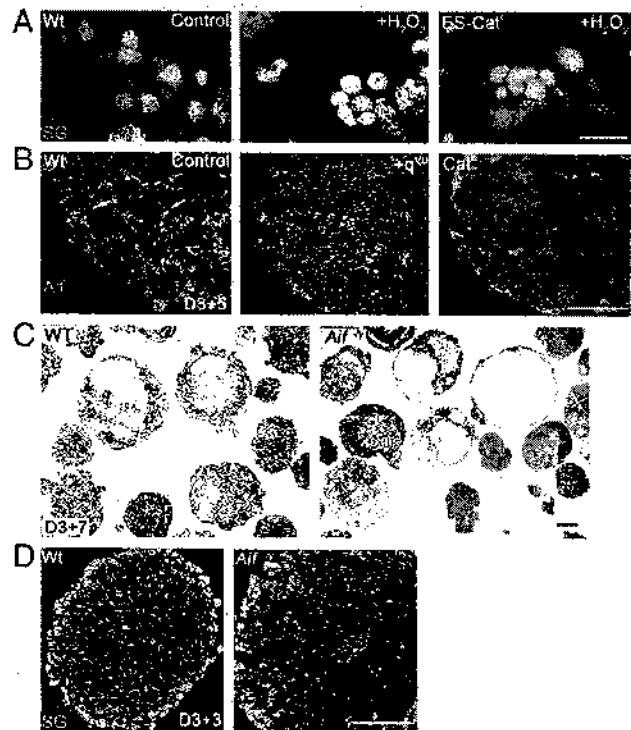


Fig. 8 – AIF release and function during EB cavitation. (A) ES cells were cultured in the absence or presence of H_2O_2 for 24 h, and then AIF (red) was detected by immunocytochemistry and nuclei (green) were stained with SytoxGreen. AIF was translocated into the nucleus upon H_2O_2 treatment (yellow) in ES-Wt but not in ES- Cat^P cells (scale bar, 25 μ m). (B) AIF was found in the nucleus of inner cells of cavitating EBs, which are under oxidative stress. Translocation was not seen in EBs overexpressing catalase, and could not be prevented by caspase inhibition; nuclei (red) were stained with propidium iodide (scale bar 100 μ m). (C) EBs derived from Wt or $Aif^{-/-}$ null ES cells were harvested at D3+7 and semi-thin slices were analyzed after toluidine blue staining (see also Supplementary Material Fig. 12). Many $Aif^{-/-}$ EBs cavitated to a similar extent as Wt (scale bar 100 μ m). (D) EBs derived from Wt or $Aif^{-/-}$ null ES cells were stained at D3+3 with DHE (red); nuclei (green) were stained with SytoxGreen. ROS level in inner cells was similar in cavitating EBs derived from Wt or $Aif^{-/-}$ null ES cells.

mechanism as has been reported by others [41,42]. To our surprise, catalase could not protect cells from death caused by paraquat or menadione, two compounds that increase ROS by uncoupling the respiratory chain [31,32]. However, the fact that catalase and the antioxidant EUK134 could efficiently reduce the ROS increase caused by these agents, indicates that additional targets exist for these compounds that when bound can kill the cells without promoting increments in ROS. Other groups have reported similar observations [43]. Together these results, on one hand, support the specificity of catalase and, on the other, suggest that increase in H_2O_2 concentration is not a common way to kill ES cells. In conclusion catalase overexpression is very efficient at removing and consequently protecting from death when H_2O_2 is at high concentration.

We observed that ROS level increases in the inner cells of the EB at the time these cells are dying. Thus increments in ROS concentration could trigger the cell death required for EB cavitation. The fact that EBs derived from ES cells overexpressing catalase did not cavitate suggests that an increase in ROS levels is causal for the cell death and consequently for cavitation. Superoxide dismutase overexpression had a mild effect on EB development, showing slow growth and slightly retarded cavitation. Thus, the ROS involved must be mainly H_2O_2 since catalase but not superoxide dismutase could prevent cavitation. H_2O_2 is by itself not very reactive, consequently, its presence is usually estimated indirectly by detecting some of its derivatives (e.g., hydroxyl radical). Dihydroethidium is oxidized by hydroxyl and superoxide radicals to ethidium that fluoresces when bound to DNA [44]. Therefore, the hydroxyl radical could be a ROS derived from H_2O_2 causing cell death during EB cavitation.

Our data suggest that the main source of ROS during cavitation is the respiratory chain in the mitochondria. However, in the adult, it has been demonstrated that NADPH oxidases are an important source of ROS [34,45]. Some Nox genes, encoding the catalytic subunit of NADPH oxidases, are expressed during embryo development [46], but their role in ROS production is unknown. Nox4 is expressed in the embryoid body at the time cavitation initiates (D3+4; [46]), but an inhibitor of NADPH oxidases caused little or no effect on ROS levels. Thus, the contribution of NADPH oxidases to the production of ROS during mouse embryo development remains to be determined. It is interesting to mention that continuous treatment with high concentrations of DPI (> 1 μ M), caused ectopic ROS production and growth of EBs was markedly reduced (data not shown); under this condition cavitation did not occur. This is also observed in chronic treatments with rotenone [47], and partly in EBs derived from ES cells overexpressing Sod1 (our own observation). Therefore, normal growth appears necessary for cavitation. Importantly, growth was not affected in EBs overexpressing catalase.

Death of ES cells caused by H_2O_2 appears to be caspase-independent. In addition, we have been unable to reduce the death caused by staurosporine or paraquat with the general caspase inhibitor zVAD. Nonetheless, it has been shown that caspases are required to kill ES cells in response to several stimuli such as sorbitol, adriamycin, UV-irradiation and γ -irradiation [48,49]. It is important to note that although caspases are activated in response to H_2O_2 , generation of ROS does not require caspases to kill ES cells.

Therefore, it seems that H_2O_2 can turn on alternative death mechanisms, such that when one is inactive, the other can still continue the cell degeneration process. ROS could be a signal with the ability to activate different death pathways as we proposed earlier [20].

Proamniotic cavitation can occur in the absence of Apaf1, caspase 9 or caspase 3 activity, essential components of the intrinsic apoptotic pathway. However, redundancy among different caspases could cover the essential role of these enzymes in cavitation. In agreement with the participation of caspases in inner ectodermal cell death, caspase 3 is activated during EB cavitation (this report). In addition, using a broad-spectrum caspase inhibitor, we show here that caspase activation is relevant for the death occurring during cavitation. Interestingly, ROS level remained high in the absence of caspase activity, but when ROS were depleted by catalase overexpression, caspase 3 activity was abolished. Therefore, H_2O_2 is an essential inducer of the caspase-dependent cell death occurring during cavitation.

Although caspase inhibition significantly reduced apoptotic cell death, cavitation could still partly occur in this condition. AIF is a molecule capable of activating cell death in the absence of caspase activation. AIF is translocated into the nucleus during cavitation (this report and [7]), a process considered essential for its apoptotic activity. In agreement with a role in cell death, AIF is not translocated in EBs from ES-Cat^c cells. However, EBs from AIF-null ES cells cavitate to a similar extent as EBs from ES-Wt cells ([37] and our own observations). Our data suggest that AIF translocation to the nucleus depends on the rise in ROS levels, but in contrast to caspase activation, this event is not decisive in promoting most of the cell death observed during cavitation. On the other hand, AIF is also a regulator of the respiratory chain and consequently could affect the ROS production from the mitochondria [38,39]. However, inner cells of EBs from AIF-null ES cells produce similar levels of ROS. Thus, although AIF participation in EB cavitation cannot be ruled-out completely [47], its contribution appears to be minimal. Of note it is that, as ROS increase, AIF translocation still occurs when caspases are inhibited. We propose that H_2O_2 is the main signal that initiates death of embryonic ectoderm inner cells resulting in the proamniotic cavity.

Control of ROS levels and cell death during cavitation

Proamniotic/embryoid body cavitation has been proposed to result from cell death and selective cell survival. Several lines of evidence indicate that visceral endoderm differentiation is required for proper cavitation [6]. Visceral endoderm may be the source of death signals either directly or by inducing the embryonic ectoderm to produce those signals [4]. Candidate death signals have been proposed to be BMP2/BMP4 [5], although direct evidence has not been provided. On the other hand, survival of embryonic ectoderm is associated with its interaction with the basal lamina [4,50], and might be mediated by the serum response factor (Srf), and its target genes Bcl2 and Bclx_L [8]. Under this scheme, death signals would act on all epiblast cells but only cells interacting with the basal lamina would survive. Based on this same scheme, we propose that ROS levels increase in all epiblast cells, but antioxidant mechanisms, likely activated by interaction with

basal lamina, avoid the generation of oxidative stress and consequent death of embryonic ectodermal cells. Srf could be a downstream gene in this antioxidant response.

There are two mechanisms that can result in an increase in ROS levels during cavitation. One would be related to an increase in ROS production that should be associated to an up-regulation in the activity of ROS producing enzymes such as NADPH oxidases. The other possibility is that ROS are produced passively but antioxidant mechanisms are downregulated. Our data support this latter possibility since cavitation of *Ca^v* EBs can be restored by treatment with H₂O₂ without affecting the ectoderm. Catalase could be the antioxidant enzyme required for cell survival, since its expression is restricted to the surviving ectoderm after cavitation (D. H.-G. and L. C., unpublished data). Nonetheless, we knocked out the catalase gene (*Cas*) and null embryos were viable and born at the expected ratio (D. H.-G., S. C.-O. and L. C., unpublished data). Thus catalase is not essential but other antioxidant enzymes could play a role in preventing oxidative stress in ectodermal cells. It is interesting that embryos unable to synthesize glutathione (due to lack of the γ -glutamylcysteine synthetase) and those deficient in thioredoxin, two common antioxidants and essential substrates of glutathione peroxidases and peroxiredoxins, respectively, die just after implantation and fail to gastrulate [51,52]. Thus, downregulation of those two antioxidants could be the cause of elevation in ROS concentration during cavitation.

It is well accepted that redox control is critical for cell survival and disrupting the redox state could cause degenerative diseases [53]. We propose that differential regulation of the redox state (as a result of extracellular signals) has evolved as a natural mechanism to control essential developmental processes such as morphogenetic cell death. According to the present report, proamniotic cavitation is the earliest developmental process in the mouse in which this regulation appears to be essential.

Acknowledgments

We want to thank Dr. Yuji Mishina and Dr. Takanori Yokota for the gift of PGKNeoloxpB and pcDNA3-EGFP-SOD1 plasmids, Dr. Josef Penninger and Dr. Gail Martin for their Aif null ES cell lines, Dr. Christopher Wood for the careful reading of the manuscript, and Andrés Saralegui for his technical assistance. This work was supported by CONACyT (grant #39930) and DGPA-UNAM (grant # IN218607).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.005.

