

Tesis Doctoral

Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por una injuria hipóxica prenatal

Giusti, Sebastián

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giusti, Sebastián. (2009). Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por una injuria hipóxica prenatal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giusti, Sebastián. "Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por una injuria hipóxica prenatal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y
Celular

**MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN LA MUERTE NEURONAL
INDUCIDA POR UNA INJURIA HIPÓXICA
PRENATAL**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

SEBASTIÁN GIUSTI

Director de Tesis: **Dra. Sara Fiszer de Plazas**

Consejero de Estudios: **Dra. Lidia Szczupak**

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias 'Prof.
Dr. E. De Robertis' (IBCN-CONICET). Facultad de Medicina - UBA

BUENOS AIRES, 2009

a D.

Agradecimientos

A la Dra. Sara Fiszer de Plazas, por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación y comenzar mi formación con autonomía. Por su aliento a un crecimiento constante.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Vic, Euge y Anto. Además de crear un clima de colaboración en las mesadas, hacen del trabajo un lugar cálido y muy divertido.

A los que me acompañaron en los primeros momentos: Mari, cuánto aprendí de vos! Diego y Alba, gracias por su ayuda.

A Trini, Laura, Paula y Tamara. Gracias por su afecto

A la Dra. Alicia Brusco por su acompañamiento en la docencia y su ardua tarea dentro del Instituto.

A Marga y Mariana, por su amable colaboración con la microscopía electrónica

A todos los miembros del Instituto y la Cátedra que con su trabajo y afecto han hecho de esta tarea algo muy grato

Muchas gracias por todo, de corazón.

Índice general

Anexo: Índice de figuras	I
Anexo: Índice de tablas	II
Abreviaturas	III
Resumen	IV
Summary	V

Introducción

1. Daños cerebrales producidos por hipoxia-isquemia	1
2. Apoptosis y necrosis en células del SNC inducidas por hipoxia-isquemia	2
3. Mecanismos moleculares del daño hipóxico-isquémico	5
3.1 Excitotoxicidad	5
3.2 Especies reactivas	7
3.2.1 Clases y fuentes de ROS celulares	8
3.2.2 Especies reactivas del nitrógeno: óxido nítrico y peroxinitrito	10
3.2.2.1 Generación de NO: Las óxido nítrico sintasas	13
3.2.2.2 Óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS)	15
3.2.2.3 Efectos del óxido nítrico sobre la mitocondria	16
4. Neuroprotección por preconditionamiento hipóxico	17
5. Factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)	19
5.1 Regulación de HIF por medio de HIF-prolil hidroxilasas	22
6. Modelo de trabajo	25
6.1 El lóbulo óptico	27

Objetivos

Objetivos generales y específicos	30
-----------------------------------	----

Materiales y Métodos

1. Animales	32
2. Tratamiento hipóxico	32
3. Diseño experimental	33
4. Administración <i>in vivo</i> de fármacos	35
5. Fraccionamiento subcelular	35
5.1 Aislamiento y purificación de mitocondrias	35

5.2 Obtención de fracciones citosólicas	36
5.3 Purificación de núcleos y obtención de fracciones nucleares solubles	36
6. Método de Lowry	37
7. Ensayo de TBARS (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)	38
8. Western blot	38
8.1 Anticuerpos utilizados	39
9. Medición de actividad de la NOS	39
10. Medición de actividad NADH-ubiquinona oxidoreductasa	40
11. Medición de actividad citocromo c oxidasa	40
11.1 Preparación de citocromo c reducido	40
12. Medición de la actividad lactato deshidrogenasa	41
13. Secciones histológicas parafinadas	41
14. Inmunofluorescencia	41
15. Técnica de TUNEL	42
16. Conteo de células	42
17. Microscopía electrónica	42
18. Inmunomarcación con oro	43
19. Análisis de los datos	43

Resultados

1. La hipoxia-reoxigenación induce un incremento en los índices de stress oxidativo	46
2. La hipoxia-reoxigenación induce la translocación de citocromo c al citosol	49
3. Cambios ultraestructurales en las mitocondrias inducidos por hipoxia-reoxigenación	50
4. La hipoxia incrementa la expresión de mtNOS, pero no la expresión de nNOS citosólica o total	52
5. La hipoxia-reoxigenación incrementa la nitración de proteínas mitocondriales	53
6. La hipoxia-reoxigenación produce una inhibición de la tasa de transferencia de electrones	54
7. Los daños bioquímicos y ultraestructurales de las mitocondrias, inducidos por la hipoxia, son dependientes de NO	56
8. La administración de 7-NI, inhibidor específico de nNOS, posee efectos neuroprotectores	58
9. El preconditionamiento hipóxico posee efectos Neuroprotectores	60
10. Optimización de un método de fraccionamiento subcelular para obtener fracciones nucleares puras a partir de tejido nervioso embrionario	62

11. La centrifugación de baja velocidad separa los contaminantes de alta densidad	64
12. El agregado de SDS mejora el rendimiento durante la extracción proteica	64
13. La sedimentación a través del gradiente de sacarosa remueve membranas mitocondriales y del retículo endoplasmático	66
14. El pellet de núcleos puros (PNF) y la fracción nuclear soluble (SFN) derivada de ella son adecuados para ensayar la activación de factores de transcripción	67
15. Cinética de activación de HIF-1 α	68
16. El preconditionamiento intensifica la inducción de HIF-1 α provocada por la hipoxia	71
17. La inducción de HIF-1 durante el preconditionamiento es necesaria para que se produzca neuroprotección	75
18. Efecto conjunto del preconditionamiento hipóxico y la administración de 7-NI sobre la muerte celular apoptótica	78

Discusión

1. Activación de la vía apoptótica intrínseca inducida por hipoxia	81
2. Daños bioquímicos y estructurales dependientes de NO en las mitocondrias del SNC luego de un evento hipóxico.	83
3. Obtención de fracciones nucleares solubles puras	90
4. El rol de HIF-1 en la neuroprotección por preconditionamiento	92
5. Efecto conjunto del 7-NI y el preconditionamiento hipóxico sobre la muerte celular inducida por hipoxia	97

Conclusiones	100
---------------------	-----

Publicaciones	102
----------------------	-----

Referencias	103
--------------------	-----

Anexo I: Índice de figuras

Figura 1. Reacción de síntesis de óxido nítrico	14
Figura 2. Regulación de HIF-1 α por hidroxilación de prolinas	21
Figura 3. Reacción catalizada por las HIF-prolil hidroxilasas	23
Figura 4. Factores que regulan la actividad de las HIF-prolil hidroxilasas	24
Figura 5. Modelo de trabajo	27
Figura 6. Diseños experimentales utilizados	34
Figura 7. Daños oxidativos en el ADN inducidos por hipoxia/reoxigenación	47
Figura 8. Localización nuclear y mitocondrial de los daños oxidativos en el ADN	48
Figura 9. Cinética de liberación de citocromo c	49
Figura 10. La hipoxia-reoxigenación produce cambios ultraestructurales en las mitocondrias	51
Figura 11. Inducción de mtNOS luego de hipoxia-reoxigenación	52
Figura 12. Nitración de proteínas mitocondriales	53
Figura 13. Inhibición del complejo I inducida por hipoxia-reoxigenación	55
Figura 14. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de inhibidores de NOS sobre la inhibición del complejo I inducida por hipoxia-reoxigenación	56
Figura 15. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de inhibidores de NOS sobre los daños ultraestructurales inducidos por la hipoxia	57
Figura 16. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de inhibidores de NOS sobre la muerte celular inducida por la hipoxia	59

Figura 17. Efecto del acondicionamiento hipóxico sobre la muerte celular inducida por la hipoxia	61
Figura 18. Diagrama esquemático ilustrando el método para obtener una fracción nuclear soluble a partir de tejido nervioso embrionario	63
Figura 19. Análisis morfológico de los pellets	65
Figura 20. Análisis inmunológico de pureza de SFN	66
Figura 21. Cuantificación de factores de transcripción activos mediante inmunomarcación con oro	67
Figura 22. Cuantificación de factores de transcripción activos mediante western blot	68
Figura 23. Cinética de activación de HIF-1 α	69
Figura 24. Activación de HIF-1 α luego de la hipoxia	70
Figura 25. Efecto del acondicionamiento <i>per se</i> sobre la inducción de HIF-1 α	71
Figura 26. Efecto del acondicionamiento sobre la inducción de HIF-1 α mediada por hipoxia	72
Figura 27. El acondicionamiento con CoCl ₂ intensifica la inducción de HIF-1 luego de la injuria hipóxica	73
Figura 28. Efecto de Fe ²⁺ y ascorbato sobre la acumulación de HIF-1 durante el acondicionamiento	74
Figura 29. Efecto de moduladores positivos y negativos de HIF-1 sobre la liberación de citocromo c	76
Figura 30. Efecto de moduladores positivos y negativos de HIF-1 sobre la fragmentación del ADN	77
Figura 31. Efecto conjunto del acondicionamiento hipóxico y 7-NI sobre la muerte celular inducida por la hipoxia	79

Anexo II: Índice de tablas

Tabla 1. Daños oxidativos en lípidos inducidos por hipoxia-reoxigenación	46
Tabla 2. Área ocupada por cada mitocondria	50
Tabla 3. Efecto del SDS sobre el rendimiento de la extracción	64

Abreviaturas

H-I: hipoxia-isquemia
DE: día embrionario
LO: lóbulo óptico
TO: tectum óptico
ROS: (*reactive oxygen species*), especies reactivas del oxígeno
RNS: (*reactive nitrogen species*), especies reactivas del nitrógeno.
8dOHG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
TBARS: (*thiobarbituric acid reactive substances*) sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
cyt c: citocromo c
O₂⁻: anión superóxido
OH•: radical hidroxilo
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
NO: óxido nítrico
ONOO⁻: peroxinitrito
NOS: óxido nítrico sintasa
nNOS: NOS neuronal
mtNOS: NOS mitocondrial
L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina-metil ester
7-NI: 7-nitroindazol
NADH: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
VDAC: (*voltage dependent anion channel*)
TUNEL: (*TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling*)
HIF: (*hypoxia inducible factor*) factor inducible por hipoxia
PHD: HIF-prolil hidoxilasa
CoCl₂: cloruro de cobalto
HDC: (*high density contaminants*) contaminantes de alta densidad
NEF: (*nuclear enriched fraction*) fracción enriquecida en núcleos
PNF: (*purified nuclear fraction*) fracción nuclear purificada
SNF: (*soluble nuclear fraction*) fracción nuclear soluble
IF: (*insoluble fraction*) fracción insoluble

Resumen

**MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA MUERTE
NEURONAL INDUCIDA POR UNA INJURIA HIPÓXICA PRENATAL**

En la presente Tesis hemos utilizado un modelo experimental de hipoxia aguda normobárica en embriones de aves, con el objetivo de elucidar las vías moleculares y eventos de señalización celular que forman parte de los mecanismos de injuria y neuroprotección ante un daño hipóxico en el SNC en desarrollo.

Los resultados obtenidos han demostrado que la hipoxia induce un incremento en los marcadores de stress oxidativo y activa la vía apoptótica intrínseca. La muerte apoptótica se encuentra precedida por una inducción de óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), daños ultraestructurales e inhibición del complejo I mitocondriales - ambos cambios dependientes de óxido nítrico.

En segundo lugar, se ha establecido que el acondicionamiento con un estímulo hipóxico de baja intensidad, confiere tolerancia parcial a una injuria hipóxico más severa 24 h después. Mediante la administración de moduladores de las HIF-prolil hidroxilasas, demostramos que la acumulación de HIF-1 durante el acondicionamiento es necesaria para que se manifieste la tolerancia a una injuria hipóxico posterior.

Por último, observamos que la administración de inhibidores selectivos de nNOS/mtNOS y el acondicionamiento hipóxico, aplicados en forma conjunta, tuvieron un efecto aditivo, logrando una neuroprotección completa. Los resultados obtenidos sugieren que los efectos neuroprotectores de los inhibidores selectivos de nNOS/mtNOS en nuestro modelo se deben a efectos independientes de la acción de NO sobre la vía de HIF-1.