REFERENCES

- [1] P.G. Clarke, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat. Embryol.* 181 (1990) 195–213.
- [2] D.L. Vaux, S.J. Korsmeyer, Cell death in development, *Cell* 96 (1999) 245–254.
- [3] G. Kroemer, S.J. Martin, Caspase-independent cell death, *Nat. Med.* 11 (2005) 725–730.
- [4] E. Coucouvanis, G.R. Martin, Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo, *Cell* 83 (1995) 279–287.
- [5] E. Coucouvanis, G.R. Martin, BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo, *Development* 126 (1999) 535–546.
- [6] M. Esner, J. Pachernik, A. Hampf, P. Dvorak, Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies, *Int. J. Dev. Biol.* 46 (2002) 817–825.
- [7] N. Joza, S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, H.Y. Cheng, L. Ravagnan, K.F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, J.M. Penninger, Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, *Nature* 410 (2001) 549–554.
- [8] G. Schratz, U. Philippar, D. Hockemeyer, H. Schwarz, S. Alberti, A. Nordheim, SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development, *EMBO J.* 23 (2004) 1834–1844.
- [9] S. Ueda, H. Masutani, H. Nakamura, T. Tanaka, M. Ueno, J. Yodoi, Redox control of cell death, *Antioxid. Redox Signal.* 4 (2002) 405–414.
- [10] Y.J. Lee, H.N. Cho, J.W. Soh, G.J. Jhon, C.K. Cho, H.Y. Chung, S. Bae, S.J. Lee, Y.S. Lee, Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation, *Exp. Cell Res.* 291 (2003) 251–266.
- [11] T.A. Seaton, J.M. Cooper, A.H. Schapira, Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors, *Brain Res.* 777 (1997) 110–118.
- [12] V. Moreno-Manzano, Y. Ishikawa, J. Lucio-Cazana, M. Kitamura, Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of rat mesangial cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 12684–12691.
- [13] K. Nomura, H. Imai, T. Koumura, M. Arai, Y. Nakagawa, Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29294–29302.
- [14] L.J. Greenlund, T.L. Deckwerth, E.M. Johnson Jr., Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death, *Neuron* 14 (1995) 303–315.
- [15] J. Bai, A.M. Rodriguez, J.A. Melendez, A.I. Cederbaum, Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26217–26224.
- [16] Y. Manevich, A.B. Fisher, Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 1422–1432.
- [17] T. Finkel, Reactive oxygen species and signal transduction, *IUBMB Life* 52 (2001) 3–6.
- [18] E. Salas-Vidal, H. Lomeli, S. Castro-Obregon, R. Cuervo, D. Escalante-Alcalde, L. Covarrubias, Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death, *Exp. Cell Res.* 238 (1998) 136–147.
- [19] D. Schnabel, E. Salas-Vidal, V. Narvaez, R. Sanchez-Carbente Mdel, D. Hernandez-Garcia, R. Cuervo, L. Covarrubias, Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death, *Dev. Biol.* 291 (2006) 291–299.
- [20] M.R. Sanchez-Carbente, S. Castro-Obregon, L. Covarrubias, V. Narvaez, Motoneuronal death during spinal cord

- development is mediated by oxidative stress, *Cell Death Differ.* 12 (2005) 279-291.
- [21] R.N. Trelease, W. Xie, M.S. Lee, R.T. Mullen, Rat liver catalase is sorted to peroxisomes by its C-terminal tripeptide Ala-Asn-Leu, not by the internal Ser-Lys-Leu motif, *Eur. J. Cell Biol.* 71 (1996) 248-258.
- [22] R.E. Navarro, M.A. Stringer, W. Hansberg, W.E. Timberlake, J. Aguirre, catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase, *Curr. Genet.* 29 (1996) 352-359.
- [23] G.R. Martin, L.M. Wiley, I. Damjanov, The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells, *Dev. Biol.* 61 (1977) 230-244.
- [24] I. Desbaillets, U. Ziegler, P. Groscurth, M. Gassmann, Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis, *Exp. Physiol.* 85 (2000) 645-651.
- [25] G.M. Keller, In vitro differentiation of embryonic stem cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 862-869.
- [26] A. Deisseroth, A.L. Dounce, Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role, *Physiol. Rev.* 50 (1970) 319-375.
- [27] Y. Takada, M. Hachiya, S.H. Park, Y. Osawa, T. Ozawa, M. Akashi, Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance, *Mol. Cancer Res.* 1 (2002) 137-146.
- [28] H.J. Fullerton, J.S. Ditelberg, S.F. Chen, D.P. Sarco, P.H. Chan, C.J. Epstein, D.M. Ferriero, Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia, *Ann. Neurol.* 44 (1998) 357-364.
- [29] S. Mueller, H.D. Riedel, W. Stremmel, Determination of catalase activity at physiological hydrogen peroxide concentrations, *Anal. Biochem.* 245 (1997) 55-60.
- [30] A.K. Hadjantonakis, M. Certsenstein, M. Ikawa, M. Okabe, A. Nagy, Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells, *Mech. Dev.* 76 (1998) 79-90.
- [31] T.J. Chiou, S.T. Chu, W.F. Tzeng, Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation, *Toxicology* 191 (2003) 77-88.
- [32] I. Laux, A. Nel, Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways, *Clin. Immunol.* 101 (2001) 335-344.
- [33] Y. Rong, S.R. Doctrow, G. Tocco, M. Baudry, EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 9897-9902.
- [34] K. Bedard, K.H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 245-313.
- [35] D. Chauvier, S. Ankri, C. Charriaut-Marlangue, R. Casimir, E. Jacotot, Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ.* 14 (2007) 387-391.
- [36] E. Daugas, S.A. Susin, N. Zamzami, K.F. Ferri, T. Innopoulou, N. Larochette, M.C. Prevost, B. Leber, D. Andrews, J. Penninger, G. Kroemer, Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis, *FASEB J.* 14 (2000) 729-739.
- [37] D. Brown, B.D. Yu, N. Joza, P. Benit, J. Meneses, M. Firpo, P. Rustin, J.M. Penninger, G.R. Martin, Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 9918-9923.
- [38] N. Modjtahedi, F. Giordanetto, F. Madeo, G. Kroemer, Apoptosis-inducing factor: vital and lethal, *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 264-272.
- [39] N. Vahsen, C. Cande, J.J. Briere, P. Benit, N. Joza, N. Larochette, P.G. Mastroberardino, M.O. Pequignot, N. Casares, V. Lazar, O. Feraud, N. Debili, S. Wissing, S. Engelhardt, F. Madeo, M. Piacentini, J.M. Penninger, H. Schagger, P. Rustin, G. Kroemer, AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation, *EMBO J.* 23 (2004) 4679-4689.
- [40] I. Kruman, Q. Guo, M.P. Mattson, Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells, *J. Neurosci. Res.* 51 (1998) 293-308.
- [41] M.D. Jacobson, M.C. Raff, Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen, *Nature* 374 (1995) 814-816.
- [42] G.G. Chen, F.L. Sin, B.C. Leung, H.K. Ng, W.S. Poon, Differential role of hydrogen peroxide and staurosporine in induction of cell death in glioblastoma cells lacking DNA-dependent protein kinase, *Apoptosis* 10 (2005) 185-192.
- [43] G.K. Scott, C. Atsriku, P. Kaminker, J. Held, B. Gibson, M.A. Baldwin, C.C. Benz, Vitamin K3 (menadione)-induced oncosis associated with keratin 8 phosphorylation and histone H3 arylation, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 606-615.
- [44] Y. Posen, V. Kalchenko, R. Seger, A. Brandis, A. Scherz, Y. Salomon, Manipulation of redox signaling in mammalian cells enabled by controlled photogeneration of reactive oxygen species, *J. Cell. Sci.* 118 (2005) 1957-1969.
- [45] J.D. Lambeth, T. Kawahara, B. Diebold, Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 319-331.
- [46] J. Li, M. Stouffs, L. Serrander, B. Banfi, E. Bettiol, Y. Charnay, K. Steger, K.H. Krause, M.E. Jaconi, The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation, *Mol. Biol. Cell.* 17 (2006) 3978-3988.
- [47] O. Feraud, N. Debili, J.M. Penninger, G. Kroemer, Cavitation of embryoid bodies requires optimal oxidative phosphorylation and AIF, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 385-387.
- [48] R. Hakem, A. Hakem, G.S. Duncan, J.T. Henderson, M. Woo, M.S. Soengas, A. Elia, J.L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S.A. Kaufman, S.W. Lowe, J.M. Penninger, T.W. Mak, Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo, *Cell* 94 (1998) 339-352.
- [49] M. Woo, R. Hakem, M.S. Soengas, G.S. Duncan, A. Shahinian, D. Kagi, A. Hakem, M. McCurrach, W. Khoo, S.A. Kaufman, G. Senaldi, T. Howard, S.W. Lowe, T.W. Mak, Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes, *Genes Dev.* 12 (1998) 806-819.
- [50] P. Murray, D. Edgar, Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 1215-1221.
- [51] M. Matsui, M. Oshima, H. Oshima, K. Takaku, T. Maruyama, J. Yodoi, M.M. Taketo, Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene, *Dev. Biol.* 178 (1996) 179-185.
- [52] Z.Z. Shi, J. Osei-Frimpong, G. Kala, S.V. Kala, R.J. Barrios, G.M. Habib, D.J. Lukin, C.M. Danney, M.M. Matzuk, M.W. Lieberman, Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 5101-5106.
- [53] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3 (2004) 205-214.



Review

Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?

Luis Covarrubias*, David Hernández-García, Denhí Schnabel, Enrique Salas-Vidal, Susana Castro-Obregón

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication 14 September 2007

Revised 25 April 2008

Accepted 30 April 2008

Available online 11 May 2008

Keywords:

Reactive oxygen species
Superoxide
Hydrogen peroxide
Oxidative stress
Antioxidants
Redox regulation
Signal transduction
Proliferation
Differentiation
Apoptosis
Programmed cell death
Morphogenesis
Development

ABSTRACT

Oxidative stress is considered causal of aging and pathological cell death, however, very little is known about its function in the natural processes that support the formation of an organism. It is generally thought that cells must continuously protect themselves from the possible damage caused by reactive oxygen species (ROS) (passive ROS function). However, presently, ROS are recognized as physiologically relevant molecules that mediate cell responses to a variety of stimuli, and the activities of several molecules, some developmentally relevant, are directly or indirectly regulated by oxidative stress (active ROS function). Here we review recent data that are suggestive of specific ROS functions during development of animals, particularly mammals.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The evolution of chlorophyll-containing cyanobacteria ~2.5 billion years ago provoked radical changes in the composition of our planet's atmosphere. Carbon dioxide concentrations fell as oxygen concentrations rose, and rapidly the inhabitants of this changing environment evolved to exploit this new resource. Yet while essential for energy generation, incorporating oxygen into metabolic processes had side-effects, namely, the production of reactive by-products that damage the very molecules required for life. Under these circumstances, mechanisms to protect organisms from oxidative damage or to repair the damage caused by oxygen evolved. And remarkably, apart from simply seeking to minimize and reduce their damaging effects, organisms adapted and evolved to exploit these 'harmful' molecules in myriad biological processes. This is most evident and widely-studied in 'adult' organisms, however this review will focus on the role of such oxygen derivatives in the developmental phases leading to adulthood.

Control of ROS levels and generation of oxidative stress

Reactive oxygen species (ROS) is a generic name given to a variety of molecules and free radicals derived from molecular oxygen. The reduction of oxygen produces relatively stable intermediates. One electron-reduction produces superoxide anion, which is the precursor of most ROS. As most commonly used, ROS in this review refer to superoxide, hydrogen peroxide and their derivatives such as the hydroxyl radical. However, other special ROS with biological effects exist. Nitric oxide, for example, is a short-lived molecule with a free electron that regulates many physiological functions by itself, some of which are associated with development (Kuzin et al., 1996; Regulski et al., 2004). Hydrogen peroxide is not as reactive as the hydroxyl radical yet the latter is readily generated when the former is in the presence of Fe^{3+} (Fenton reaction). Superoxide is also not very reactive but can react with nitric oxide to produce the very potent oxidant peroxynitrite (Estevez et al., 1998). Singlet oxygen, an electronically excited form of oxygen, is very reactive and produces clear effects on cells (Klotz et al., 2003), but its biological relevance waits for more *in vivo* studies.

ROS production

ROS are formed as unavoidable by-products of aerobic respiration and various other catabolic and anabolic processes (Halliwell, 1991) (Fig. 1). For example, the respiratory chain produces essentially super-

* Corresponding author. Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología/UNAM, AP 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: covs@ibt.unam.mx (L. Covarrubias).

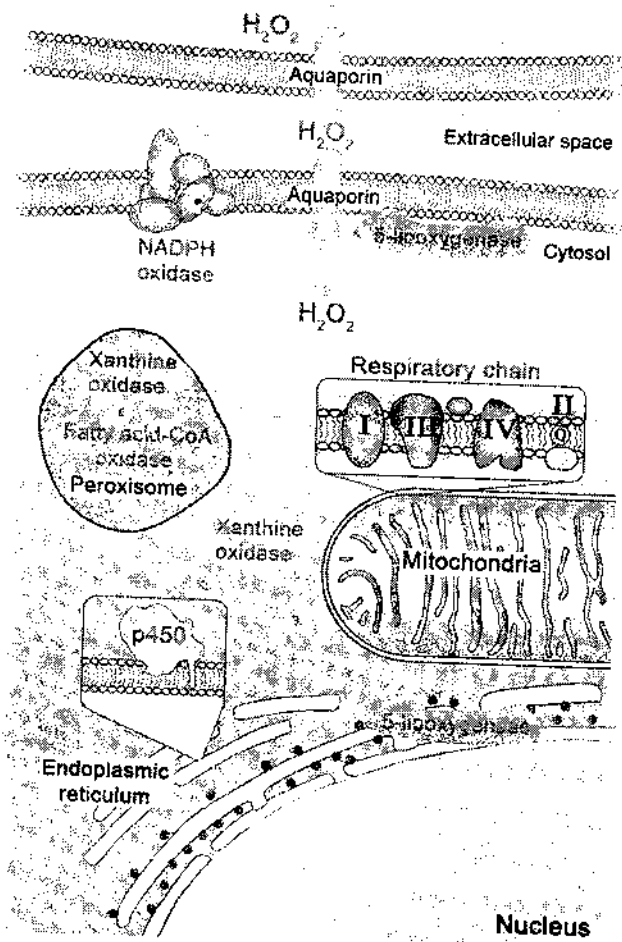


Fig. 1. Places in the cell where ROS are produced. Major organelles that are known to be sources of ROS are depicted. The activity of the respiratory chain in the mitochondria is responsible of most ROS produced in aerobiosis. On the other hand, the metabolic pathway that drives the degradation of long chain fatty acids (i.e., β -oxidation) in the peroxisome is also an important ROS source, though the amount produced depends on the activity of this metabolic pathway, a property that is cell-type specific. The function of ROS produced by cytochrome p450 or NADPH oxidases may be restricted to the area where they are located. Specific cytochrome p450 are involved in the synthesis and degradation of steroid hormones and retinoic acid, relevant molecules in development. Peroxisomal or cytosolic xanthine oxidase is an enzyme that produces ROS from molecular oxygen, whose best-characterized function is in the final catabolism of purines. 5-lipoxygenase, an enzyme involved in the synthesis of leukotrienes, can be found associated with membranes or with the nuclear envelope. ROS can also function as paracrine signals, as hydrogen peroxide can cross from one cell to another through aquaporins.

oxide that can be converted to peroxide by superoxide dismutases (Turrens, 2003). Among the enzymes that produce ROS by-products are (Fig. 1): fatty acyl-CoA oxidase, xanthine oxidase, cytochrome p450 systems, cyclooxygenases and lipoxygenases (Wanders and Waterham, 2006; Soberman and Christmas, 2003). ROS are directly produced from oxygen by NADPH oxidases, a major family of enzymes whose catalytic subunits are encoded by *Nox1–5* and *Duox1–2* (Lambeth, 2004). Although this activity was initially detected during phagocytosis, it is now known that these enzymes are broadly distributed among many tissues (Lambeth, 2004). Interestingly, Nox enzymes are almost exclusive to multicellular organisms (Lalucque and Silar, 2003).

Due to the high reactivity of some ROS, the location where they are produced is critical for their biological effects (Fig. 1). Nonetheless, although it is common to think that ROS are cell autonomous signals produced within the affected cell, there are examples in which ROS holding low reactivity, such as hydrogen peroxide, appear

to mediate intercellular communication. Paracrine communication could result when ROS are released from normal (i.e., myofibroblasts) or apoptotic cells and affect neighboring cells (Pletjushkina et al., 2005; Waghray et al., 2005). It is frequently considered that hydrogen peroxide diffuses freely through biological membranes; however, its water-like electrostatic characteristics suggest a limited simple passive diffusion. Recently, it was found that specific aquaporins, initially described as water channels that are present in all living cells, facilitate hydrogen peroxide diffusion across cell membranes (Bienert et al., 2007) (Fig. 1). Diffusion of hydrogen peroxide also plays a role in the autocrine signaling mediated by NADPH oxidases (Fig. 1). The diffusibility of ROS is a property that may contribute to determine the redox state of a community of cells or the propagation of ROS signals, mechanisms that could coordinate developmental events such as massive cell death.

ROS elimination

Levels of ROS are not only determined by production, but also by the rate of ROS degradation or inactivation. In general terms, the ultimate effect of antioxidants is to decrease the amount of active ROS. Cells have many ways to respond against ROS, including enzymatic and non-enzymatic antioxidants. It is the balance between the production and degradation of ROS that maintains the cellular homeostasis.

Common non-enzymatic antioxidants are glutathione and thioredoxin (Holmgren et al., 2005; Wu et al., 2004). Glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine; GSH) synthesis is catalyzed by the sequential action of γ -glutamylcysteine synthetase and GSH synthetase (Lu, 1999). Once GSH is oxidized (GSSG), the reduced form can be regenerated by the GSH reductase (Gr). The balance between GSH and GSSG is a way to determine the redox state within the cell. On the other hand, thioredoxins (Trx), as well as glutaredoxins (Grx), are small proteins containing an active site with a redox-active disulfide (Holmgren et al., 2005). These proteins maintain a reduced intracellular redox state in mammalian cells by the reduction of protein thiols. Two Trx and three Trx reductases (TrxR) are present in mammals, each with a distinct intracellular location (Nakamura, 2005). Trx1 and TrxR1 are cytosolic or nuclear proteins, whereas Trx2 and TrxR2 are targeted to the mitochondria. Of the two Grx present in mammals, Grx2 appears to be in mitochondria and the nucleus (Lundberg et al., 2001).

Antioxidant enzymes act in concert to remove various ROS produced by free radical reactions. Superoxide dismutases (Cu/Zn-Sod and Mn-Sod) scavenge the superoxide radical, converting it into hydrogen peroxide and oxygen. In mammals there are three Sod: Sod1 (cytoplasmic) and Sod3 (secreted) are Cu/Zn-dependent, whereas Sod2 (mitochondrial) is Mn-dependent (Maier and Chan, 2002). Catalase and the peroxidases, on the other hand, convert hydrogen peroxide into water (Kirkman and Gaetani, 2007; O'Brien, 2000). Mammals have many peroxidases but only one catalase (Jin et al., 2003).

GSH and Trx, in addition to forming part of the antioxidant systems described above, are also specific substrates of a group of peroxidases. The glutathione peroxidases (Gpx) are a group of selenoproteins that catalyze the reduction of peroxides generated by ROS at the expense of GSH (Arthur, 2000). Four Gpx have been identified in mammalian systems: Gpx1 (the most abundant peroxidase), Gpx2 (mostly expressed in the gastrointestinal tract), Gpx3 (the plasma Gpx form), and Gpx4 (a membrane-associated protein also called phospholipid glutathione peroxidase; PHGPx). Gpx4 is unusual in that, besides being active as a monomer, it is the only enzyme capable of reducing the peroxidized lipids present in cell membranes (Imai and Nakagawa, 2003). The Trx-dependent peroxidases are known as peroxiredoxins (Prx). Six Prx have been described in mammals, each with a characteristic intracellular distribution (Wood et al., 2003). Prx1 and Prx2 are found in the cytoplasm; Prx3 is specific of mitochondria; Prx4 is found in the endoplasmic reticulum, lysosomes and in the

extracellular space; and Prx6 exists in both the cytoplasm and mitochondria. All but Prx3 can be found in the nucleus.

Generation of oxidative stress

An oxidative stress condition is generated when a cell accumulates an excessive concentration of ROS. This occurs when ROS production exceeds cellular defenses. All active cells produce a certain amount of ROS, but antioxidant systems maintain the levels low. As a passive effect, ROS can be detrimental to cells due to oxidative damage to lipids, proteins, and DNA. Among the resulting products of this oxidation are lipid hydroperoxides (Rikans and Hornbrook, 1997), carbonylated proteins (Dalle-Donne et al., 2003), and DNA with oxidized bases (e.g., 7,8-dihydro-8-oxoguanine; David et al., 2007). The following sections describe the possible active roles of ROS during development.

ROS regulation of signaling molecules

It is now well accepted that ROS are signaling molecules that, as with other second messengers, transduce messages from the extracellular milieu to generate a specific cellular response (active ROS function). ROS play defined functions through redox modifications of a great diversity of molecules participating in almost every signaling pathway described up to date. Interestingly, many proteins relevant for development are sensitive to oxidative stress conditions (Figs. 2, 3). Proteins are known to undergo redox modifications mainly at cysteine (Cys) residues, although other amino acids can be oxidized (e.g., Tyr, Trp, His) (Droge, 2002). Cys thiols undergo different degrees of oxidation by different ROS at the -SH groups resulting in generation of sulphenic acid (-SOH), sulphinic acid (-SO₂H) or sulphonic acid (-SO₃H). Alternatively, glutathionylation is the modification incorporated in the protein after oxidation. The variety of macromolecules sensitive to redox modification by ROS is particularly striking, from extracellular matrix molecules, to phosphatases, kinases and a great number of transcription factors. It is important to mention that redox regulation in some cases is indirect through, for instance, the interaction with Trx (Fig. 3).

Kinases and phosphatases

Regulation of protein phosphorylation is fundamental in many developmental processes; thus, the effect of intracellular redox states on the activity of protein kinases and protein phosphatases must be considered of particular interest. Activation of tyrosine kinases is recurrent in the control of proliferation and differentiation by several growth factors. Several protein tyrosine kinases (PTK) and protein tyrosine phosphatases (PTP) have been found to be redox sensitive (Fig. 3). Possible targets for oxidation are cysteines. In fact, 81 out of 82 PTK have a conserved Cys987, and 65 out of those 81 PTK have this residue within the CXXXXXXMXXCW motif (Nakashima et al., 2005). On the other hand, PTP have the conserved motif CXXXXXR (Rhee, 2006). Serine-threonine kinases are also regulated by redox via thiol

modifications that result in activation or inhibition of kinase activity (Cross and Templeton, 2004; Giannoni et al., 2005; Humphries et al., 2005; Park et al., 2000).

Regulation of kinase activity by a redox-regulated phosphatase is illustrated by the action of a MAP kinase phosphatase (Mkp) on Jun kinase (Jnk) (Fig. 3). In this case, the inactivation of Jnk by Mkp is abrogated by the oxidation of the latter (Kamata et al., 2005a). Another example is Pten, a PIP3 phosphatase that antagonizes the PI3 kinase activity and which, upon oxidation, leads to an up-regulation of this activity (Lee et al., 2002) (Fig. 3). Trx can also directly inhibit Ask1, a MAP kinase kinase kinase; ROS activate Ask1 by oxidizing and inducing the dissociation of Trx (Saitoh et al., 1998) (Fig. 3).