Palabras clave: *hipoxia - SNC en desarrollo - apoptosis - neuroprotección - óxido nítrico sintasa mitocondrial - acondicionamiento hipóxico.*

Summary

**CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN NEURONAL DEATH
INDUCED BY A PRENATAL HYPOXIC INJURY**

In the present Thesis, a chick embryo model of normobaric acute hypoxia has been used to elucidate the molecular pathways underlying injury and neuroprotection events after a hypoxic insult in developing CNS.

Our results demonstrate that in our model hypoxia increases oxidative stress markers and activates the intrinsic apoptotic pathway. Apoptotic cell death is preceded by the up-regulation of mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS), and NO-dependent ultrastructural damage and complex I inhibition.

Besides, we have determined that a mild hypoxic event confers partial tolerance to a subsequent strong hypoxic injury 24 h later (hypoxic preconditioning). Using modulators of HIF-prolyl hydroxylases, we have demonstrated that HIF-1 up-regulation during preconditioning is essential to afford neuroprotection.

To conclude, we have observed that administration of nNOS/mtNOS specific inhibitors and hypoxic preconditioning had additive effects on neuroprotection. Our results suggest that neuroprotective effects of nNOS/mtNOS inhibitors do not rely on interactions of NO with HIF-1 pathway.

Keywords: *hypoxia - developing CNS - apoptosis - neuroprotection - mitochondrial nitric oxide synthase - hypoxic preconditioning.*

Introducción

1. Daños cerebrales producidos por hipoxia-isquemia

El daño cerebral producido por un evento de hipoxia-isquemia (H-I) es una causa frecuente de daño cerebral durante el período fetal/neonatal, afectando entre 1 y 6 individuos por cada 1000 nacidos vivos (Ferriero, 2004). Los daños provocados por una H-I en regiones específicas del cerebro inmaduro, en especial durante los periodos prenatales o neonatales, tienen un profundo impacto en la maduración cerebral subsiguiente ya que se producen durante las etapas críticas de diferenciación celular y tisular. Por esta razón, el daño producido por una H-I en neonatos es uno de los principales factores de riesgo para varios desórdenes neurológicos graves en humanos, tales como discapacidades motoras y de aprendizaje, parálisis cerebral, epilepsia, convulsiones e incluso la muerte (Hossain, 2008). Los sobrevivientes suelen presentar discapacidades sensoriales, motoras y cognitivas, para las que no hay actualmente terapias promisorias (Johnston, 1997; Northington *et al.*, 2001a).

Los altos requerimientos energéticos en comparación con las bajas reservas energéticas hacen al cerebro particularmente vulnerable a condiciones hipóxicas. Dentro del tejido nervioso las neuronas son el tipo celular más sensible a la falta de oxígeno. El aporte insuficiente de este gas (hipoxia) y/o un flujo sanguíneo escaso (isquemia) en áreas específicas del cerebro en desarrollo, conduce a un daño cerebral mediado por la activación de diversos agentes citotóxicos y vías de muerte celular que en última instancia inducen el daño y la muerte neuronal (Barks & Silverstein, 1992; Martin *et al.*, 1997; Johnston, 2001).

La muerte celular luego de una H-I se caracteriza por un retraso temporal entre el momento de la injuria y la manifestación del daño celular (Balduini *et al.*, 2004). Este retardo temporal es muy variable y depende de la intensidad de la injuria y de la región cerebral afectada. En algunos casos el daño se manifiesta luego de algunos días o incluso semanas (Kirino *et al.*, 1984; Du *et al.*, 1996), mientras que en otros

ocurre al cabo de unas pocas horas (McGee-Russell *et al.*, 1970). Se ha establecido que, en tanto que el resto de los factores se mantengan iguales, mientras mayor sea la carencia energética, menor será el tiempo que tarda el daño en manifestarse (Lipton, 1999).

Este retraso entre la injuria y la producción efectiva de la muerte celular define una ventana temporal que brinda la oportunidad para realizar una intervención farmacológica efectiva. En general, las vías moleculares involucradas en la muerte neuronal luego de una H-I prenatal son similares a aquellas asociadas con la muerte celular apoptótica en otros tejidos. Sin embargo, considerando la gama de moléculas expresada en neuronas y en células gliales, es posible que moléculas diferencialmente expresadas en el SNC sean críticas para la progresión del daño observado. Estas particularidades sólo han comenzado recientemente a ser identificadas por medio de nuevas técnicas como los *arrays* de ADN (Curristin *et al.*, 2002).

Los mecanismos que contribuyen al daño retrasado en el tiempo incluyen alteraciones funcionales de la neurotransmisión glutamatérgica, cambios mediados por radicales libres, alteraciones en las vías de transducción de señales y modificaciones complejas en los patrones de expresión génica que conducen, en el peor de los casos, a la muerte celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen al daño y la muerte neuronal luego de una H-I no están aún completamente elucidados (LaManna, 2007; Taoufik & Probert, 2008).

2. Apoptosis y necrosis en células del SNC inducidas por hipoxia-isquemia

La evidencia acumulada hasta el momento indica que la muerte celular luego de una H-I puede ser de tipo necrótica y/o apoptótica dependiendo de la intensidad del daño y de su localización (Martin *et al.*, 1998). La muerte celular que se

produce de manera temprana luego de una H-I suele ser necrótica (daño primario) (Northington *et al.*, 2001b), en tanto que la muerte neuronal retrasada en el tiempo (daño secundario), que ocurre horas o días después a través de una serie compleja de eventos bioquímicos y moleculares altamente regulados, conducen a la apoptosis (Leist & Nicotera, 1998).

Cuando la hipoxia global o la isquemia son prolongadas, la muerte celular tiende a ser de tipo necrótica (Petito *et al.*, 1997). También es de tipo necrótica la muerte celular en la región central del sector cerebral infartado (*core* isquémico) a no ser que la duración de la H-I sea muy breve. La necrosis se caracteriza por el *swelling* irreversible del citoplasma y sus organelas y la pérdida de la integridad de membrana que provoca la lisis celular conduciendo a la inflamación del tejido circundante. Las características morfológicas más prominente de la muerte celular necrótica observada en muchos modelos de isquemia incluyen el encogimiento celular, la vacuolización del citoplasma debido a la dilatación de mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi y la desorganización de los microtúbulos (Brown, 1977).

Sin embargo, se ha determinado en muchos paradigmas experimentales que la apoptosis es responsable de una proporción significativa de pérdida celular luego de un evento de H-I (Delivoria-Papadopoulos & Mishra, 2000; Russell *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007).

La apoptosis, caracterizada por primera vez por Kerr y colaboradores (Kerr *et al.*, 1972), es un tipo de muerte celular programada fisiológicamente y definida por cambios morfológicos resultantes de la activación de cascadas de señalización específicas. Fenotípicamente, los núcleos apoptóticos exhiben condensación de su cromatina y fragmentación del ADN, en tanto que las células se encojen y la membrana plasmática presenta elevaciones irregulares (*blebbing*). Luego, las células se rompen en una serie cuerpos apoptóticos recubiertos de membrana, que previenen el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria

debida a la presencia de enzimas citosólicas en el medio extracelular (Edinger & Thompson, 2004).

La apoptosis es un proceso ATP-dependiente que puede ocurrir a través de dos vías moleculares principales denominadas 'vía extrínseca' y 'vía intrínseca', que conducen en última instancia a la activación de una familia de cisteín proteasas denominadas caspasas (Aggarwal *et al.*, 1999; Bender *et al.*, 2005; Stefanis, 2005). La vía extrínseca, también llamada apoptosis mediada por receptor, comúnmente involucra a los receptores de Fas ligando y TNF α mediando la organización del complejo DISC (*death-inducing signaling complex*) que a su vez recluta a proteínas intracelulares tales como FADD y TRADD asociada a TNF-R1 (Bender *et al.*, 2005). Estas proteínas actúan como adaptadores que reclutan a pro-caspasa 8, una caspasa iniciadora, promoviendo su activación. Caspasa 8 a su vez promueve la actividad de caspasas efectoras (i.e caspasas 3 y 7), que activan a las enzimas responsables de la fragmentación de la cromatina y del desensamblaje funcional de la célula (Stefanis, 2005). La vía intrínseca, o vía mitocondrial, implica la liberación de citocromo c del espacio intermembrana al citosol, donde interactúa con dATP, Apaf-1 y pro-caspasa 9 (una caspasa iniciadora) para formar el apoptosoma. Esta asociación promueve el clivaje y la activación de caspasa 9 que, como caspasa 8, activa a las caspasas efectoras que llevarán a cabo el desensamblaje organizado de los componentes celulares (Rao *et al.*, 2002).

Es ahora evidente que el programa intrínseco de suicidio celular no sólo es requerido para el desarrollo normal del SNC, sino que también contribuye a la fisiopatología de diversos daños, entre ellos, a los asociados a eventos de H-I en neonatos (Rami *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2004).

La apoptosis puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, y muchas de las condiciones que se presentan en la H-I son capaces de inducir apoptosis en diversos tipos celulares (Nakajima *et al.*, 2000). Estas condiciones incluyen la generación de radicales libres del oxígeno (Ratan *et al.*, 1994;

Jacobson, 1996), y del nitrógeno (Nicotera *et al.*, 1995), actividad mitocondrial reducida y despolarización de la membrana (Wolvetang *et al.*, 1994; Zamzami *et al.*, 1996) , incremento de Ca^{2+} intracelular (Kataoka *et al.*, 1995), y activación de calpaína (Squier *et al.*, 1994). Numerosos estudios sostienen que la vía intrínseca es la predominante en neuronas luego de un evento de H-I (Pettmann & Henderson, 1998).

Para nuestra argumentación, cabe preguntarse en qué medida este programa de cambios ha sido cooptado por la muerte celular hipóxico-isquémica. En otras palabras, cuáles son los eventos moleculares iniciados por la H-I y sus moduladores, que determinan la supervivencia celular o el desenlace en muerte celular apoptótica.

3. Mecanismos moleculares del daño hipóxico-isquémico

3.1 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad fue inicialmente descrita en neuronas de retina que degeneraban luego de de una exposición sostenida al glutamato (Lucas & Newhouse, 1957) o a otros aminoácidos excitatorios que normalmente actúan sobre neuronas del SNC (Olney, 1971). Se ha demostrado que un evento de H-I puede desencadenar un proceso excitotóxico

El evento primario durante la H-I es la inhibición de la cadena de transporte de electrones por falta de oxígeno, el último aceptor de la cadena. En consecuencia, se inhibe la fosforilación oxidativa y esto se acompaña un rápido descenso de los niveles de fosfatos de alta energía. Sin disponibilidad de ATP, disminuye la actividad de la bomba de Na^+/K^+ , conduciendo a la despolarización de la membrana (Martin *et al.*, 1994; Silver *et al.*, 1997). Estos cambios, muy dramáticos durante las isquemias globales y en el core de las isquemias focales, suelen tener una intensidad disminuida en las lesiones puramente hipóxicas y en la penumbra de las isquemias focales.

Estos cambios que constituyen probablemente la base del daño posterior, no son en sí mismos efectores de daño molecular. En ese sentido son considerados iniciadores del daño.

En neuronas, la pérdida de los gradientes iónicos se asocia con un incremento importante y sostenido de las concentraciones extracelulares de glutamato y otros neurotransmisores (Phillis *et al.*, 1996). Esto inicia una retroalimentación positiva en la que el exceso de glutamato evoca potenciales despolarizantes en las neuronas postsinápticas activando a sus receptores AMPA, kainato y NMDA (Loeliger *et al.*, 2003). Los bajos niveles de actividad de los transportadores responsables de la recaptación, debidos a la escases de ATP, amplifican el impacto de los niveles excesivos de neurotransmisores en el espacio sináptico. La despolarización también puede conducir a la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, con el consecuente incremento en los niveles intracelulares de calcio que desencadena, a su vez, una serie de desarreglos metabólicos conocidos como proceso excitotóxico, que tiene un impacto negativo en el destino celular (Choi, 1995; Orrenius *et al.*, 2003). Estos procesos incluyen (i) la degradación de proteínas del citoesqueleto y de la matriz extracelular tales como espectrina, actina y laminina, (ii) disfunción mitocondrial, (iii) activación de óxido nítrico sintasas, (vi) y un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (Kermer *et al.*, 1999; Mattson *et al.*, 2000).