Transcription factors

Transcription factors have been identified acting at a decisive point in almost every developmental process. Commonly, transcription factors are visualized as the end target of all signaling pathways. Transcriptional activation of specific genes always involves a multi-protein complex in which the contribution of an individual transcription factor can result from increased stability, protein processing and posttranslational modifications. The classical posttranslational modification that regulates the activity of transcription factors is phosphorylation. However, in recent years redox regulation of transcription factor activity has been widely documented. In this part of the review, we describe the redox regulation of transcription factors with potential developmental implications (Fig. 2). For more detailed description of transcription factor redox regulation, we direct readers to some specific reviews on the topic (Allen and Tresini, 2000; Dalton et al., 1999; Sun and Oberley, 1996).

An interesting feature of various redox-regulated transcription factors is that they possess highly evolutionarily conserved redox-sensitive Cys residues. For example, paired domain-containing proteins (Pax), known to play important roles during animal development (Robson et al., 2006), bear two conserved cysteines: Cys37 (with the exception of hydra Pax-A) and Cys49. A highly basic local environment surrounds both conserved Cys making these residues ideal targets for redox regulation (Tell et al., 1998a; Tell et al., 1998b; Tell et al., 2000). Homeodomain proteins represent another family of transcriptional factors important for development that can be regulated by redox conditions (Manak and Scott, 1994). HoxB5 have been found to be redox sensitive *in vitro* and, opposite to the effect in other transcription factors, its DNA-binding ability is enhanced upon oxidation (Galang and Hauser, 1993). The redox-sensitive amino acid is also a Cys at position 232. As in the case for Pax proteins, many other homeobox proteins in several animal species described up to date (e.g., Ant, Scr, HoxA5, HoxB5, HoxC5, HoxA6, HoxB6, HoxC6, HoxA7, HoxB7) contain a highly conserved Cys residue (corresponding to Cys39 in the homeobox) (Gehring et al., 1994). These highly conserved Cys suggest that the activity of several Hox proteins is also redox regulated. Cdx2, another homeobox containing protein, binds *in vitro* as a dimer to its regulatory element in a redox-dependent manner (Suh et al., 1994).

Oct proteins, members of the POU domain-containing transcription factors, possess a highly conserved Cys at position 50 (Herr and Cleary, 1995). Experimental evidence has demonstrated that Cys50 is redox sensitive, at least in Oct2 and Oct4 proteins (Rigoni et al., 1993; Smith et al., 1998). Oct4 is of special interest because of its essential function in the maintenance of stem cell pluripotency. Oct4 binding to the DNA promoter region of *Fgf4* is redox-sensitive (Lickteig et al., 1996) and its transcriptional activity can be increased by direct interaction with Trx (Guo et al., 2004).

A common mechanism to maintain the reduced state of several transcription factors is via the combined action of Trx and Ape1/Ref1 (Fig. 3). Ref1 is a multifunctional protein with endonuclease and oxidoreductase activity (Evans et al., 2000; Xanthoudakis et al., 1992). Trx can reduce oxidized Ref1 that in turn, in the nucleus, reduces the

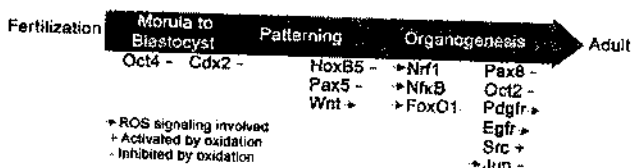


Fig. 2. Redox regulation of developmentally relevant molecules. Inhibition (-) or activation (+) can result from direct oxidation of a particular molecule. In addition, a ROS-mediated signaling pathway can act upstream (arrow at the left) or downstream (arrow at the right) of a molecule and determine its activity. The scheme shows molecules whose developmental function has been genetically demonstrated and their activity is regulated by ROS. The arrow represents embryo development transiting from anaerobic (green) to oxidative (red) metabolism; molecule position along the arrow indicates the approximate stage at which the specific molecule or members of the same family appear to be essential.

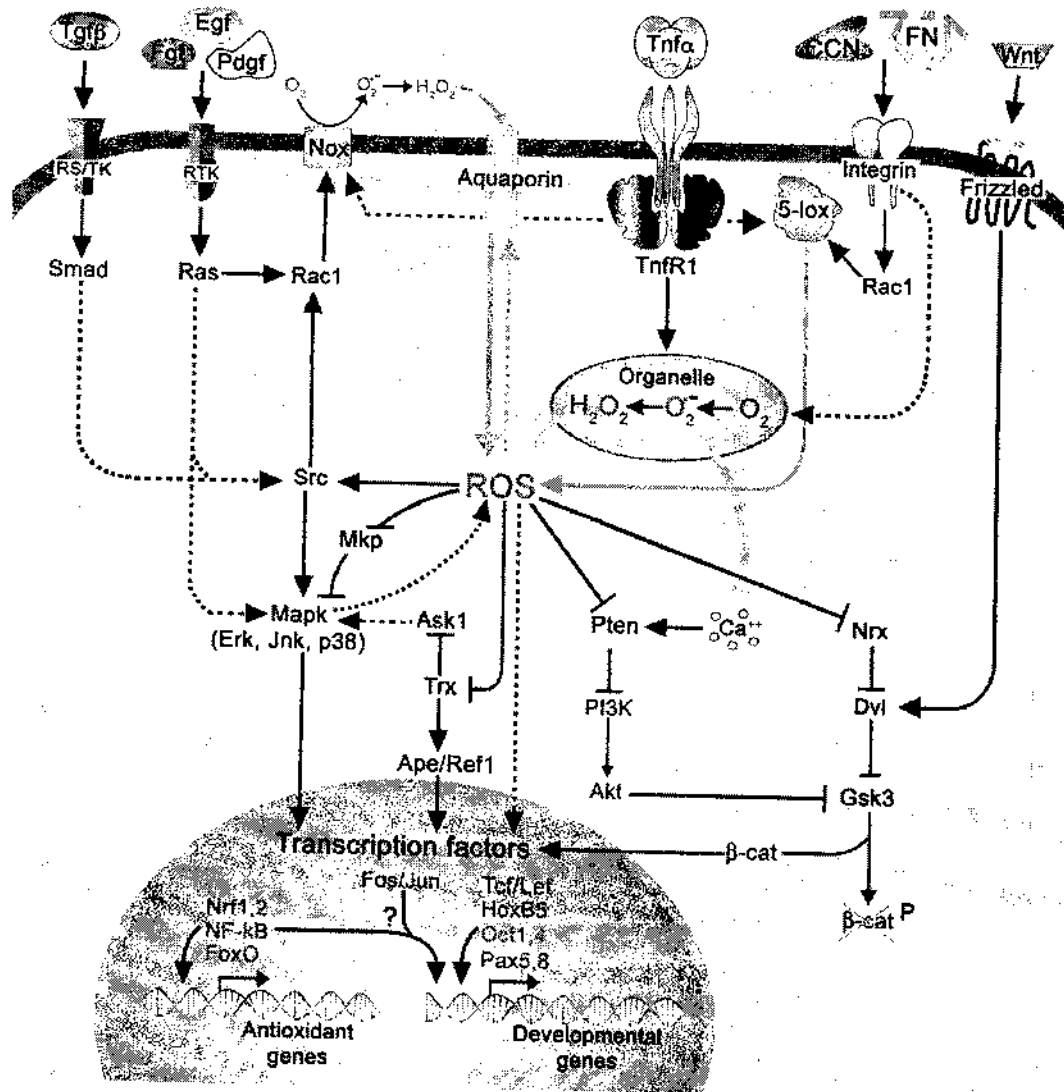


Fig. 3. An integrative overview of signalling pathways modulated by redox. Extracellular signals such as growth factors promote initial ROS production mainly through NADPH oxidases at the plasma membrane. Rac1 controls the activity of such enzymes by regulating its assembly, hence this molecule acts as modulator of signal transduction in several pathways. Tnfα induce ROS production via mitochondria as well. Other membrane proteins like integrins induce the production of ROS from mitochondria and 5-lipoxygenase (5-lox). Trx is a key protein that can act as a negative (Ask) or, in combination with Ref, as a positive regulator. Wnt signaling is negatively regulated by reduced Nrx, which binds to Dvl. Several kinases and phosphatases are redox sensitive. Expression and/or product activity of some specific transcription factor genes are regulated in response to oxidative stress, which in turn determine the transcription levels of genes (developmental genes) that control proliferation, differentiation, or cell death. Positive (e.g., Mapk-mediated) and negative (e.g., antioxidant response) regulatory circuits determine the final levels of ROS. Not all the pathways included occur at the same time in the same cell. See text for a more detailed description of the pathways. Continuous arrows indicate direct or apparent direct interactions, whereas dotted arrows indicate indirect interactions (in some cases the intermediate proteins are known but were not included for simplification). RS/TK, receptor with serine-threonine kinase activity; RTK, receptor with tyrosine kinase activity; FN, fibronectin.

Cys of the DNA-binding domain of transcription factors enhancing their activity (Hirota et al., 1997). This mechanism may be relevant for the restoration of transcriptional activity after oxidative stress. Interestingly, *Ref1*-deficient mice die shortly after implantation (Xanthoudakis et al., 1996). Besides the well-described case of AP1 transcription complex (Xanthoudakis et al., 1992), experimental evidence has shown that at least Pax-5 and Pax-8 DNA-binding activity is increased by interaction with Ape1/Ref1 (Cao et al., 2002; Tell et al., 1998a; Tell et al., 1998b; Tell et al., 2000).

ROS-induced transcriptional activation

In addition to the posttranslational modifications induced by ROS on signaling proteins, ROS can induce the transcriptional activation of specific genes (Figs. 2, 3). Interestingly, transcription factors that have been identified for their role in oxidative stress response also appear

to play a fundamental role in developmental processes. For example, NFκB is induced in response to an increase in ROS concentration (Martindale and Holbrook, 2002) and its activity is regulated by the Trx/Ref1 system (Evans et al., 2000; Xanthoudakis et al., 1992). NFκB activation is in part associated with an antioxidant response, since Sod2 and Trx are among its target genes (Djavaheri-Mergny et al., 2004). Dominant-negative inactivation of NFκB in the chick limb blocks growth (Bushdid et al., 1998; Kanegae et al., 1998) and, in zebrafish, notochord development is affected (Correa et al., 2004). In mice, different defects have been observed depending on the NFκB member or members affected; defects include fetal liver degeneration, altered hematopoiesis, and abnormal formation of several epidermal appendices (Grossmann et al., 1999; Pohl et al., 2002; Schmidt-Ullrich et al., 2001). Dorsal, the homologous gene in *Drosophila*, is essential for dorso-ventral axis formation (Bergmann et al., 1996). Mice deficient in *FoxO1*, another gene activated by oxidative stress, is

essential for embryogenesis, apparently due to a vasculature defect (Hosaka et al., 2004), and a combined lack of three FoxO members (1, 3 and 4) causes hematopoietic stem cell resistance to oxidative stress (Tothova et al., 2007).

The coordinated expression of antioxidant genes upon oxidative stress is controlled, at least in part, by the antioxidant response element (ARE) (Favreau and Pickett, 1995). The transcription factors mediating this induction appear to be Nrf1 and Nrf2, members of the evolutionarily conserved subfamily of bZIP proteins CNC-bZIP (Jaiswal, 2004). *Nrf1* and *Nrf2* are widely expressed and their overexpression transactivates ARE-containing promoters. *Nrf1* mutant embryos have an abnormal liver and are anemic, which is the likely cause of lethality at midgestation (Farmer et al., 1997). *Nrf2*-deficient mice, on the other hand, are apparently normal but the expression of some antioxidant enzymes is decreased and they are sensitive to oxidative stress (Chan et al., 1996). Cells lacking *Nrf1* are also sensitive to treatment with prooxidants. The analysis of double mutants suggest that *Nrf1* and *Nrf2* are partially redundant in mediating ARE function and antioxidant response during embryogenesis (Leung et al., 2003).

Signaling pathways

As briefly highlighted in the previous section abundant *in vitro* and *in vivo* evidence exists that numerous components of different signaling pathways undergo redox modifications. In addition, it is now known that stimulation of several receptors of growth factors and cytokines actively promote the production of ROS as a downstream signaling event (Fig. 3). Therefore, different receptor-mediated signaling pathways not only respond to cellular redox changes, but they also actively participate in promoting redox changes inside the cells. The most studied example is the oxidative burst that occurs in phagocytic cells. Here, we highlight evidence reported in non-phagocytic cells.

Mitogen signaling

Different growth factors with mitogenic activity such as Pdgf, fibroblast growth factor (e.g., Fgf2), and epidermal growth factor (Egf)/transforming growth factor α (Tgf α) activate signaling pathways that promote the production of intracellular superoxide and hydrogen peroxide (Fig. 3). The increased mitogenic activity of Pdgf in the absence of Prx2 reveals the relevance of ROS in the regulation of cell proliferation by this growth factor (Choi et al., 2005). NADPH oxidases have been shown to be responsible for the production of ROS in these pathways. Interestingly, overexpression of a dominant-negative form of Ras or Rac1 is capable of blocking the mitogen-induced production of intracellular superoxide (Cheng et al., 2006; Thannickal et al., 2000). This demonstrates that Ras and Rac1 are downstream of Pdgf, Fgf and Egf receptor signaling for the stimulation of ROS production. In agreement with this proposal, constitutively-active Ras or Rac1 also activate NADPH oxidase. ROS production induced by constitutively-active Ras is inhibited by a dominant-negative form of Rac1, suggesting that Rac1 is downstream of Ras (Cheng et al., 2006). Importantly, Egf-stimulated ROS production induces the phosphorylation of different cellular proteins that includes the receptor itself, indicating the presence of a regulatory feedback loop (Thannickal and Fanburg, 2000). Ngf and Tgf β also promote the production of ROS; the former is mediated by Ras and Rac (Suzukawa et al., 2000), whereas the latter is not (Thannickal et al., 2000).

Integrin signaling

An integrin-dependent signaling mechanism involving ROS production has been recently identified (Fig. 3). Initially, after the extracellular matrix (e.g., fibronectin, CCN) contacts the cell, ROS are released from the mitochondria, and later, a second intense ROS burst

is detected which is dependent on 5-lipoxygenase, an enzyme involved in the synthesis of leukotrienes from arachidonic acid (Chen et al., 2007; Taddei et al., 2007). This has two important implications. First, a single type of receptor is capable of promoting ROS formation from two different sources, and second, ROS formation can occur at different times upon the same signaling input. Src appears to be one relevant ROS target leading to its activation and subsequent focal adhesion and cytoskeleton rearrangement. Focal adhesion kinase (Fak) activation by ROS might explain the role of ROS in cell migration as well as other developmental processes requiring extracellular matrix-cell adhesion (Ben Mahdi et al., 2000).

Wnt signaling

Wnt proteins are among the most important molecules essential for animal development (Clevers, 2006). Different signaling pathways are used by Wnt to play multiple roles in embryogenesis, from pattern formation to specific cellular processes such as proliferation and differentiation (Clevers, 2006). The canonical Wnt signaling pathway results in the accumulation of β -catenin and its translocation to the nucleus, where it activates the transcription factor Tcf. Cytosolic accumulation of β -catenin occurs after Wnt binds to its receptor Frizzled causing the inhibition of the complex that continuously promotes β -catenin degradation. Dishevelled (Dvl) mediates this process. Recently, it was determined that a Trx-related protein named nucleoredoxin (Nrx) could play a regulatory role in this Wnt signaling pathway by directly controlling Dvl activity (Funato et al., 2006). Nrx binds to Dvl in its reduced form suppressing Wnt signaling (Fig. 3). In *Xenopus* embryos, increasing or reducing Nrx protein level leads to embryo abnormalities that directly relate to Wnt signaling inhibition or activation, respectively. Hydrogen peroxide can oxidize Nrx, which releases Dvl and promotes β -catenin accumulation in the absence of Wnt ligand. On the basis of these data, it is predicted that ROS levels are determinant for the activation of the Wnt signaling pathway and, consequently, should be tightly regulated for correct development.

Cellular processes regulated by ROS

As described above, many molecules relevant for development are sensitive to the action of ROS. However, is the oxidation of these particular proteins relevant in defining the fate of a developing cell? The answer to this question is not known, but many studies in cell culture have shown the ability of ROS to regulate cellular processes fundamental for development such as proliferation, differentiation, death, and migration (Fig. 4). Another question is how are the varied responses to the same signal (e.g., hydrogen peroxide) generated? ROS may function as a 'classical' second messenger; that is, the specific response depends on the cell type, the intracellular compartment where ROS are produced, and the specific ROS and dose. Indeed, for

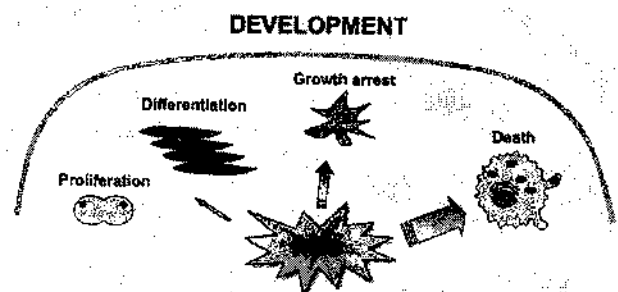


Fig. 4. Different levels of ROS induce specific cellular processes. In general, low levels of ROS are mitogenic or promote differentiation; higher amount of ROS favor growth arrest, while even higher ROS concentrations activate apoptosis. See text for specific examples.

instance, low and high hydrogen peroxide concentrations produce a contrasting p53-dependent effect on cells, in that the former causes antioxidant-mediated survival, whereas the latter promotes prooxidant-mediated apoptosis (Sablina et al., 2005).

Proliferation

Proliferating mammalian cells exhibit a broad spectrum of responses to oxidative stress (Fig. 4). Very low levels of hydrogen peroxide or superoxide stimulate proliferation of smooth muscle cells (Rao and Berk, 1992), fibroblasts (Burdon and Rice-Evans, 1989), amnion cells (Ikebuchi et al., 1991), and aortic endothelial cells (Ruiz-Gines et al., 2000), among others. Overexpression of antioxidant enzymes supports the notion of ROS as signals to maintain the growth of cells. For example, overexpression of catalase and/or Sod2 inhibits proliferation of vascular smooth muscle cell in response to EGF, which is accompanied by a reduction in Erk1/2 phosphorylation (Brown et al., 1999; Shi et al., 2004). On the other hand, higher concentrations of hydrogen peroxide can temporarily arrest growth, with housekeeping gene expression halted, and stress-related genes induced (Davies, 1999). After temporary growth arrest, many cells exhibit a transient adaptive response in which genes for oxidant protection and DNA repair are preferentially expressed. At even higher hydrogen peroxide concentrations mammalian fibroblasts are not able to adapt, but instead enter into a permanently growth-arrested state in which they appear to perform most normal cell functions but cease to divide, a state resembling cellular replicative senescence (Davies, 1999). If the oxidative stress level is further increased, cells die in an organized manner resulting in apoptosis (see below). As described above, several mitogens can mediate their effect through the production of ROS.

Differentiation

Major metabolic changes occur as cells specialize within a specific lineage. ROS production or elimination must adapt to those changes. For instance, newborn neurons but not astrocytes acquire high level of ROS upon differentiation from progenitors (Tsatmali et al., 2005; Tsatmali et al., 2006). Does the increase in ROS participate in promoting efficient differentiation during development? The answer to this question is not known but some observations suggest that it is possible. Cells with low level of ROS isolated from E15 brains differentiate into neurons that maintain higher ROS levels. Later, these immature neurons differentiate into large pyramidal-like neurons and smaller neurons that express nuclear calretinin. Antioxidant treatment does not alter neuron number but shifts differentiation towards generating a greater proportion of smaller neurons (Tsatmali et al., 2006). In addition, ROS have been shown to be essential for NGF-induced differentiation of PC12 cells (Kamata et al., 2005b), and may influence mesencephalic (Studer et al., 2000), neural crest (Morrison et al., 2000) and oligodendrocyte type-2 (Smith et al., 2000) precursor cell differentiation.

Neurogenesis is not the exception in ROS-regulated differentiation. Osteoclast differentiation is also modulated by ROS (Lee et al., 2005). Signaling through the receptor activator of NF κ B (Rank) promotes differentiation of bone marrow monocyte-macrophage lineage (BMM) cells into osteoclasts. The binding of Rank ligand to its receptor leads to the recruitment of the Tnf receptor-associated factor 6 (Traf6) to the cytoplasmic domain of Rank, thereby activating a distinct Mapk signaling cascade involving Jnk, p38, and Erk. Rank ligand stimulation of BMM cells transiently increases the intracellular level of ROS by activating a NADPH oxidase. A deficiency in Traf6 blocks Rank-mediated ROS production, and antioxidants or blocking Nox1 activity inhibit the responses of BMM cells to Rank ligand, including ROS production, activation of Mapk, and osteoclast differentiation. A similar ROS-regulated mechanism has been observed during *Caenorhabditis elegans* germ line and vulval development (Shibata et al.,

2003). ROS also regulate adipocyte differentiation although in a negative way. By up-regulating the expression of the gene encoding the adipogenic repressor Chop-10/Gadd153, mitochondrial ROS inhibit adipocyte differentiation (Carriere et al., 2004).

Embryonic stem (ES) cells are well suited for studying differentiation within all lineages. Using ES-derived embryoid bodies, it has been shown that cardiomyogenesis is regulated by the intracellular redox state. During differentiation, NADPH oxidase catalytic subunit Nox4 and the regulatory subunit p67^{phox} are transiently expressed and ROS are generated (Li et al., 2006; Sauer et al., 2000). PI3 kinase inhibitors or Nox4 down-regulation results in a reduction of ROS with a concomitant decrease in the number of beating foci and a reduction in the size of the area with cardiomyocytes (Sauer et al., 2000). Continuous exposure to ROS results in inhibition of cardiomyogenesis and vasculogenesis, whereas a low-level ROS pulse enhances differentiation toward the cardiomyocyte as well as vascular cell lineages (Li et al., 2006; Sauer and Wartenberg, 2005). Mechanical stress is an inducer of cardiovascular differentiation of ES cells that is also associated with NADPH oxidase activity and an increase in ROS. Treatment with free radical scavengers results in reduction in expression of genes necessary for cardiovascular differentiation such as Hif and vascular endothelial growth factor (Vegf) (Schmelter et al., 2006). It is interesting that during spontaneous differentiation of human ES cells there is also ROS generation. The expression of various antioxidant enzymes including mitochondrial and cytoplasmic superoxide dismutases, catalase, and peroxiredoxins shows a dramatic change during early differentiation (Cho et al., 2006).

Cell death

ROS, rather than being a consequence of cell death, are signaling molecules with the ability to turn on the cell death machinery (Fig. 4). As in the regulation of proliferation, different ROS levels can result in different types of cell death. In general, at the lowest death promoting ROS level, type 1 cell death (i.e., apoptosis) is observed; at intermediate levels, ROS cause type 2 cell death (i.e., autophagy) (Scherz-Shouval and Elazar, 2007); and at the highest concentrations, ROS provoke necrotic cell death (Bras et al., 2005). Two main pathways can initiate apoptotic cell death: the intrinsic, mitochondrial pathway, and the extrinsic, receptor-mediated pathway. The generation of ROS can result in mitochondrial-dependent cell death through the activation of the Mapk pathway and the proapoptotic Bcl-2 proteins Bax or Bak (Ueda et al., 2002). The source of ROS does not seem to be important in the activation of the intrinsic pathway, since mitochondrial as well as NADPH oxidase-generated ROS can induce cell death depending on the primary signal, the cell type, or the culture conditions employed (Fleury et al., 2002; Tammariello et al., 2000). Furthermore, Bax can regulate ROS production in mitochondria, suggesting a positive feedback loop between ROS production and Bax apoptotic activation (Kirkland et al., 2002).