El modelo que sustenta a la activación de los receptores NMDA y la entrada masiva de calcio son eventos centrales en el daño cerebral isquémico, se encuentra avalado por la efectividad de los antagonistas de NMDA y bloqueantes de calcio en modelos animales de injuria isquémica (Chen *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1995). Esto condujo al desarrollo farmacéutico de drogas antagonistas del receptor NMDA que fueron luego puestas prueba en ensayos clínicos. Los resultados de los ensayos clínicos mostraron que la mayoría de los bloqueantes de NMDA y de los antagonistas de canales de calcio fueron ineficaces, poseían efectos adversos y en algunos casos empeoraban el cuadro clínico

(Kermer *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999), sugiriendo que la activación del receptor NMDA no sería el mecanismo predominante de la muerte celular isquémica. Evidencias recientes han demostrado que los efectos deletéreos de la activación del receptor podrían señalar y activar más tardíamente mecanismos de reparación. Según este modelo, la señalización vía NMDA es bifásica, siendo su activación temprana nociva para las neuronas pero requerida en etapas más tardías para la neuroplasticidad y protección contra la apoptosis (Young *et al.*, 1999; Ikonomidou *et al.*, 2000). Los resultados negativos de otro ensayo clínico dirigido contra radicales libres (ensayos SAINT) también fueron atribuidos a que cantidades homeostáticas de NO son necesarios para el restablecimiento del flujo sanguíneo en la penumbra. Dada la naturaleza bifásica de las señales moleculares que median la excitotoxicidad, no es sorprendente que el bloqueo de los receptores NMDA, el influjo de calcio y la producción de ROS no son las estrategias óptimas para el tratamiento de los accidentes cerebrovasculares. Además, estos resultados contribuyen a suponer que otros mediadores son importantes y deben ser considerados cuando se diseñan estrategias de neuroprotección.

3.2 Especies reactivas

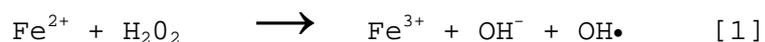
Desde sugerencias tempranas de Siesjo (Siesjo, 1981), el rol de las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en el daño celular isquémico han sido extensamente estudiados. Normalmente, las tasas de producción y eliminación de radicales libres son iguales entre sí, generando una concentración de estado estacionario que es tolerada por la célula. La isquemia crea condiciones propicias que pueden dar cuenta del incremento neto en la producción de especies reactivas (Freeman & Crapo, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1984; Ikeda & Long, 1990).

Los radicales libres y las especies reactivas no radicalarias derivadas de ellos, que incluyen a las especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y a las especies reactivas del nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*),

existen en células y tejidos en concentraciones bajas pero medibles (Sies, 1993). Sus concentraciones de estado estacionario están determinadas por sus tasas de producción y sus velocidades de eliminación. Se ha observado que bajo condiciones normales, todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células que es preservado por un conjunto de enzimas y otros compuestos antioxidantes que mantienen el estado reducido. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias se genera un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la capacidad de un sistema biológico de detoxificarlas, una condición denominada stress oxidativo (Droge, 2002).

3.2.1 Clases y fuentes de ROS celulares

El oxígeno diatómico es una molécula relativamente no reactiva que adquiere una alta reactividad ganando un electrón para convertirse en anión superóxido (O_2^-), dos electrones para convertirse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o tres electrones para convertirse en radical hidroxilo ($OH\bullet$). El O_2^- celular puede dismutar en H_2O_2 de manera espontánea o por la actividad enzimática de las superóxido dismutasas (SODs), que contribuyen formando la mayoría del H_2O_2 intracelular. Comparado con O_2^- , el H_2O_2 es mucho más estable y puede difundir a través de membranas biológicas, lo que le confiere el potencial para actuar como una molécula señalizadora de amplio rango (Chance *et al.*, 1979; Cross *et al.*, 1987; Halliwell *et al.*, 1992). Por ello, bajo condiciones fisiológicas, una vez que se forma O_2^- , la presencia de H_2O_2 se vuelve inevitable. Reacciones posteriores pueden conducir a la formación de radicales hidroxilo, especialmente en presencia de iones ferrosos mediante la reacción de Fenton (ecuación 1) (Fridovich, 1978; Deby & Goutier, 1990)



El principal sitio de producción intracelular de ROS es la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Aunque es

comúnmente reportado que 1-2% del flujo de electrones de la cadena conduce a la formación de ROS, estudios más recientes han demostrado que este valor está alrededor del 0,15%, y sus variaciones dependen de la fuente de carbonos que esté siendo oxidada (Freeman *et al.*, 1982; St-Pierre *et al.*, 2002). Una alta concentración de SOD mitocondrial correlaciona con la elevada tasa de producción de O_2^- en esa organela (Chandel *et al.*, 1998). El retículo endoplasmático (RE) es otra fuente celular de ROS, ya que en sus membranas se localizan familias enzimáticas, como P450 y b5, que oxidan ácidos grasos insaturados y xenobióticos generando O_2^- y H_2O_2 (Aust *et al.*, 1972; Capdevila *et al.*, 1981). Además, oxidasas asociadas a la membrana plasmática, tales como las NADPH oxidasas, generan ROS oxidando el NADPH intracelular para reducir al O_2 en O_2^- , con funciones microbicidas en los fagosomas (Segal & Shatwell, 1997; Babior, 1999). Los peroxisomas contienen múltiples enzimas generadoras de H_2O_2 , incluyendo a la catalasa peroxisomal que metaboliza moléculas tóxicas como el etanol. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje del H_2O_2 peroxisomal escapan de esta organela (Boveris *et al.*, 1972). Algunas oxidasas solubles, dehidrogenasas y dioxigenasas presentes en el citosol, pueden también generar ROS durante sus ciclos catalíticos (Freeman & Crapo, 1982). En resumen, a pesar de la existencia de múltiples fuentes intracelulares de ROS, la contribución más importante corresponde a las mitocondrias.

Mientras que a bajas concentraciones muchas de las especies reactivas son usadas como moléculas de señalización (Rhee, 2006), la sobreproducción de especies reactivas pueden desembocar en disfunción e incluso en muerte celular mediante un incremento en la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y daños en el ADN (Martin *et al.*, 2005; Markesbery & Lovell, 2007).

Muchos estudios han demostrado que las especies reactivas del oxígeno tienen un rol importante en la fisiopatología de varios desórdenes neurológicos (Kontos, 1985; Chan, 2001), entre los que se destacan las lesiones isquémicas.

A fin de contrarrestar los efectos tóxicos de las especies reactivas, el SNC posee tres mecanismos enzimáticos antioxidantes principales: (1) SOD, mencionada más arriba (2) catalasa, que cataliza la formación de oxígeno molecular a partir de H_2O_2 , y (3) (GSH) glutatión peroxidasa, que cataliza la formación de agua a partir de H_2O_2 , utilizando equivalentes de reducción de GSH, que, a su vez, pueden ser reestablecidos vía la GSH reductasa (Jackson *et al.*, 1991). Otras defensas antioxidantes celulares están constituidas por moléculas pequeñas que pueden actuar como sustrato de las reacciones de oxidación. Entre ellas, algunas se encuentran en la fase lipídica como los tocoferoles, carotenoides y ubiquinoles, en tanto que otras actúan en fases acuosas siendo los principales representantes de esta última clase el ascorbato y el ácido úrico (Boscoboinik *et al.*, 1991).

La reoxigenación posterior a una hipoxia o una isquemia genera una sobreproducción de ROS en mitocondrias y el consumo de los antioxidantes endógenos puede conducir a un dramático incremento de las ROS intracelulares (Sugawara *et al.*, 2004).

En general, el SNC es altamente susceptible al daño oxidativo debido a sus altos niveles de hierro y lípidos poliinsaturados y a los niveles relativamente bajos, en comparación con otros tejidos, de antioxidantes celulares (Jackson *et al.*, 1990). Además, el SNC en desarrollo es aún más susceptible que el SNC adulto, dado que durante el desarrollo los niveles de las enzimas antioxidantes catalasa y GSH peroxidasa son menores que en el adulto (Pan & Perez-Polo, 1993; Sampath *et al.*, 1994).

3.2.2 Especies reactivas del nitrógeno: óxido nítrico y peroxinitrito

El óxido nítrico (NO) es una molécula diatómica simple. Es un gas incoloro a temperatura y presión ambiente, y su solubilidad en agua es similar a la del O_2 (2 mM). Es relativamente lipofílico (6-8 veces más soluble que en agua) (Shaw *et al.*, 1977), por lo cual sus reacciones se ven dramáticamente incrementadas en membranas biológicas con respecto a ambientes

acuosos. Tiene naturaleza de radical libre ya que posee un electrón desapareado que es compartido por el nitrógeno y el oxígeno, con predominancia sobre el nitrógeno, por lo que el NO reacciona con otras moléculas a través de este átomo (Fukuto *et al*, 2000).

El NO es un óxido de nitrógeno que puede ser extensamente reducido u oxidado en sistemas biológicos, originando una familia de especies secundarias. Para analizar los efectos del NO y sus derivados, debemos considerar la química biológica del NO, que comprende un número pequeño de reacciones con componentes normalmente presentes en las células.

En particular, la reacción del NO con el O_2^- , generando peroxinitrito ($ONOO^-$), es muy favorable (Blough *et al*, 1985) y su velocidad de reacción está limitada por la difusión de las especies (Huie *et al*, 1993) (ecuaciones 2 y 3).



La protonación del $ONOO^-$ es seguida por la rápida lisis del ácido, que genera dos radicales de vida media muy corta, el $NO_2\cdot$ y el $OH\cdot$. Estos radicales son responsables de gran parte del espectro de las reacciones del $ONOO^-$, en su mayoría de oxidación de constituyentes biológicos (Pryor *et al*, 1999). La altísima reactividad del $ONOO^-$ se ve limitada en parte por su corta vida media (0,67 seg) que asegura una baja difusión (Denicola *et al*, 1998). Esta particularidad determina que el $ONOO^-$ actúe solamente en el sitio donde es formado. Esta forma de utilización del NO constituye su principal forma de metabolismo. El NO reacciona también con determinadas proteínas que contienen hierro. Específicamente, se une al Fe^{2+} formando un nitrosil-Fe (NO-Fe) que modifica las propiedades químicas del grupo prostético, modificando la actividad biológica de la enzima.

El ONOO^- es considerado actualmente el principal mediador de la toxicidad del NO (Bolanos *et al.*, 1995; Darley-Usmar *et al.*, 1995; Szabo, 1996). Esta especie es altamente reactiva, y puede reaccionar con diversas biomoléculas, como lípidos (Trostchansky & Rubbo, 2007) y proteínas (Demicheli *et al.*, 2007), nitrándolas y por lo tanto alterando su funcionalidad. La evidencia experimental que sostiene esta afirmación está basada en un gran número de estudios que han demostrado que la presencia conjunta de NO y superóxido es necesaria para que el daño se produzca, aun en situaciones en las que el evento primario es un incremento en la síntesis de NO. Un estudio en cerdos neonatos constituye probablemente una de las evidencias pioneras de la importancia del ONOO^- como mediador del daño luego de una H-I. En este estudio se ha observado, por un lado, un incremento en los complejos de inclusión de spin de fenil N-tert-butilnitrona (*PBN spin adducts*), indicando un incremento de especies reactivas del oxígeno o de peroxinitrito, y por otro lado un aumento en la peroxidación lipídica. Ambos cambios pudieron prevenirse con la administración de un inhibidor de las isoformas constitutivas de NOS (Numagami *et al.*, 1997). Esto sugiere fuertemente que el ONOO^- , formado a partir del NO y del O_2^- existente, es el agente activo en este caso. El hecho de que tanto los *scavengers* de ROS como los inhibidores de NOS sean capaces de disminuir el daño celular luego de una H-I en diversos estudios es consistente con esta hipótesis (Dawson *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1996).

3.2.2.1 Generación de NO: Las óxido nítrico sintasas.

El NO es generado por una familia de enzimas, conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Se han identificado tres isoformas distintas de NOS que son producto de diferentes genes, y que poseen diferente regulación, sensibilidad a inhibidores y propiedades catalíticas. Estas isoformas presentan entre un 51 y 57 % de homología en humanos, y cada una de ellas muestra diferentes variantes de splicing (Alderton et al., 2001; Newton, 2003).

Las isoformas clásicas de la NOS comprenden a la NOS neuronal (nNOS), hallada por primera vez en tejido nervioso, y siendo la variante predominante en este tejido; la NOS inducible (iNOS), que es la isoforma capaz de ser inducida en una gran variedad de tejidos y por diversos estímulos; y la isoforma endotelial (eNOS), que se encontró por primera vez en tejido endotelial. Estas isoenzimas han sido diferenciadas en base al carácter de su expresión, siendo eNOS y nNOS enzimas típicamente constitutivas, mientras que la iNOS es la variante cuya expresión podía estar sujeta a modulación. Las NOS presentan dos dominios: un dominio N-terminal o dominio oxidasa, que contiene sitios de unión para el grupo hemo, tetrahidrobiopterina (BH₄), y L-arginina. Este dominio está unido, mediante un sitio que se une a calmodulina (CaM), al dominio C-terminal o dominio reductasa, que contiene sitios de unión para FAD, FMN y NADPH (Richards & Marletta, 1994; Ghosh et al., 1995; McMillan & Masters, 1995).

La reacción de formación del NO sucede en dos pasos: primero, la NOS hidroxila uno de los nitrógenos guanidínicos de la L-arginina para dar N-hidroxi-L-arginina (NOHA), un intermediario de reacción que permanece unido a la enzima. La NOHA luego se oxida para generar NO y L-citrulina (Figura 1). Los electrones son donados por el NADPH y el O₂ es utilizado como co-sustrato; un átomo se adiciona a la L-arginina para dar L-citrulina, y el otro forma parte del NO (Nathan, 1992). La transferencia de electrones a través de los grupos prostéticos de las NOS es compleja y los mecanismos propuestos son controvertidos. Todas

las NOS requieren la presencia de BH₄ para estabilizar la formación del homodímero. Además, todas requieren la unión de CaM para permitir el flujo de electrones hasta L-arginina. La afinidad con que se une la CaM es una de las principales diferencias entre las isoformas de NOS, siendo muy afín la iNOS. Esta característica es la que la hace aparentemente independiente de calcio.

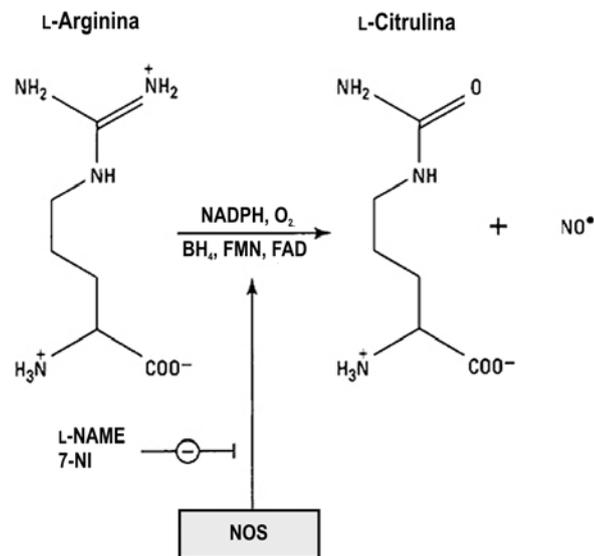


Figura 1. Reacción de síntesis de óxido nítrico. Las óxido nítrico sintasas (NOS) en presencia de O₂ y cofactores, generan NO a partir del aminoácido L-arginina con la producción concomitante de L-citrulina. Los cofactores incluyen nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenín dinucleótido (FAD). La modulación de las NOS mediante inhibidores competitivos, como L-NAME y 7-NI, o la disponibilidad de L-arginina y de cofactores, son posibles blancos de intervención farmacológica de esta vía.

La nNOS fue la primera isoforma en ser purificada y clonada a partir de cerebelo de rata, es también conocida como NOS-1 (Bredt & Snyder, 1990). Sin embargo, nNOS no se expresa exclusivamente en el sistema nervioso, sino que se encuentra en otros tipos celulares como el neutrófilo, ciertos linfocitos, testículo y músculo esquelético (Gatto *et al.*, 1999). Su actividad está finamente regulada por la concentración de Ca²⁺ intracelular; al unirse Ca²⁺, la CaM adquiere una conformación muy afín por la nNOS, activándola.

El gen de la nNOS posee una gran diversidad a nivel transcripcional (Brenman *et al.*, 1997). Se conocen al menos 5 promotores y 3 exones 1 alternativos, que se utilizan en distintos tipos celulares, en distintos estadios del desarrollo. En neuronas, la isoforma predominante es aquella en la que todos los exones son incluidos en el mRNA y la proteína monomérica resultante tiene un peso aproximado de 160 kDa (Ignarro, 1989). Se la conoce como la variante nNOS α . Entre sus características está la de poseer un dominio PDZ de unión a proteínas, a través del cual se asocia con proteínas estructurales de la membrana post-sináptica y con la distrofina en fibras musculares (Brenman *et al.*, 1995; Brenman *et al.*, 1996).

3.2.2.2 Óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS)

La existencia de una NOS mitocondrial (mtNOS) ha sido demostrada en una variedad de sistemas biológicos y mediante diferentes acercamientos experimentales. La producción de óxido nítrico en la mitocondria fue demostrada de forma directa (conversión de L-arginina a L-citrulina; método radioactivo) e indirecta (generación de NO, evaluado por resonancia electrónica paramagnética por atrapamiento de spin u oxidación de oxihemoglobina dependiente de NO). La expresión y actividad de una mtNOS constitutiva en mitocondrias de hígado de rata fueron demostradas en forma paralela por los grupos de Giulivi (Giulivi *et al.*, 1998) y Ghafourifar (Ghafourifar & Richter, 1997). Ghafourifar y Richter siguieron la producción de NO por oxidación de oxihemoglobina, y observaron la producción de NO tanto en mitocondrias intactas como en mitoplastos (membrana mitocondrial interna que encierra matriz). Asimismo, vieron que las partículas sub-mitocondriales (la membrana interna inside-out), pero no la matriz mitocondrial, producían NO y eran sensibles a los inhibidores de las NOS convencionales, indicando que la mtNOS estaría asociada con la cara matricial de la membrana interna mitocondrial; y que produciría NO enzimáticamente. Otros laboratorios demostraron la existencia de

la mtNOS en fracciones mitocondriales menos purificadas o en células aisladas, utilizando diferentes métodos como la colocalización de la producción de NO en la mitocondria, y la detección de NO con un electrodo específico, entre otros (Kobzik *et al.*, 1995; Lopez-Figueroa *et al.*, 2000; Kanai *et al.*, 2001). Dado que las isoformas constitutivas de la NOS, nNOS y eNOS, dependen de calcio para la producción de NO (Mayer *et al.*, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990), era de esperar que aumentos en el calcio mitocondrial fuesen necesarios para activar a la mtNOS. De acuerdo con esto, Ghafourifar y Richter observaron una estimulación en la producción de NO por mtNOS tras el agregado de Ca^{2+} a la mitocondria (Ghafourifar & Richter, 1997).

A pesar que la existencia y las funciones mitocondriales de la mtNOS han sido confirmadas en muchos tejidos, órganos y células, aún se debate cual de las isoformas de las NOS clásicas sería la mtNOS. Siguiendo la producción de NO mitocondrial con electrodos para NO, se vio que ratones *knock-out* para nNOS no producían NO (Kanai *et al.*, 2001). Independientemente, Elfering y colaboradores (Elfering *et al.*, 2002) llegaron a la conclusión de que la mtNOS correspondería a la variante α de la nNOS.

3.2.2.3 Efectos del óxido nítrico sobre la mitocondria

El NO actúa sobre varios sitios de la cadena de transporte de electrones. El efecto más caracterizado es que posee sobre la citocromo oxidasa (complejo VI). El NO es un inhibidor con alta afinidad por el complejo IV ($\text{IC}_{50} = 0.1 \mu\text{M}$), compitiendo con el O_2 por el sitio de unión a la enzima. La inactivación es reversible y dependiente de la dosis (Cleeter *et al.*, 1994). Este efecto del NO se alcanza en concentraciones bajas y fisiológicas (50- 100 nM NO inhiben el 50% de la actividad de la citocromo oxidasa). Asimismo, al ser el NO un inhibidor competitivo del O_2 , el efecto del NO es dependiente de la concentración de este último: cuando disminuye pO_2 , aumenta el efecto del NO, y disminuye así el consumo de oxígeno. Cuando la

relación O_2 : NO es 1:150, el consumo de oxígeno se reduce al 50 % del máximo (Poderoso *et al.*, 2000).

En la última década se han dado a conocer efectos específicos del NO sobre el complejo I. Clementi y colaboradores (Clementi *et al.*, 1998), observaron que el NO en concentración micromolar inhibe la respiración y la actividad del complejo I. De acuerdo con esto, también se ha informado que la producción de ONOO⁻ dependiente de NO en mitocondrias de hígado y corazón induce la inhibición persistente de la actividad NADH-citocromo *c* reductasa, mientras que los complejos II y III no se ven afectados (Riobo *et al.*, 2001).

Además, el ONOO⁻ produce, en las mitocondrias, la inactivación irreversible de enzimas mediante la reacción con aminoácidos que son críticos para su actividad catalítica. En esas organelas, la vida media del ONOO⁻ es de 3 a 5 milisegundos dado su alto grado de reactividad, por lo tanto un aumento en el estado estacionario mitocondrial de ONOO⁻ lleva a alteraciones en la homeostasis mitocondrial (Radi, 2004). En la cadena de transporte de electrones, el ONOO⁻ posee efectos marcadamente diferentes a los producidos por el NO (Cassina & Radi, 1996). Mientras el NO inhibe reversiblemente al complejo IV, el ONOO⁻ produce la inactivación de los complejos I, II y IV (Radi *et al.*, 1994; Szabo & Salzman, 1995; Borutaite *et al.*, 2000; Riobo *et al.*, 2001).

El ONOO⁻ es un oxidante muy potente que puede provocar daños en el ADN, peroxidación lipídica y aumentar la permeabilidad mitocondrial a los protones (Gadelha *et al.*, 1997), causando un pronunciado aumento del volumen, denominado swelling, que puede incluso producir la ruptura de la membrana mitocondrial externa.

4. Neuroprotección por preconditionamiento hipóxico

Las investigaciones sobre los mecanismos protectores endógenos se remontan a la década de los años '40. Fue Noble quien propuso

por primera vez que cortos períodos de hipoxia pueden proteger al organismo y al metabolismo energético del cerebro durante períodos de hipoxia más prolongados (Noble, 1943). Dos décadas más tarde, Janoff introdujo el término 'precondicionamiento' para referirse a estímulos que, administrados por debajo del umbral de daño, confieren protección ante un estímulo posterior de mayor intensidad (Janoff, 1964). En 1986 Schurr y colaboradores demostraron en un modelo *in vitro* que la hipoxia puede conferir adaptación a una hipoxia posterior (Schurr *et al.*, 1986), y en el mismo año Murry y colaboradores encontraron que periodos cortos, no dañinos, de isquemia, protegían al miocardio de isquemias más severas (Murry *et al.*, 1986). Las investigaciones tempranas sobre este fenómeno se centraban fundamentalmente en el llamado 'precondicionamiento rápido' (también conocido como 'precondicionamiento clásico'), en el que la protección endógena se establece luego de minutos de aplicar el estímulo preconditionante. Fue recién en 1990 que Kitagawa y colaboradores demostraron la existencia de una forma de preconditionamiento retrasada en el tiempo y dependiente de la síntesis de proteínas, que se manifestaba horas o días luego de la aplicación del estímulo inicial (Kitagawa *et al.*, 1990). A partir de allí, muchos estudios han explorado la señalización y los mecanismos efectores. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la neuroprotección por preconditionamiento hipóxico aún se encuentran incompletamente comprendidos (Dirnagl & Meisel, 2008). Esto se debe a que existen múltiples vías moleculares interconectadas, muchas de ellas comunes a varios estímulos preconditionantes. Una evidencia de esto es la existencia de un fenómeno conocido como 'tolerancia cruzada' en el que un estímulo estresante de una clase puede conferir tolerancia ante una injuria provocada por un stress de otra clase (Kirino, 2002). Sin embargo, también hay evidencias que sostienen que ciertas vías tienen mayor preponderancia que otras, dependiendo de la naturaleza del estímulo preconditionante (Steiger & Hanggi, 2007).