Cell death triggered upon activation of cell surface death receptors, the extrinsic pathway, is also ROS modulated. The tumor necrosis factor alpha (Tnf α) receptor can initiate two death pathways: one directly activates caspases through adaptor proteins, and a distinct pathway involves the production of ROS (Shen and Pervaiz, 2006). Similar to the intrinsic pathway, ROS from different sources contribute to cell death (Hughes et al., 2005). Mitochondria appear to be the main ROS source, although in some cases NADPH oxidase and 5-lipoxygenase have been shown to contribute (Chen et al., 2004). Different ROS levels could elicit different effects. For instance, ROS generated from the NADPH oxidase (low level) protect, whereas mitochondria-derived ROS (high level) promote apoptosis (Deshpande et al., 2000). NF κ B is the key regulator of the survival response, at least in part, by the transcriptional activation of antioxidant enzyme genes. The best-described apoptotic pathway regulated by ROS involves Jnk activation (Kamata et al., 2005a). Interestingly, there is a positive feedback loop

between Jnk activation and ROS production: Jnk contributes to Tnfr α -stimulated ROS production, which in turn induces Jnk activation. Tnfr α -induced elevated ROS levels are found only in wild-type mouse fibroblasts but not in *Jnk*^{-/-} cells (Ventura et al., 2004). Redox regulation of several members of the MAPK pathway described above has been shown to influence the outcome in this ROS-mediated cell death mechanism (Shen and Pervaiz, 2006).

Natural motoneuron death during spinal cord development is an *in vivo* example of cell death regulated by ROS (Sanchez-Carbente et al., 2005). In this case, caspases associated to the extrinsic and intrinsic pathways appear to interact to promote motoneuron death. In addition, a caspase-independent death also contributes to this natural neurodegenerative process.

Developmental processes regulated by ROS

In mammals preimplantation and early postimplantation embryogenesis occurs under almost anaerobic conditions (i.e., a hypoxic environment; 3–5% oxygen). Thus, it is likely that during this period the embryo is very sensitive to exogenous factors that could cause oxidative stress. Accordingly, high ROS levels are detrimental for growth of embryos in culture, and administering free radical scavengers improves *in vitro* embryo development (Gardiner and Reed, 1994; Rodriguez-Gonzalez et al., 2003). It is interesting that *Oct4*, which is expressed in the embryo proper throughout the entire hypoxic period before restricting to the germ line, is positively regulated by the hypoxia-inducible factor Hif2 α (Covello et al., 2006). The transition from anaerobic glycolysis to oxidative metabolism appears to occur at E9 in the mouse, coincident with the time at which chorioallantoic circulation is established and the heart starts to beat (Clough, 1985). Oxygen toxicity to the embryo is well known, but direct evidence that indicates a function for ROS in a specific developmental process is scarce.

Spermatogenesis and oogenesis

Germ cells appear to be particularly sensitive to changes in redox conditions. During spermatogenesis, spermatogenic cells and spermatozoa are protected by several antioxidant enzymes (Gu and Hecht, 1996; Nonogaki et al., 1992; Puglisi et al., 2005). Interestingly, three thioredoxins are exclusively expressed in the spermatids: *Sptrx1*, *Sptrx2*, and *Sptrx3*. *Sptrx1* has a distinctive distribution in the fibrous sheath during sperm tail elongation at late spermatogenesis (Yu et al., 2002), whereas *Sptrx2* is also localized in the fibrous sheath during spermatogenesis, but remains in mature epididymal spermatozoa (Miranda-Vizuet et al., 2003). *Sptrx3* is localized in the Golgi apparatus during spermiogenesis (Jimenez et al., 2004). The high concentrations of polyunsaturated fatty acids in sperm cells make them highly susceptible to ROS (Alvarez and Storey, 1995). Membrane oxidation may affect motility and morphology of the sperm, finally reducing the efficiency of fusion between gametes (Imai et al., 2001).

In mammals, antioxidant enzymes such as Sod1, Sod2, and Gpx are present during different stages of oogenesis (El Mouatassim et al., 1999). All peroxiredoxins are expressed in the oocytes; particularly, Prx6 is upregulated during *in vitro* maturation (Leyens et al., 2004). Interestingly, *Sod1*-deficient female mice have drastically compromised fertility, with oogenesis halted at the middle of follicle development (Matzuk et al., 1998). The lack of *Sod1* in *Drosophila* also causes reduction in fertility (Philips et al., 1989).

Fertilization and early development

GSH appears to have an important role in the preparation of the oocyte to receive the sperm and in the initiation of embryo development. An increase in GSH concentration in oocyte is associated with maturation (Luberda, 2005); this high concentration of glutathione is maintained during the first divisions followed by a continuous decrease during *in vivo* preimplantation development (Gardiner and Reed, 1994). The expression of the peroxiredoxins is sustained during the first cell division; latterly, expression declines at 16-cell embryo stage, before increasing once more at the blastocyst stage (Leyens et al., 2004). Developmental arrest of mammalian embryos cultured from just after fertilization frequently coincides with the initiation of embryonic gene expression. Such arrest at the two-cell stage in mice is released when embryos are treated with antioxidants (Natsuyama et al., 1993). All these data are consistent with normal early development occurring at very low ROS levels. This condition may apply to other organisms. In *Drosophila*, the loss of Trx homolog gene affects oogenesis and early development (Salz et al., 1994).

One interesting case where ROS apparently have a specific function is in the hatching of the mouse blastocyst from the zona pellucida (Thomas et al., 1997), at which time the embryo undergoes a superoxide burst. Different superoxide scavengers prevent the blastocyst from hatching, supporting the essential role of ROS in this process.

Among the cellular processes essential for morphogenesis is cell death. It is interesting that many of the mouse embryo regions where there is abundant cell death, also show high ROS concentrations (Salas-Vidal et al., 1998). In particular, high ROS concentration is associated to the cell death in the interdigital regions of the developing limb. ROS levels in the limb appear to be determined by *Gpx4*, whose expression is restricted to the digits (Schnabel et al., 2006). Antioxidants are also expressed in the interdigital regions, which could be part of an antioxidant response due to the high ROS concentrations in these regions (Schnabel et al., 2006; Shan et al., 2005). In agreement with a role of ROS in limb morphogenesis, interdigital cell death and interdigit regression decrease when cultured limbs are treated with antioxidants (Salas-Vidal et al., 1998; Schnabel et al., 2006). Supporting a physiological role of ROS in limb morphogenesis, retinoic acid induces cell death that is accompanied by an increase in ROS concentration and a decrease in peroxidase activity (Schnabel et al., 2006). Retinoic acid is involved in the control of cell death in other embryo regions (Cuervo et al., 2002), thus it is possible that ROS participate widely in embryo morphogenesis. In addition, the cell death that causes cavitation of ES-derived embryoid bodies also requires ROS, suggesting that ROS are essential for one of the earliest morphogenetic processes in mammalian development, the formation of the proamniotic cavity (Hernández-García et al., 2008).

Morphogenesis

Among the cellular processes essential for morphogenesis is cell death. It is interesting that many of the mouse embryo regions where there is abundant cell death, also show high ROS concentrations (Salas-Vidal et al., 1998). In particular, high ROS concentration is associated to the cell death in the interdigital regions of the developing limb. ROS levels in the limb appear to be determined by *Gpx4*, whose expression is restricted to the digits (Schnabel et al., 2006). Antioxidants are also expressed in the interdigital regions, which could be part of an antioxidant response due to the high ROS concentrations in these regions (Schnabel et al., 2006; Shan et al., 2005). In agreement with a role of ROS in limb morphogenesis, interdigital cell death and interdigit regression decrease when cultured limbs are treated with antioxidants (Salas-Vidal et al., 1998; Schnabel et al., 2006). Supporting a physiological role of ROS in limb morphogenesis, retinoic acid induces cell death that is accompanied by an increase in ROS concentration and a decrease in peroxidase activity (Schnabel et al., 2006). Retinoic acid is involved in the control of cell death in other embryo regions (Cuervo et al., 2002), thus it is possible that ROS participate widely in embryo morphogenesis. In addition, the cell death that causes cavitation of ES-derived embryoid bodies also requires ROS, suggesting that ROS are essential for one of the earliest morphogenetic processes in mammalian development, the formation of the proamniotic cavity (Hernández-García et al., 2008).

Angiogenesis and cell migration

Angiogenesis is a complex process necessary for embryonic vascular development that, through controlled endothelial cell migration and proliferation, leads the growth of new capillaries from pre-existing vessels. Endothelial cell-specific factors, like Vegf, Pdgf, and angiopoietin (Ang1) are critical for angiogenesis and are regulated by redox (Lassegue and Clempus, 2003). ROS contribute to Vegf- and Pdgf-induced phosphorylation of Akt, Erk1/2, and p38 Mapks in endothelial cells. The activation of Tie2 receptors by Ang-1 in human umbilical vein endothelial cells induces rapid and transient production of ROS, particularly superoxide anions. ROS production is attenuated by inhibition of the NADPH oxidase assembly and is Rac1-mediated. Interestingly, Ang1-induced cell migration was strongly inhibited by overexpression of antioxidants, by a Rac1 dominant-negative mutant, and by selective NADPH oxidase inhibitors (Harfouche et al., 2005). Rac1 also mediates Vegf-induced proliferation and migration of endothelial cells, suggesting that NADPH oxidase plays an important functional role in promoting angiogenesis (Ushio-Fukai et al., 2002). Interestingly, Nox1 is a potent trigger of angiogenesis

involving the induction of *Vegf* expression (Arbiser et al., 2002). It is worth mentioning that hypoxia is a major condition that regulates angiogenesis, and at least *Hif1 α* is regulated by the *Trx/Ref* system (Harris, 2002). Thus, hypoxia and ROS regulatory networks may interact to finely control angiogenesis.

ROS-regulated migration may not be unique to endothelial cells. Recently, a genetic screen in *Drosophila* for genes that alter germ cell migration identified a thioredoxin peroxidase gene as essential in this process (DeGennaro and Lehmann, 2007). Strikingly, overexpression of this gene promotes early transepithelial migration of germ cells into the midgut primordium. These observations strongly suggest that a redox mechanism controls germ cell migration.

Redox regulators in development

The studies in culture indicate that ROS can regulate the fundamental cellular processes of development. However, as mentioned above, only few evidences support an actual developmental role of ROS. Although the activity of the respiratory chain, or of other ROS sources, and the presence or absence of antioxidants during development are not indicative of a specific ROS function, they could serve as signs of regions and/or times at which ROS potentially have a function. Unfortunately, the instability of most ROS species *in vivo* precludes a confident determination of their concentration in developing cells. High ROS concentration can be determined by staining with redox-sensitive dyes (Curtin et al., 2002). This strategy has been mainly applied to cells in culture, though it has been demonstrated to be useful for detection of high ROS levels in mouse embryos at different developmental stages (Salas-Vidal et al., 1998; Sanchez-Carbente et al., 2005; Schnabel et al., 2006). Taking advantage of the damage caused by oxidative stress, an alternative indirect way to determine ROS levels is by measuring the oxidation level of macro-

molecules. In this case, it is important to consider the half-life of the damaged molecule and repair mechanisms, as these will determine if the measurements indicate a short-term increase in ROS or an accumulative damage due to continuous ROS production. This strategy has been used to determine ROS damage during the adult lifespan, but its use to estimate ROS level in different embryo regions is limited by the necessity to dissect the embryo and the amount of tissue needed. In addition, the enormous dynamics of developing cells may limit the accumulation of the oxidized macromolecule to below detectable levels. Reliable determinations of ROS concentration await development of new methods that are applicable to live embryos. Recently, a protein whose fluorescence depends upon oxidation by hydrogen peroxide was developed (Belousov et al., 2006). Transgenic animals with this ROS-sensitive protein may allow determining the redox status of live cells within an organism.