Entre los mecanismos moleculares que han sido vinculados al fenómeno del preconditionamiento hipóxico-isquémico en el SNC, y por ende, a los mecanismos endógenos de neuroprotección, se encuentran las siguientes vías: MAPKinasas (mitogen activated protein kinases), en particular ERK (Jones & Bergeron, 2004) y p38 (Nishimura et al., 2003), PI3K/Akt (Ruscher et al., 2002), JAKs/STATs (Digicaylioglu & Lipton, 2001) y el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1)(Sharp et al., 2004; LaManna, 2007). Este último ha concitado particular interés por su posición estratégica como sensor intracelular de las tensiones de oxígeno.

5. Factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)

La investigación sobre los mecanismos moleculares que subyacen a una de las más sorprendentes respuestas a la hipoxia -la inducción de la hormona hematopoyética eritropoyetina (EPO)- condujo a la primera detección del factor de transcripción inducible por hipoxia. Cuando se reduce el contenido sanguíneo de oxígeno en condiciones de anemia o elevada altitud, la producción de EPO por fibroblastos del intersticio renal se enciende rápidamente. Esta inducción de aproximadamente 100 veces en contenido de mRNA y proteico de EPO, induce a su vez la respuesta eritropoyética que incrementa directamente la eficiencia del transporte sanguíneo de oxígeno. Estudios de las interacciones ADN-proteína en el *enhancer* 3' del gen de EPO, identificaron un complejo proteico que sólo estaba unido en condiciones de hipoxia. Fue designado factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, *hipoxia-inducible factor 1*) (Semenza & Wang, 1992).

El factor de transcripción HIF-1 tiene un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno en organismos metazoos, controlando a expresión de cientos de genes (Semenza, 2007). Dado que la batería de genes blanco varía considerablemente de un tipo celular a otro, el transcriptoma

completo de HIF-1 incluye probablemente miles de genes. Entre ellos se encuentran los que codifican transportadores de glucosa y enzimas de la glucólisis, que catalizan la producción anaeróbica de ATP a través de la fermentación de glucosa a ácido láctico. HIF-1 regula, además, la síntesis de acetil CoA mitocondrial, la composición de subunidades de citocromo oxidasa (complejo IV) y la biogénesis mitocondrial (Zhang *et al.*, 2007). En conjunto, las vías mediadas por HIF influyen la adaptación metabólica, la eritropoyesis, la angiogénesis, el crecimiento y diferenciación celular, supervivencia y apoptosis, cumpliendo un rol central en la homeostasis del O₂ durante el desarrollo embrionario y la vida adulta, tanto en condiciones normales como patológicas (Semenza, 1998; Maxwell *et al.*, 2001).

HIF-1 es un heterodímero compuesto de dos proteínas con dominios básicos hélice-vuelta-hélice (bHLH, *basic hélix-loop-helix*) pertenecientes a la familia PAS. Está compuesto por una subunidad HIF-1 α regulada por O₂ y una subunidad HIF-1 β constitutivamente expresada, que es idéntica a ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) (Wang *et al.*, 1995).

La subunidad α contiene cuatro dominios diferentes (Jiang *et al.*, 1997; Pugh *et al.*, 1997). El dominio N-terminal contiene los dominios bHLH y PAS que median la dimerización con la subunidad 1 β y ~~lón un~~ el heterodímero al ADN en localizaciones específicas en los promotores o *enhancers* de diversos genes, denominadas elementos de respuesta a hipoxia (HREs, *hypoxia response elements*), caracterizados por la secuencia consenso (5'-RCGTG-3'). La parte media de la proteína contiene un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD, *oxygen-dependent degradation domain*) entre los residuos 401-603, que controla la estabilidad de la proteína como una función de la tensión de oxígeno. Además, la proteína posee dos dominios de transactivación, que interactúan con proteínas coactivadoras, como p300, que son requeridas para activar la transcripción de los genes blanco (Jiang *et al.*, 1997).

HIF-1 α es continuamente sintetizada y degradada bajo condiciones normóxicas, teniendo, en estas condiciones, una vida media

extraordinariamente corta (menos de 5 min a 21% de O_2) y con concentraciones de estado estacionario muy bajas (Jewell *et al.*, 2001). Por el contrario, bajo condiciones hipóxicas su degradación es inhibida, por lo que HIF-1 α se acumula. Al incrementar su concentración, HIF-1 α dimeriza con HIF-1 β , se une a los HREs que activan en *cis* a los genes blanco, y recluta a proteínas coactivadoras, que, en conjunto, conducen a un incremento en la transcripción (Weidemann & Johnson, 2008)(Figura 2).

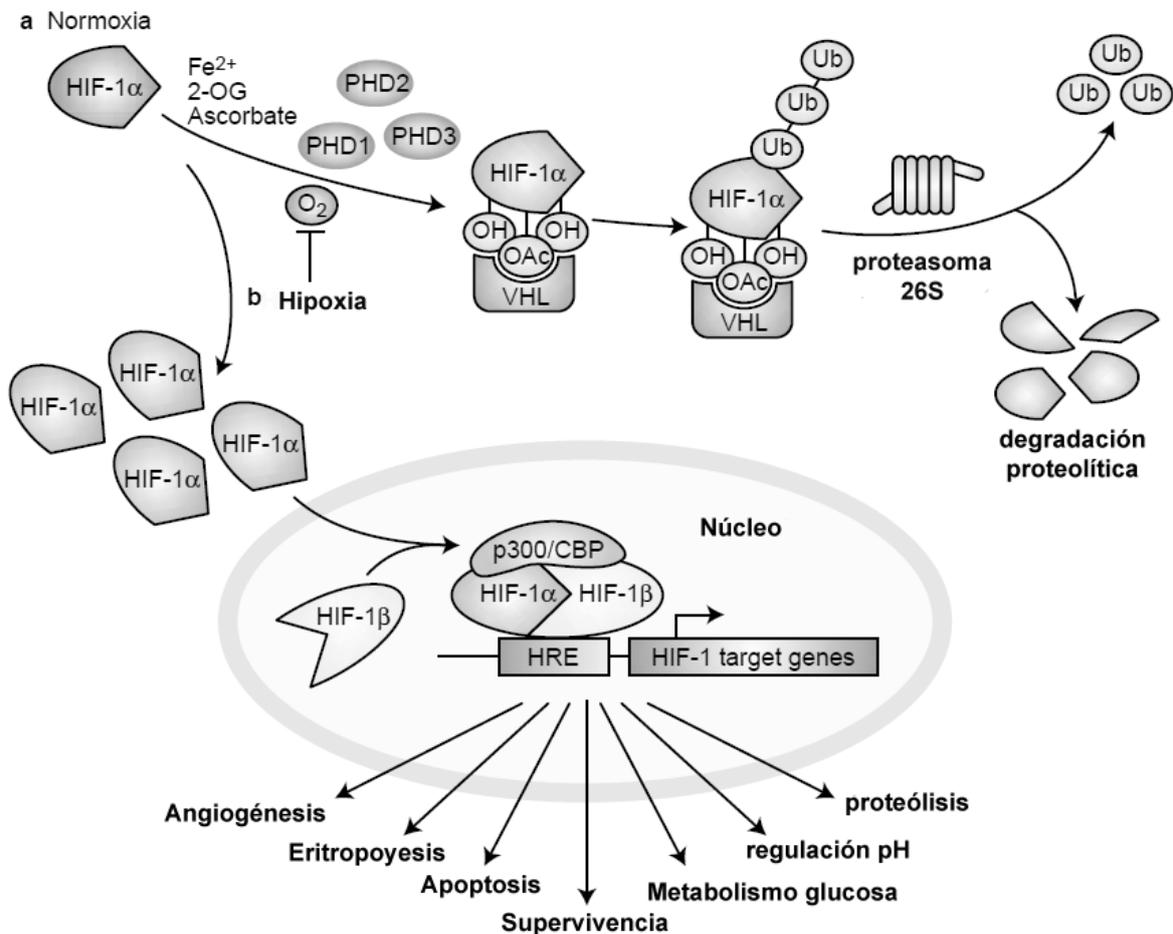


Figura 2. Regulación de HIF-1 α por hidroxilación de prolina. (a) En condiciones normóxicas, HIF-1 α es hidroxilado en residuos de prolina en una reacción catalizada por las HIF-prolil hidroxilasas (PHD1, 2 y 3), en presencia de O_2 , Fe^{2+} , α -cetoglutarato (2-OG) y ascorbato. HIF-1 α hidroxilado es reconocido por pVHL (el producto del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau), que en conjunto con un complejo E3 ubiquitín ligasa, marca a HIF-1 α con poliubiquitina, lo que permite reconocimiento por parte del proteasoma y su posterior degradación. (b) En respuesta a la hipoxia, se inhibe la reacción de hidroxilación por falta de sustrato. HIF-1 α se acumula, transloca al núcleo y allí dimeriza con HIF-1 β . El heterodímero HIF-1 se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) y recluta co-activadores transcripcionales tales como p300/CBP. Los genes blanco regulan un amplio espectro de funciones celulares. Ub: ubiquitina. CBP: CREB-binding protein.

Un elemento importante en la complejidad del sistema está dado por la existencia de HIF-2 α , parólogo de HIF-1 α , que también está regulado por O₂, dimeriza con HIF-1 β y activa la transcripción de un conjunto distinto, aunque parcialmente redundante de genes (Hu *et al.*, 2006). Sin embargo, sólo se ha demostrado un rol importante de HIF-2 α en tipos celulares restringidos, como macrófagos y células endoteliales (Schmid *et al.*, 2004). Otro parólogo, HIF-3 α , cuya similitud con HIF-1 α es más distante, parecería actuar como un inhibidor de HIF-1 α , aunque su función no se encuentra comprendida claramente en la actualidad (Makino *et al.*, 2007).

La rápida degradación de HIF-1 α bajo condiciones normóxicas se produce a través de la vía ubiquitina-proteasoma (Schofield & Ratcliffe, 2004). Esta degradación se gatilla por la unión a HIF-1 α de la proteína supresora de tumores von Hippel -Lindau (pVHL), que interactúa con la proteína Elongin C, y luego recluta a un complejo E3 ubiquitín-ligasa que ubiquitina a HIF-1 α , marcándolo para su degradación vía el proteasoma 26S. La unión de pVHL a HIF-1 α depende de la hidroxilación de por lo menos un residuo de prolina crítico, en las posiciones 402 y 564, dentro del ODDD, por un conjunto de enzimas denominadas HIF-prolil hidroxilasas.

5.1 Regulación de HIF por medio de HIF-prolil hidroxilasas

Las prolil hidroxilasas específicas de HIF, también llamadas HIF-prolil hidroxilasas (referidas aquí como PHDs) pertenecen a la superfamilia de dioxigenasas dependientes de Fe²⁺ y de α -cetoglutarato (2-oxoglutarato) (Bruick & McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2002). Por ser dioxigenasas, estas enzimas son capaces de escindir el oxígeno molecular e incorporar ambos átomos de oxígeno a sus productos. Uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la forma de grupo hidroxilo a residuos específicos de prolina de HIF- α s, mientras que el otro es utilizado en una reacción acoplada: la descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato rindiendo succinato y CO₂ (Hirsila

et al., 2003)(Figura 3). Este proceso ha sido confirmado isotópicamente utilizando ^{18}O (Hewitson et al., 2007).

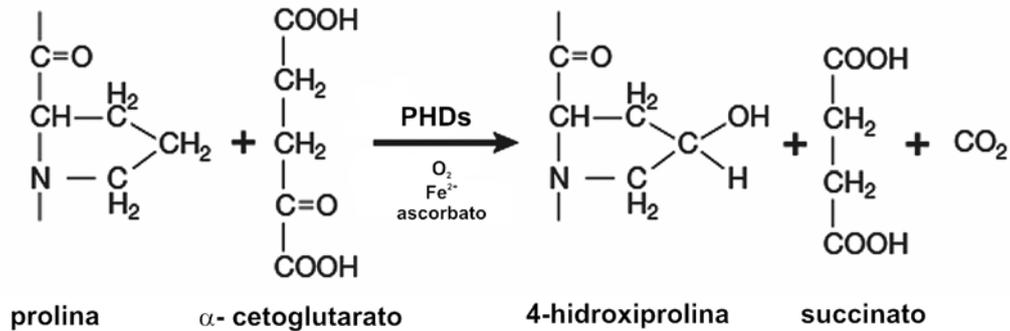


Figura 3. Reacción catalizada por las HIF-prolil hidroxilasas (PHDs). Las enzimas utilizan O_2 y α -cetoglutarato como co-sustratos, y Fe^{2+} y ascorbato como cofactores. La reacción de hidroxilación produce hidroxiprolina y succinato.

A diferencia de algunos miembros de la familia de las dioxigenasas, el requerimiento de O_2 como sustrato es absoluto y no puede ser reemplazado por una molécula de H_2O (McNeill et al., 2002). De esta manera, la reacción de hidroxilación, y por ende la degradación de HIF-1 α , depende de manera inherente de la presión parcial de O_2 , constituyendo la base molecular de la función de estas enzimas como sensores de oxígeno. Por lo tanto, la hidroxilación de HIF vincula directamente los cambios en la concentración de oxígeno molecular a la regulación de cascadas de transcripción. De acuerdo con su papel de sensores de oxígeno, las PHD poseen valores de K_m para el O_2 cercanos a $100 \mu\text{m}$ (Koivunen et al., 2006; Ehrismann et al., 2007), mucho mayores a la concentración de oxígeno en los tejidos, que típicamente está en el rango de $10\text{-}30 \mu\text{m}$. Esto es importante ya que, al no producir las células animales oxígeno molecular, puede asumirse que esos valores representan las concentraciones máximas de oxígeno disponibles a la enzima, independientemente de los gradientes intracelulares. Por esta razón, la $p\text{O}_2$ intracelular será esencialmente menor al K_m aparente por el oxígeno, permitiendo que la actividad enzimática sea regulada por la disponibilidad de oxígeno molecular a lo largo de todo el

rango fisiológico, dada una cinética del tipo Michaelis-Menten (Kaelin & Ratcliffe, 2008).

El ión ferroso (Fe^{2+}) constituye un elemento importante en la regulación de la actividad enzimática. Se localiza en el sitio activo - predominantemente hidrofóbico- y es requerido para que la enzima adquiera una conformación activa (McDonough *et al.*, 2006). Durante la reacción completa, Fe^{2+} es oxidado transitoriamente a Fe^{4+} , regresando luego a su estado inicial (Counts *et al.*, 1978; Nietfeld & Kemp, 1981). Sin embargo, las PHD pueden también catalizar la reacción de manera desacoplada, convirtiendo al α -cetoglutarato a succinato sin la hidroxilación del péptido sustrato. Bajo esas condiciones, Fe^{2+} es oxidado a Fe^{3+} y para que la enzima pueda ser reciclada al cabo de este proceso, se requiere ascorbato para reducir el Fe^{3+} nuevamente a Fe^{2+} (Counts *et al.*, 1978; Nietfeld & Kemp, 1981).

Por estas razones, tanto los niveles intracelulares de Fe^{2+} como los de ascorbato pueden afectar la actividad enzimática de las PHDs y la acumulación de HIF- α s (Figura 4) (Knowles *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2006).

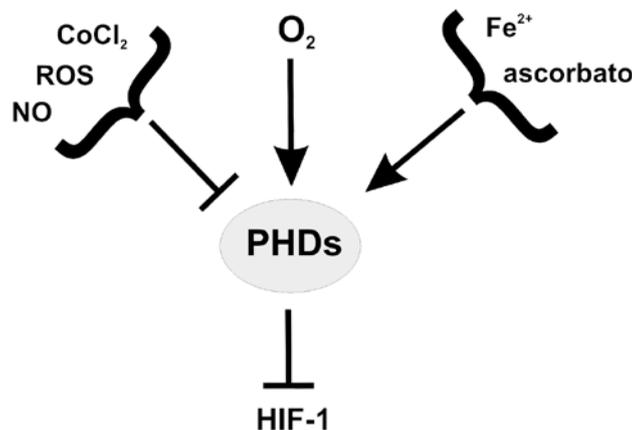


Figura 4. Factores que regulan la actividad de las HIF-prolil hidroxilasas (PHDs). Además del rol central de la disponibilidad de O_2 , numerosos estímulos fisiológicos y farmacológicos regulan la actividad de las PHDs, promoviendo una regulación fina de su actividad en relación al microambiente celular. Las interacciones estimulatorias se indican con \downarrow , y las inhibitorias con \perp .

La estructura y la función de las PHDs se encuentran conservadas evolutivamente. Sólo un ortólogo de PHD ha sido detectado en *Caenorhabditis elegans*. En contraste, tres PHDs se han identificado en células de vertebrados, PHD1, PHD2 y PHD3, cuyos nombres alternativos son EglN2, EglN1 y EglN3, respectivamente. Las tres PHDs comparten un dominio C-terminal altamente conservado, responsable de la actividad enzimática, difiriendo en sus extremos N-terminales (Epstein *et al.*, 2001). Notablemente, trabajos recientes basados en el silenciamiento por siRNA sugieren que PHD2 -de localización citoplasmática (Metzen *et al.*, 2003)- es la isoforma de la que depende de manera predominante la estabilidad de HIF-1 α *in vivo* (Berra *et al.*, 2003). A pesar de hidroxilar a HIF-1 α cuando se sobreexpresan, aún no se ha determinado las funciones fisiológicas de PHD1 y PHD3.

La vida media de HIF-1 α también se encuentra regulada de manera independiente de O₂ por la unión competitiva de HSP90, que estabiliza a la proteína, o de RACK1, que interactúa con Elongin C promoviendo la ubiquitinización de HIF-1 α y su degradación independiente de PHD2 y de pVHL (Liu *et al.*, 2007). Un segundo mecanismo principal de regulación independiente de O₂, es la estimulación de la transcripción de HIF-1 α mediante la transducción de señales vía fosfatidilinositol 3-kinasa, AKT y mTOR (Laughner *et al.*, 2001).

6. Modelo de trabajo

Los resultados del presente estudio se han realizado en un modelo de hipoxia prenatal *in vivo* desarrollado en nuestro laboratorio, utilizando embriones de aves, que permite además, la administración de diversos agentes farmacológicos mediante la inyección en la membrana corion-alantoidea (Rodríguez Gil *et al.*, 2000).

Los modelos de hipoxia hipóxica prenatal en mamíferos son escasos debidos a la dificultad operativa para manipular los embriones dentro del útero y a la presencia de factores maternos que poseen fuertes mecanismos compensatorios a través de la

placenta. En cambio, en las especies ovíparas, la condición hipóxica prenatal puede inducirse con mucha facilidad, mediante el simple cambio de las condiciones atmosféricas en la que son incubados los huevos (Rahn *et al.*, 1987; Wagner-Amos & Seymour, 2002).

En nuestro diseño experimental, huevos embrionados en el día 12 de su desarrollo son colocados en una cámara sellada herméticamente. La injuria hipóxica se realiza perfundiendo la cámara, durante 60 min, con una mezcla gaseosa compuesta por O₂ al 8% y N₂ al 92%, a presión atmosférica, con temperatura y humedad controladas.

Utilizando el modelo de hipoxia mencionado anteriormente, hemos demostrado que en el día embrionario (DE) 12 los embriones son susceptibles a la injuria hipóxica (Vacotto *et al.*, 2006) , y se han establecido los parámetros para obtener una sobrevida del 100% luego del evento hipóxico (Rodríguez Gil *et al.*, 2000).

Los modelos isquémicos, a pesar de su relevancia clínica, imponen condiciones muy complejas al tejido nervioso (e.g hipoxia, hipoglucemia, hipercapnia e inflamación) (Lipton, 1999), dificultando la elucidación de los mecanismos moleculares que subyacen a la muerte y sobrevida neuronal. En cambio, el modelo utilizado en el presente trabajo, puramente hipóxico, ofrece un contexto simplificado para elucidar los cambios provocados por los cambios en una única variable: la presión parcial de oxígeno.

Nuestro estudio se centra, específicamente, en el lóbulo óptico (LO), una estructura mesencefálica bilateral encargada del procesamiento de la información visual (Figura 5) (Mey & Thanos, 2000).

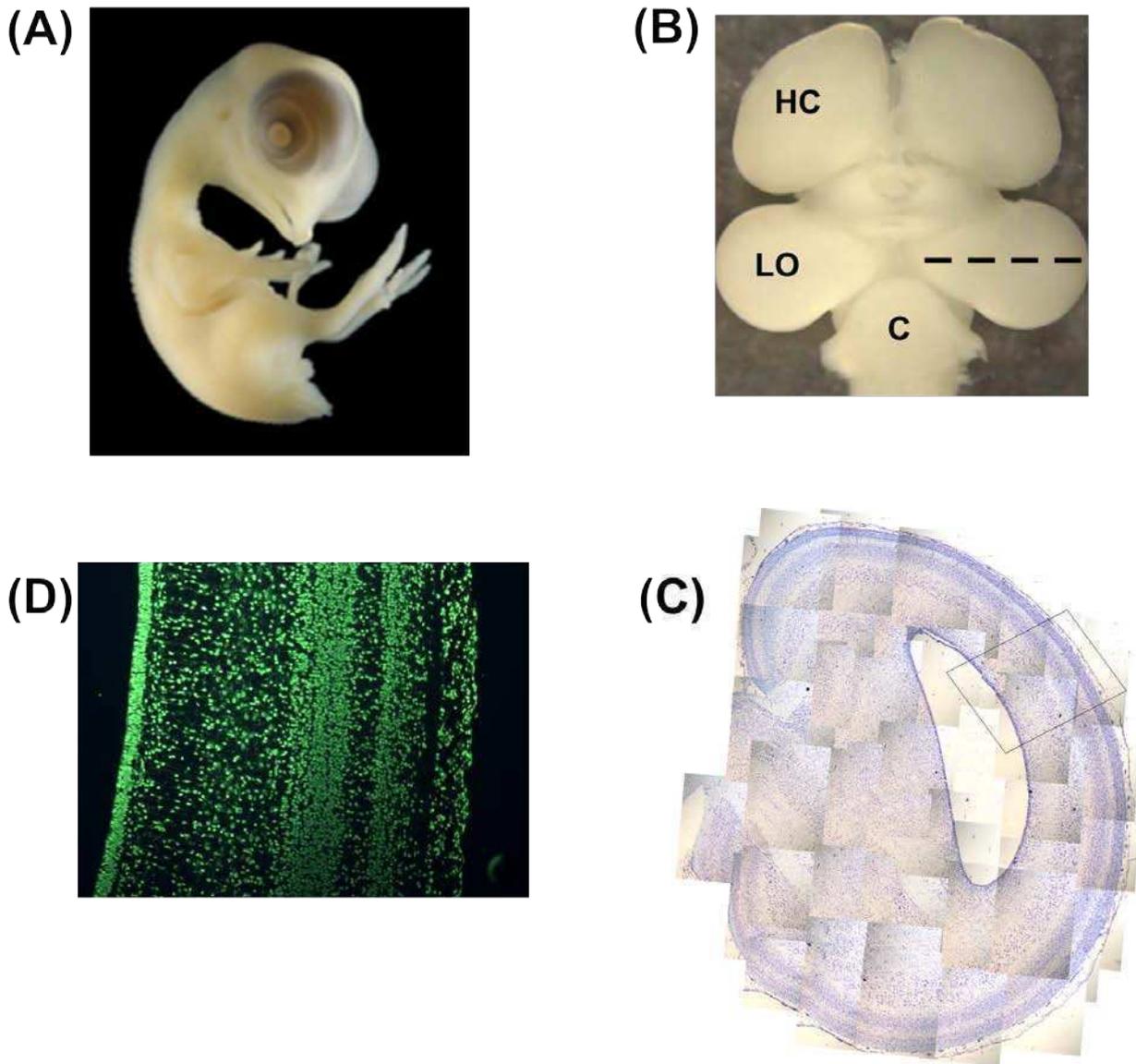


Figura 5. Modelo de trabajo. (A) Embrión de pollo en el día embrionario (DE) 12. (B) Vista superior del encéfalo de un embrión de pollo en el DE 12. HC: hemisferio cerebral. LO: lóbulo óptico. C: cerebelo. (C) Composición fotográfica de una sección transversal del LO a la altura de la línea punteada representada en (B). La sección fue teñida con violeta de cresilo (Técnica de Nissl). Se observa el ventrículo central y la estructura multilaminar del tectum óptico. (D) Detalle de un sector correspondiente al rectángulo representado en (C). La sección fue teñida con el intercalante de bases SYTOX green.