The expression pattern of antioxidant genes is interesting because they could either define the areas of high and low ROS levels or reveal the areas under oxidative stress, as several of those genes respond to this condition. However, at this time, very little is known about the regulation of genes involved in the control of the intracellular redox state during normal development. This lack of information is compensated by data coming from studies where many genes regulating ROS levels have been mutated or overexpressed, especially in the mouse (Table 1). Development is affected by mutation in several genes regulating ROS levels, however, interpretation of their function needs to be taken with caution. For instance, due to the essential requirement of the respiratory chain for ATP production, null mutations in genes encoding its essential components (e.g., cytochrome *c*, apoptosis inducing factor) are lethal very early in embryogenesis (Li et al., 2000; Brown et al., 2006). Therefore, decreasing ROS production by altering the respiratory chain is not possible. On the other hand, abnormal embryo phenotypes after targeted disruption of genes

Table 1
Phenotype of mice homozygous for null alleles of genes encoding antioxidant and prooxidant proteins^a

Phenotype	Genotype	Stage ^b	Brief description of defect	Reference
Early developmental lethality	<i>Aif1</i> ^{-/-}	E9	Small size caused by abnormal cell death	Brown et al. (2006)
	<i>Cyt c</i> ^{-/-}	E8.5	Embryo developmental delay and deficient cell growth	Li et al. (2000)
	<i>Ref1</i> ^{-/-}	E5.5	Abundant cell death and expanded proamniotic cavity	Xanthopoulos et al. (1996)
	<i>Cpx4</i> ^{-/-}	E7.3	Failed to form well-organized embryonic structures	Yant et al. (2003); Injai et al. (2003)
	γ <i>Gcs</i> ^{-/-}	E8.5	Defects in gastrulation	Shi et al. (2006)
	<i>Trx1</i> ^{-/-}	E5	Failure to hatch, proliferation affected on ICM cells	Matsui et al. (1996)
	<i>Trx2</i> ^{-/-}	~E10.5	Anterior neural tube open	Nonn et al. (2003)
	<i>TrxR1</i> ^{-/-}	E9.5–10.5	Development retardation and reduced proliferation	Jakupoglu et al. (2005)
	<i>TrxR2</i> ^{-/-}	E13.5	Reduced size and dysplasia of cardiac tissue	Conrad et al. (2004)
	Postnatal defects	<i>Sod1</i> ^{-/-}	20 months	Shorten life span probably due to the development of hepatocarcinomas
<i>Sod1</i> ^{-/-} ; <i>Sod3</i>		20 months	Idem and increased oxidative damage	Sentman et al. (2006)
<i>Sod2</i> ^{-/-}		10 days	Neurodegeneration and enlarged heart	Lebovitz et al. (1996)
<i>Sod2</i> ^{-/-} ; <i>TgSod1</i>		16 days	Idem	Copin et al. (2000)
<i>Cpx1</i> ^{-/-} ; <i>Cpx2</i> ^{-/-}		3 months	Growth retardation, intestine mucosal inflammation, and hypothermia	Esworthy et al. (2001)
<i>Prdx1</i> ^{-/-}		9 months	Short life span, anemia and cancer	Neumann et al. (2003)
<i>Prdx2</i> ^{-/-}		6 weeks	Anaemic and bigger spleen	Lee et al. (2003)
Infertility	<i>Sod1</i> ^{-/-}	Adult female	Reproductive performance affected causing postimplantation embryo death	Matzuk et al. (1998)
	<i>Cas</i> ^{-/-}		Frequently show increased sensitivity to oxidative stress in adult animals	Ho et al. (2004)
Viable	<i>Sod3</i> ^{-/-}			Carisson et al. (1995)
	<i>Cpx1</i> ^{-/-}			Ho et al. (1997)
	<i>Cpx2</i> ^{-/-}			Esworthy et al. (2001)
	<i>Gr</i> ^{-/-}			Rogers et al. (2004)
	<i>Prdx3</i> ^{-/-}			Li et al. (2007)
	<i>Prdx6</i> ^{-/-}			Wang et al. (2003)
	<i>Nox1</i> ^{-/-}			Gavazzi et al. (2006)
	<i>Nox2</i> ^{-/-}			Pollock et al. (1995)
	<i>Nox3</i> ^{-/-}			Paffenholz et al. (2004)

^a The proteins considered here are those directly producing or eliminating ROS. Proteins that indirectly contribute to the control of ROS level and whose deficiency cause embryo lethality are included in Fig. 2.

^b The earliest stage at which the defect was determined.

encoding antioxidant enzymes might indicate a relevant function during development (Table 1), but it cannot definitively establish a role for ROS. The lack of an antioxidant enzyme could increase ROS, damaging cells or turning on a ROS-mediated pathway out of context, consequently altering development. Conversely, mice deficient in several prooxidant and antioxidant enzymes are viable and mild phenotypes are only observed during adulthood (Table 1). However, since animals have evolved multiple systems to control ROS levels, redundancy among different ROS regulatory genes will not be unexpected. Redundancy may occur within the same gene family. For example, since mice null for individual *Nox* are viable, it is possible that different *Nox* are redundant for a specific developmental function.

Most gene function studies of redox regulation have not been directed to understand developmental processes. It has been observed that antioxidant gene overexpression frequently has protective effects upon oxidative stress insults; however, it is important to note that all transgenic mice produced up to date were selected from among viable offsprings (see for instance Raineri et al., 2001 and Schriener et al., 2005). Therefore, disruption of embryo development caused by a decrease in ROS, due to antioxidant enzyme overproduction, has not been evaluated. Furthermore, new genetic strategies have not been applied to study the role of ROS in development. It will be interesting, for instance, to generate conditional mutations in those genes showing early embryo lethality (Table 1) as well as controlled induction in time and space of genes encoding antioxidant enzymes.

Conclusions

Marked metabolic changes occur in cells during development. The ROS production levels in a cell are likely determined by the metabolic activity associated to a particular cellular process. On the other hand, antioxidant activity may be a consequence of the ROS production level. The complex mechanisms that cells have to determine the redox state make it difficult to assign a definitive developmental function to ROS based only upon altering ROS or antioxidant levels. Considering a passive ROS function, it is clear that cells during development are sensitive to damage by ROS. Disruption of development may result from general macromolecular damage that can cause cell death, and also from the oxidation of specific key developmental molecules.

Nearly a century ago, it was proposed that metabolic gradients guided early development (reviewed in Coffman and Denegre, 2007). In aerobiosis, metabolic activity mirrors mitochondrial activity since this organelle produces most of the energy the cell requires. Under this condition, mitochondria are the major ROS source in cells. And although counter-intuitive, hypoxia also induces the production of ROS from mitochondria (Turrens, 2003). Interestingly, mitochondria is asymmetrically distributed in early embryos of several animals, and in some instances this distribution has been associated to axis specification (Coffman and Denegre, 2007). ROS may be the mitochondrial signal that contributes to the correct development of embryos from very early stages. Although this observation supports an active role of ROS in development, a convincing determination of a developmental function depends on evidences indicating a requirement of ROS in specific processes during embryogenesis. Genetic manipulations directed to determine the active functions of ROS may bring light in this difficult task.

The potential influence of metabolic activity and the resulting ROS production on development cannot be dismissed. A function of ROS in development is likely, due to the large amount of evidence showing that ROS can regulate fundamental cellular processes. Furthermore, it is possible that oxidation of specific molecules changes their activity, and in such a way defines the fate of a developing cell. We expect that future research will reveal the reciprocal regulation of signaling

cascades and metabolic pathways during animal development, in which ROS will be a key player.

Acknowledgments

We apologize with those research groups whose work was not included in this review due to the limitation of space. We would like to thank the present and past members of the Laboratory on Tissue Degeneration and Regeneration for the fruitful discussions that contributed to the development of some ideas presented in this review; and to Dr. Christopher Wood for the careful reading of the manuscript and his valuable suggestions. This work was supported by DGAPA (IN218607) and CONACyT (31730-N).

References

- Allen, R.G., Tresini, M., 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol. Med.* 28, 463–499.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 334–346.
- Arbiser, J.L., et al., 2002. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 715–720.
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1825–1835.
- Belousov, V.V., et al., 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods* 3, 281–286.
- Ben Mahdi, M.H., et al., 2000. Focal adhesion kinase regulation by oxidative stress in different cell types. *IUBMB Life* 50, 291–299.
- Bergmann, A., et al., 1996. A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 60, 109–123.
- Bienert, G.P., et al., 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 1183–1192.
- Bras, M., et al., 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 70, 231–239.
- Brown, M.R., et al., 1999. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 85, 524–533.
- Brown, D., et al., 2006. Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9918–9923.
- Burdon, R.H., Rice-Evans, C., 1989. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* 6, 345–358.
- Bushdid, P.B., et al., 1998. Inhibition of NF-kappaB activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature* 392, 615–618.
- Cao, X., et al., 2002. Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired domain by Ref-1 regulates DNA-binding activity of Pax-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 288–293.
- Carlsson, L.M., et al., 1995. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6264–6268.
- Carriere, A., et al., 2004. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.* 279, 40462–40469.
- Chan, K., et al., 1996. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13943–13948.
- Chen, X.L., et al., 2004. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1001–1007.
- Chen, C.C., et al., 2007. Cytotoxicity of TNFalpha is regulated by integrin-mediated matrix signaling. *EMBO J.* 26, 1257–1267.
- Cheng, G., et al., 2006. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J. Biol. Chem.* 281, 17718–17726.
- Cho, Y.M., et al., 2006. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1472–1478.
- Choi, M.H., et al., 2005. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 435, 347–353.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.
- Clough, J.R., 1985. Energy metabolism during mammalian embryogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 77–79.
- Coffman, J.A., Denegre, J.M., 2007. Mitochondria, redox signaling and axis specification in metazoan embryos. *Dev. Biol.* 308, 266–280.
- Conrad, M., et al., 2004. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9414–9423.
- Copin, J.C., et al., 2000. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1571–1576.
- Correa, R.G., et al., 2004. Characterization of NF-kappa B/I kappa B proteins in zebra fish and their involvement in notochord development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5257–5268.
- Covello, K.L., et al., 2006. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557–570.