6.1 El lóbulo óptico

En las aves los LO se encuentran muy desarrollados anatómicamente, formando dos estructuras globulares a ambos lados de la línea media del encéfalo, cubiertas parcialmente en el animal adulto por los hemisferios cerebrales y por el

cerebelo (LaVail & Cowan, 1971). El LO recibe la mayor parte de las aferencias del tracto óptico que es la continuación, en el SNC, del nervio del mismo nombre formado por los axones de las células ganglionares de la retina. Es, por lo tanto, una estructura homóloga al colículo superior de mamíferos.

Secciones del LO revelan una estructura laminar que presenta alternadamente capas celulares y plexiformes, denominada tectum óptico (TO, Figuras 5C y 5D). Ramón y Cajal numeró 15 estratos en el LO comenzando por el estrato óptico superficial (Ramón y Cajal, 1911). La terminología utilizada actualmente es la nomenclatura propuesta por Huber y Crosby que distingue seis láminas principales, una de las cuales está subdividida en 10 láminas que alternan capas celulares y plexiformes (Huber, 1933)

El TO presenta una alta proporción de sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas, siendo además un modelo representativo de plasticidad durante el desarrollo. En nuestro laboratorio, hemos descrito la ontogenia de los sitios receptores GABAérgicos y de benzodiazepinas, y su modulación por factores ambientales (Gravielle *et al.*, 1992) y diversas drogas tales como: benzodiazepinas (Fiszer de Plazas, 1990) y barbitúricos (Fiszer de Plazas *et al.*, 1995)

El desarrollo embrionario del LO puede dividirse en tres fases principales (La Vail JH y Cowan WM, 1971). Durante la primera fase (3 a 6 días de incubación) se produce el período de máxima proliferación celular, con un pico en el DE 5. La segunda fase (6 a 12 días de incubación) se caracteriza por el desarrollo del proceso de estratificación que comienza a medida que un gran número de células diferenciadas migran verticalmente del neuroepitelio hacia las meninges. En particular, a partir del DE 12 no aparecen nuevos elementos celulares y comienza el proceso de sinaptogénesis (Mey & Thanos, 2000). Durante la tercer fase (12 a 18 días de incubación) se completa la diferenciación citoarquitectónica del LO.

Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis ha sido elucidar las vías moleculares y eventos de señalización celular que forman parte de los mecanismos de injuria y neuroprotección, utilizando para ello un modelo de hipoxia aguda experimental desarrollado en el laboratorio.

De ese objetivo general, se derivan los siguientes objetivos específicos:

- 1- Analizar la magnitud y cinética temporal de daños oxidativos en lípidos y DNA luego de un evento hipóxico.
- 2- Determinar si la hipoxia induce la activación de la vía apoptótica intrínseca.
- 3- Evaluar la posible modulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) por la hipoxia.
- 4- Estudiar daños bioquímicos y ultraestructurales tempranos en mitocondrias y su posible dependencia de óxido nítrico (NO), mediante la administración de inhibidores específicos de nNOS/mtNOS.
- 5- Desarrollar un modelo de neuroprotección por preconditionamiento hipóxico.
- 6- Determinar el rol de la activación de HIF-1 en la muerte neuronal y la neuroprotección por preconditionamiento hipóxico mediante la administración de moduladores de las HIF-prolil hidroxilasas
- 7- Evaluar el efecto conjunto del preconditionamiento hipóxico y la inhibición de nNOS/mtNOS sobre la muerte celular inducida por hipoxia.

Materiales y Métodos

1. Animales

Se utilizaron embriones de pollo, de la especie *Gallus gallus domesticus*, pertenecientes a la raza White Leghorn. Los embriones fueron colocados en una incubadora Franken (fabricación nacional), sin iluminación -excepto durante su manipulación- a una temperatura constante de 37°C y una humedad del 60%. El volteo automático de los huevos se realizó cada 30 min, a fin de permitir un correcto desarrollo de las membranas extraembrionarias (Tazawa, 1980).

2. Tratamiento hipóxico

Para efectuar el tratamiento hipóxico los huevos, en el día embrionario (DE) 12, fueron colocados en una cámara plástica con una capacidad aproximada de 10 litros (aproximadamente 30 huevos embrionados), herméticamente sellada. Dicha cámara se ubicó dentro de la incubadora manteniendo las mismas condiciones de temperatura, humedad y presión de incubación. Durante un lapso de un minuto se perfundió la cámara con un flujo de 20 l/min de una mezcla de O₂ al 8 % y N₂ al 92 %, con las válvulas de escape de gases abiertas, para permitir el lavado del aire normóxico existente en la cámara. A continuación se redujo el flujo a 1 l/min, se cerraron las válvulas y se realizó el tratamiento durante 60 min. El escape del gas en exceso se produjo por una válvula de retención que permitió la salida del mismo sin la entrada de aire atmosférico, y sin aumento de la presión interna en la cámara hipóxica. Asimismo un reservorio con hidróxido de calcio (Rodríguez & Vidal SRL., Bs.As. Arg.) se colocó dentro de la cámara para absorber el CO₂ formado durante el tratamiento y así impedir su posible acumulación.

Luego del tratamiento hipóxico los animales fueron procesados para los estudios bioquímicos o moleculares o bien dejados en un ambiente normóxico para su recuperación. Los embriones que sirvieron como controles fueron aquellos que no pasaron por la cámara de hipoxia.

3. Diseño experimental

Se realizaron tres diseños experimentales, delineados esquemáticamente en la Figura 6.

El primer diseño consiste en el tratamiento hipóxico (8% O₂, 60 min) en el DE 12. Los grupos experimentales de este diseño son embriones procesados a distintos tiempos post-hipoxia. En algunos casos, 20 min antes de la hipoxia, los embriones recibieron una dosis de L-NAME (*N*^ω-nitro-L-arginina-metil ester, inhibidor general de todas las isoformas de NOS) o de 7-NI (7-nitroindazol, inhibidor selectivo de nNOS/mtNOS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Solución fisiológica y DMSO fueron sus respectivos vehículos.

El segundo diseño consiste en un preconditionamiento hipóxico (8% O₂, 40 min) de los embriones en el DE 11, seguido de un tratamiento hipóxico (8% O₂, 60 min) 24 h después, es decir, en el DE 12. En algunos casos, 20 min antes del preconditionamiento hipóxico, los embriones recibieron una dosis de Fe²⁺, preparada a partir de una solución de FeCl₂ (Mallinckrodt, Hazelwood MO USA) o de ascorbato (Carlo Erba, Italia), en ambos casos el vehículo fue solución fisiológica. En otros casos, el preconditionamiento hipóxico fue sustituido por la administración de CoCl₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en el DE 11.

El tercer diseño experimental combina la realización de un preconditionamiento hipóxico (8% O₂, 40 min) de los embriones en el DE 11, con la administración de 7-NI 20 min antes del tratamiento hipóxico (8% O₂, 60 min), que se realiza 24 h después.

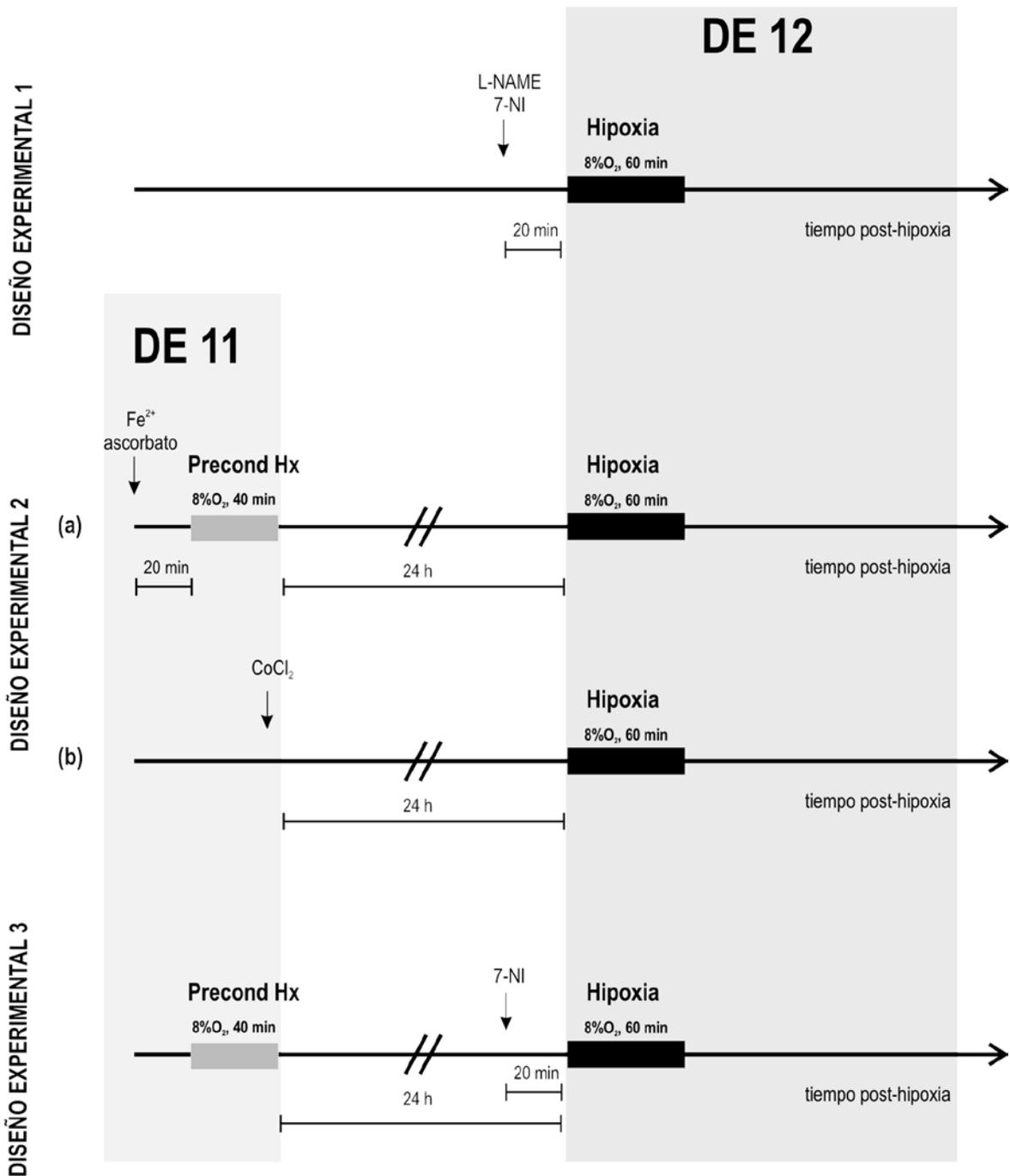


Figura 6. Diseños experimentales utilizados. En todos los casos el tratamiento hipoxico (8% O₂, 60 min) se realizó en el día embrionario (DE) 12. Cuando el diseño implicó un precondicionamiento hipoxico (8% O₂, 40 min), este se realizó en el DE 11 (2a). Alternativamente, el precondicionamiento con cloruro de cobalto (CoCl₂, 2b) también se realizó en el DE 11. La administración de fármacos se realizó 20 min antes del precondicionamiento o del tratamiento hipoxico.