- Cross, J.V., Templeton, D.J., 2004. Oxidative stress inhibits MEK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem. J.* 381, 675–683.
- Cuervo, R., et al., 2002. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Dev. Biol.* 245, 145–156.
- Curtin, J.F., et al., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* 265, 49–72.
- Dalle-Donne, I., et al., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23–38.
- Dalton, T.P., et al., 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 67–101.
- David, S.S., et al., 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941–950.
- Davies, K.J., 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 48, 41–47.
- DeGennaro, M., Lehmann, R., 2007. Redox regulation of germ cell migration in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 306, 383–384.
- Deshpande, S.S., et al., 2000. Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 14, 1705–1714.
- Djavaheri-Mergny, M., et al., 2004. NF- κ B activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNF α -treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett.* 578, 111–115.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Elchuri, S., et al., 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24, 367–380.
- El Mouatassim, S., et al., 1999. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 720–725.
- Estevez, A.G., et al., 1998. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J. Neurosci.* 18, 923–931.
- Esworthy, R.S., et al., 2001. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G848–855.
- Evans, A.R., et al., 2000. Going APE over ref-1. *Mutat. Res.* 461, 83–108.
- Farmer, S.C., et al., 1997. The bZIP transcription factor LCR-F1 is essential for mesoderm formation in mouse development. *Genes Dev.* 11, 786–798.
- Favreau, L.V., Pickett, C.B., 1995. The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 270, 24468–24474.
- Fleury, C., et al., 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131–141.
- Funato, Y., et al., 2006. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through Dishevelled. *Nat. Cell Biol.* 8, 501–508.
- Galang, C.K., Hauser, C.A., 1993. Cooperative DNA binding of the human HoxB5 (Hox-2.1) protein is under redox regulation in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4609–4617.
- Gardiner, C.S., Reed, D.J., 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 51, 1307–1314.
- Gavazzi, C., et al., 2006. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* 580, 497–504.
- Gehring, W.J., et al., 1994. Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 487–526.
- Giannoni, E., et al., 2005. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6391–6403.
- Grossmann, M., et al., 1999. The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11848–11853.
- Gu, W., Hecht, N.B., 1996. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J. Androl.* 17, 256–262.
- Guo, Y., et al., 2004. Redox regulation of the embryonic stem cell transcription factor Oct-4 by thioredoxin. *Stem Cells* 22, 259–264.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 145–225.
- Harfouche, R., et al., 2005. Roles of reactive oxygen species in angiotensin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J.* 19, 1728–1730.
- Harris, A.L., 2002. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47.
- Hernández-García, D., et al., 2008. Cell death activation during cavitation of embryoid bodies is mediated by hydrogen peroxide. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.005
- Herr, W., Cleary, M.A., 1995. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 1679–1693.
- Hiyota, K., et al., 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3633–3638.
- Ho, Y.S., et al., 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 16644–16651.
- Ho, Y.S., et al., 2004. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem.* 279, 32804–32812.
- Holmgren, A., et al., 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1375–1377.
- Hosaka, T., et al., 2004. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2975–2980.
- Hughes, G., et al., 2005. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem. J.* 389, 83–89.
- Humphries, K.M., et al., 2005. Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J. Biol. Chem.* 280, 2750–2758.
- Ikebuchi, Y., et al., 1991. Superoxide anion increases intracellular pH, intracellular free calcium, and arachidonate release in human amnion cells. *J. Biol. Chem.* 266, 13233–13237.
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free. Radic. Biol. Med.* 34, 145–169.
- Imai, H., et al., 2001. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* 64, 674–683.
- Imai, H., et al., 2003. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 278–286.
- Jaiswal, A.K., 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1199–1207.
- Jakupoglu, C., et al., 2005. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1980–1988.
- Jimenez, A., et al., 2004. Spermatozoa-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 34971–34982.
- Jin, L.H., et al., 2003. Human liver catalase: cloning, expression and characterization of monoclonal antibodies. *Mol. Cells* 15, 381–386.
- Kamata, H., et al., 2005a. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649–661.
- Kamata, H., et al., 2005b. Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 16–25.
- Kanegae, Y., et al., 1998. Role of Rel/NF- κ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature* 392, 611–614.
- Kirkland, R.A., et al., 2002. A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J. Neurosci.* 22, 6480–6490.
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* 32, 44–50.
- Klotz, L.O., et al., 2003. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 88–94.
- Kuzin, B., et al., 1996. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 639–649.
- Lalucque, H., Silar, P., 2003. NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol.* 11, 9–12.
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189.
- Lassegue, B., Clempus, R.E., 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R277–297.
- Lebovitz, R.M., et al., 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9782–9787.
- Lee, S.R., et al., 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342.
- Lee, I.H., et al., 2003. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 101, 5033–5038.
- Lee, N.K., et al., 2005. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 106, 852–859.
- Leung, L., et al., 2003. Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 48021–48029.
- Leyens, G., et al., 2004. Peroxiredoxin 6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation: role of intercellular communication. *Biol. Reprod.* 71, 1646–1651.
- Li, K., et al., 2000. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101, 389–399.
- Li, J., et al., 2006. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol. Biol. Cell* 17, 3978–3988.
- Li, L., et al., 2007. Increased susceptibility of MERS (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 715–721.
- Lickteig, K., et al., 1996. Effects of oxidation and reduction on the binding of transcription factors to cis-regulatory elements located in the FGF-4 gene. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 146–152.
- Lu, S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13, 1169–1183.
- Luberda, Z., 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 5, 5–17.
- Lundberg, M., et al., 2001. Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 26269–26275.
- Maier, C.M., Chan, P.H., 2002. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8, 323–334.
- Manak, J.R., Scott, M.P., 1994. A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Dev. Suppl.* 61–77.
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15.
- Matsui, M., et al., 1996. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179–185.
- Matzuk, M.M., et al., 1998. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology* 139, 4008–4011.
- Miranda-Vizuete, A., et al., 2003. Cloning and developmental analysis of murid

- spermatid-specific thioredoxin-2 (SPTRX-2), a novel sperm fibrous sheath protein and autoantigen. *J. Biol. Chem.* 278, 44874–44885.
- Morrison, S.J., et al., 2000. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathetic differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* 20, 7370–7376.
- Nakamura, H., 2005. Thioredoxin and its related molecules: update 2005. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 823–828.
- Nakashima, I., et al., 2005. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 3–10.
- Natsuyama, S., et al., 1993. Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block. *Biochim. Biophys. Acta* 1176, 90–94.
- Neumann, C.A., et al., 2003. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424, 561–565.
- Nonn, L., et al., 2003. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 916–922.
- Nonogaki, T., et al., 1992. Effects of superoxide dismutase on mouse *in vitro* fertilization and embryo culture system. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9, 274–280.
- O'Brien, P.J., 2000. Peroxidases. *Chem. Biol. Interact.* 129, 113–139.
- Paffenholz, R., et al., 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* 18, 486–491.
- Park, H.S., et al., 2000. Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J. Biol. Chem.* 275, 2527–2531.
- Philips, J.P., et al., 1989. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2761–2765.
- Pletjushkina, O.Y., et al., 2005. Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion. *Cell Death Differ.* 12, 1442–1444.
- Pohl, T., et al., 2002. The combined absence of NF- κ B and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4514–4519.
- Pollock, J.D., et al., 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* 9, 202–209.
- Puglisi, R., et al., 2005. PHGPx in spermatogenesis: how many functions? *Contraception* 72, 291–293.
- Raineri, L., et al., 2001. Strain-dependent high-level expression of a transgene for manganese superoxide dismutase is associated with growth retardation and decreased fertility. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1018–1030.
- Rao, G.N., Berk, B.C., 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 70, 593–599.
- Regulski, M., et al., 2004. Essential function of nitric oxide synthase in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 14, R881–882.
- Rhee, S.G., 2006. Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312, 1882–1883.
- Rigoni, P., et al., 1993. Conserved cysteine residues of Oct-2 POU domain confer sensitivity to oxidation but are dispensable for sequence-specific DNA binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1173, 141–146.
- Rikans, L.E., Hornbrook, K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1362, 116–127.
- Robson, E.J., et al., 2006. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 52–62.
- Rodriguez-Gonzalez, E., et al., 2003. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 65, 446–453.
- Rogers, L.I.C., et al., 2004. Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. *Toxicol. Sci.* 82, 367–373.
- Ruiz-Gines, J.A., et al., 2000. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, 109–113.
- Sablina, A.A., et al., 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11, 1306–1313.
- Saitoh, M., et al., 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17, 2596–2606.
- Salas-Vidal, E., et al., 1998. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp. Cell Res.* 238, 136–147.
- Salz, H.K., et al., 1994. The *Drosophila* maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development. *Genetics* 136, 1075–1086.
- Sanchez-Carbente, M.R., et al., 2005. Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. *Cell Death Differ.* 12, 279–291.
- Sauer, H., Wartenberg, M., 2005. Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1423–1434.
- Sauer, H., et al., 2000. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 476, 218–223.
- Scherz-Shouval, R., Elazar, Z., 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 17, 422–427.
- Schmelter, M., et al., 2006. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J.* 20, 1182–1184.
- Schmidt-Ullrich, R., et al., 2001. Requirement of NF- κ B/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendages. *Development* 128, 3843–3853.
- Schnabel, D., et al., 2006. Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Dev. Biol.* 291, 291–299.
- Schriner, S.E., et al., 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909–1911.
- Sentman, M.L., et al., 2006. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 281, 6904–6909.
- Shan, S.W., et al., 2005. Comparative proteomic analysis identifies protein disulfide isomerase and peroxiredoxin 1 as new players involved in embryonic interdigital cell death. *Dev. Dyn.* 233, 266–281.
- Shen, H.M., Peivaiz, S., 2006. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* 20, 1589–1598.
- Shi, Z.Z., et al., 2000. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5101–5106.
- Shi, M., et al., 2004. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Hypertens.* 17, 450–456.
- Shibata, Y., et al., 2003. Redox regulation of germline and vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 302, 1779–1782.
- Smith, A.G., et al., 1998. Redox regulation of Brn-2/N-Oct-3 POU domain DNA binding activity and proteolytic formation of N-Oct-5 during melanoma cell nuclear extraction. *Melanoma Res.* 8, 2–10.
- Smith, J., et al., 2000. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10032–10037.
- Soberman, R.J., Christmas, P., 2003. The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J. Clin. Invest.* 111, 1107–1113.
- Studer, L., et al., 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* 20, 7377–7383.
- Suh, E., et al., 1994. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7340–7351.
- Sun, Y., Oberley, L.W., 1996. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 335–348.
- Suzukawa, K., et al., 2000. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 275, 13175–13178.
- Taddei, M.L., et al., 2007. Integrin-mediated cell adhesion and spreading engage different sources of reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 469–481.
- Tammariello, S.P., et al., 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 20, RC53.
- Tell, G., et al., 1998a. Ref-1 controls pax-8 DNA-binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 178–183.
- Tell, G., et al., 1998b. Redox potential controls the structure and DNA binding activity of the paired domain. *J. Biol. Chem.* 273, 25062–25072.
- Tell, G., et al., 2000. An 'environment to nucleus' signaling system operates in B lymphocytes: redox status modulates BSAP/Pax-5 activation through Ref-1 nuclear translocation. *Nucleic Acids Res.* 28, 1099–1105.
- Thannickal, V.J., et al., 2000. Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF- β 1. *FASEB J* 14, 1741–1748.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005–1028.
- Thomas, M., et al., 1997. A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 14), 1597–1602.
- Tothova, Z., et al., 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128, 325–339.
- Tsatmalis, M., et al., 2005. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res.* 1040, 137–150.
- Tsatmalis, M., et al., 2006. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 345–357.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.
- Ueda, S., et al., 2002. Redox control of cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 405–414.
- Ushio-Fukai, M., et al., 2002. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ. Res.* 91, 1160–1167.
- Ventura, J.J., et al., 2004. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev.* 18, 2905–2915.
- Waghray, M., et al., 2005. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J.* 19, 854–856.
- Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 295–332.
- Wang, X., et al., 2003. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 25179–25190.
- Wood, Z.A., et al., 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Wu, G., et al., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134, 489–492.
- Xanthoudakis, S., et al., 1992. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* 11, 3323–3335.
- Xanthoudakis, S., et al., 1996. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8919–8923.
- Yant, L.J., et al., 2003. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 496–502.
- Yu, Y., et al., 2002. Developmental expression of spermatid-specific thioredoxin-1 protein: transient association to the longitudinal columns of the fibrous sheath during sperm tail formation. *Biol. Reprod.* 67, 1546–1554.