4. Administración *in vivo* de fármacos

Para efectuar la administración *in vivo* en forma estéril de distintos fármacos durante la incubación de los embriones se utilizó la técnica de Hamburger (Hamburger, 1960) modificada por Calkin y col (Calkin *et al.*, 1994). Brevemente, la técnica consiste en remover un sector rectangular de la cáscara de aproximadamente 25 mm² y aplicar, mediante el uso de una micropipeta, el fármaco sobre la membrana corion-alantoidea. Las concentraciones finales de los fármacos fueron calculadas considerando un volumen final de 50 ml/huevo. Los volúmenes administrados fueron de 100 µl/huevo.

5. Fraccionamiento subcelular

Los embriones fueron sacrificados por decapitación y los lóbulos ópticos (LO) rápidamente disecados y colocados en PBS a 0°C.

5.1 Aislamiento y purificación de mitocondrias

Las mitocondrias fueron aisladas mediante centrifugación diferencial y purificadas a través de un gradiente discontinuo de sacarosa, siguiendo un procedimiento previamente descrito para tejido nervioso (Rodriguez De Lores Arnaiz & De Robertis, 1962) con modificaciones menores. Brevemente, para cada tratamiento experimental, los LO de por lo menos 10 embriones fueron homogeneizados (1/3 p/v) en buffer SHE 0,32 M (298 mM sacarosa, 0,5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 2 mM HEPES, leupeptina 1 µM, aprotinina 1 µM, pepstatina 1 µM, PMSF 1 µM, pH 7.4) a 4°C. El homogenato fue centrifugado a 600g por 10 min. El pellet (fracción nuclear cruda) fue lavado dos veces mediante una rápida re-homogenización en buffer 0,32 SHE, en relación 1/2 y 1/1 p/v del peso original del tejido, respectivamente, y centrifugados nuevamente. Los sobrenadantes fueron agrupados y centrifugados a 10.000g por 20 min. Se obtuvo un nuevo sobrenadante (S2) y la fracción mitocondrial cruda como pellet. Esta última se resuspendió en buffer SHE 0,32 M y se colocó cuidadosamente en la parte superior de un gradiente formado con pasos de 12 ml de buffer SHE 0,8M (778 mM sacarosa, 0,5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 2 mM HEPES, pH 7.4) y 12 ml de buffer SHE 1,2M

(1178 mM sacarosa, 0,5 mM EDTA, 20mM Tris-HCl, 2 mM HEPES, pH 7.4). Los gradientes fueron centrifugados durante 2h a 65.000g en un rotor SW-28, separando a las mitocondrias (pellet) de los sinaptosomas (en la interfaz 0,8 y 1,2M). El pellet mitocondrial fue lavado en 20 ml de buffer SHE 0,32M, centrifugado a 100.000g por 30 min y resuspendido en el mismo buffer.

La pureza de las fracciones fue determinada comparando la actividad de lactato deshidrogenasa (marador citosólico) y NADPH-citocromo c reductasa (marcador microsomal) con la actividad citocromo oxidasa (marcador mitocondrial). Los valores de contaminación fueron siempre menores al 5%.

5.2 Obtención de fracciones citosólicas

Para obtener fracciones citosólicas, los LO fueron homogeneizados en buffer de homogeneización (sacarosa 320 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, molibdato de amonio 1 mM, leupeptina 1 μM, aprotinina 1 μM, pepstatina 1 μM, PMSF 1 μM, pH 7,4). Las muestras fueron centrifugadas a 100.000g por 30 min, y el sobrenadante (fracción citosólica) alicuotado y guardado a -20°C.

5.3 Purificación de núcleos y obtención de fracciones nucleares solubles

LO de 6 embriones (~0,6g) fueron homogenizados en una relación 1/10 p/v en buffer A (sacarosa 0,32 M, Tris-HCl 20mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1 mM, espermidina 75 μg/ml; inhibidores de fosfatasa: NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, molibdato de amonio 1 mM; inhibidores de proteasas: leupeptina 1μM, aprotinina 1μM, pepstatina A 1μM, PMSF 1μM, pH 7,4). El homogenato fue centrifugado a 75g por 4 min. Se recupera el sobrenadante (S₁) cuidadosamente, para evitar remover el laxo pellet rojizo (HDC, *high density contaminants*). S₁ fue centrifugado a 900g por 10 min. Se descarta el sobrenadante (S₂) y el pellet (P₁) se lavó mediante rehomogenización en buffer A y una nueva centrifugación. El nuevo pellet (NEF, *nuclear enriched fraction*) es más pálido y compacto que HDC. NEF fue resuspendido 3 ml de buffer A, al que se le agregan 3 ml de buffer B (sacarosa 1,6 M,

Tris-HCl 20mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, espermidina 75 µg/ml, PMSF 1µM, pH 7,4). La concentración final de sacarosa de la solución es aproximadamente 1 M. La fracción NEF resuspendida fue sembrada cuidadosamente sobre un colchón de sacarosa (6 ml de buffer B) en un tubo de ultracentrífuga. Las muestras se centrifugaron a 80.000g en un rotor de ángulo móvil (SW 28) por 35 min. Luego de la centrifugación se utilizó una pipeta Pasteur para remover una capa de material membranoso y blanquecino formado en la interfaz 1 M/1,6M del gradiente. Los núcleos purificados forman un pellet compacto y opaco en el fondo del tubo (P₂). P₂ fue resuspendido en 0,5 ml de buffer A, colocado en un tubo de microcentrífuga (1,5 ml) y centrifugado por 30 seg a máxima velocidad. El pellet conteniendo los núcleos aislados es la fracción nuclear purificada (PNF, *purified nuclear fraction*), que puede ser procesada inmediatamente o guardada a -70°C.

Para realizar la extracción de proteínas nucleares, PNF fue resuspendida en 0,5 ml de buffer de extracción (HEPES 20mM, NaCl 0,5M, MgCl₂ 1,5mM, EDTA 0,2 mM, Triton-X-100 1% v/v, SDS 0,025% p/v, DTT 1mM, PMSF 1µM, glicerol 20%, pH 7,9) e incubada 30 min en agitación suave a 4°C. Posteriormente, los núcleos fueron lisados completamente mediante 10 pasajes por una jeringa de 18 gauges. Las muestras se centrifugaron a 9.000g por 30 min en una microcentrífuga. El sobrenadante, la fracción nuclear soluble (SNF, *soluble nuclear fraction*) fue alicuotada y guardada a -20°C, en tanto que el pellet formado por la fracción insoluble (IF, *insoluble fraction*) fue descartado.

6. Método de Lowry

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). 10 µl de muestra (5-40 µg) de proteínas se mezclaron con 10 µl de desoxicolato 5 % y se llevó a 0.8 ml con agua. A esta dilución se le agregaron 2 ml de buffer de reacción (1 % CuSO₄.5H₂O 1 % tartrato de NaK, 2 % Na₂CO₃ en Na OH 0.1M en proporción 0.1:0.1:10). Se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó 0.2 ml de reactivo de Folin (dil 1:3). Luego de 30 minutos se midió la absorbancia a 725 nm. Se determinó la

concentración de proteínas por extrapolación de las unidades de absorbancia obtenidas dentro de una curva de calibración realizada con seroalbúmina bovina como estándar.

7. Ensayo de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*)

La cuantificación de daños oxidativos a lípidos se realizó mediante la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo con el procedimiento descrito por Ohkawa y colaboradores (Ohkawa *et al.*, 1979), con modificaciones menores. Brevemente, homogenatos de LO (200 µg proteína) fueron mezclados con una solución 1 µM de sulfato de cobre en buffer HEPES 5mM (volumen final: 400 µl). Luego se agregó 1 ml de una solución 0,375% ácido tiobarbitúrico/15% ácido tricloroacético en HCl 0,25 N, y se incubó durante 30 min a 90°C. Posteriormente, las muestras fueron clarificadas por medio de una centrifugación (1.500 rpm por 10 min). Los sobrenadantes fueron removidos y cuantificados en un espectrofotómetro de fluorescencia (excitación 520 nm, emisión 553 nm) mediante la extrapolación a una curva de calibración de tetrametoxipropano en HCl 0,01 N. Los resultados fueron expresados como nmoles de TBARS por mg. de proteína.

8. Western blot

Las muestras fueron desnaturalizadas en buffer muestra (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.002% azul de bromofenol) a 100 °C durante 10 min y separadas en geles de poliacrilamida-SDS de 7,5 a 18 % de poro, conteniendo 20 a 80 µg de proteína por calle. Las proteínas son electrotransferidas desde el gel a membranas de PVDF-Plus (Millipore Corporation, MA, USA).

Antes de la exposición a anticuerpos específicos se hace un bloqueo con una solución de PBS-Tween-20 (PBS 1X-Tween 20 0.05%) al 4% de leche descremada y 2% de glicina, en agitación durante 1 hora. Las membranas son incubadas con los anticuerpos primarios toda la noche en agitación a 4°C. Luego, las membranas se lavaron e incubaron con segundos anticuerpos conjugados con

HRP. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia usando ECL (GE, USA).

8.1 Anticuerpos utilizados:

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-citocromo c (dilución: 1/1000), anti-actina (dilución: 1/1000), anti-HIF-1 α (dilución: 1/700), anti-histona H3 (dilución: 1/700), anti-VDAC (dilución: 1/500), anti-nNOS (dilución: 1/500), anti-subunidad de 39-kDa del complejo I (dilución: 1/1000), anti-subunidad de 8.8-kDa del complejo IV (dilución: 1/1000).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*) Todos los anticuerpos utilizados fueron adquiridos de la compañía Chemicon (Chemicon, Inc., CA, USA).

9. Medición de actividad de la NOS

La actividad de NOS fue determinada en fracciones mitocondriales midiendo la conversión de [H^3]L-arginina a [H^3]L-citrulina como fuera previamente descrito por Knowles y Salter (Knowles & Salter, 1998) con pequeñas modificaciones. Cada preparación (100 μ g de proteínas de fracciones mitocondriales) fue incubada con 100 μ M L-Arg, 5 μ l/ ml [H^3]L-arginina (Ae 53.4 Ci/ mmol, 5 μ Ci.ml⁻¹), 100 μ M NADPH, 0.1 μ M calmodulina, 0.1 mM CaCl₂, 1 μ M FAD, 1 μ M FMN y 1 μ M tetrahidrobiopterina en un volumen final de 100 μ l. Luego de 10 minutos de incubación a 37 °C la reacción fue detenida por el agregado de 300 μ l de buffer HEPES (HEPES 15 mM, H-EDTA 1.5 mM, pH 5.5). La [H^3]L-arginina no consumida fue separada de la mezcla de reacción por agregado de una suspensión 1:2 de resina de intercambio catiónico Dowex AG 50WX-8. Esta mezcla fue agitada vigorosamente, para favorecer el pegado de la [H^3]L-arginina a la resina y luego centrifugada 30 segundos a máxima velocidad. Se tomaron 400 μ l del sobrenadante que fueron mezclados con 1 ml de líquido de centelleo. Las muestras se midieron durante 1 minuto en un contador de centelleo líquido para partículas beta (Wallac, 1414 Liquid centillation counter). Las cuentas por minuto (cpm) se convirtieron a nmoles [H^3]L-citrulina.min⁻¹.mg proteína⁻¹ utilizando totales (muestras sin

resina) y blancos (sin proteína). La actividad específica de NOS se determinó luego de restarse las cpm obtenidas en presencia del inhibidor competitivo en una concentración 50 veces mayor (5mM) que el sustrato (L-Arg).

10. Medición de actividad NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)

La actividad del complejo I fue determinada espectrofotométricamente monitoreando la reducción de una solución de NADH 0,1 mM ($\epsilon_{340\text{nm}}=6,81 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando benzoquinona 10 μM como aceptor de electrones. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 1 mM de KCN. La actividad específica del complejo I se determinó mediante su inhibición con rotenona 1 μM . Los resultados fueron expresados como nmoles de NADH oxidados por minuto por mg de proteína o como porcentaje de la actividad control.

11. Medición de actividad citocromo c oxidasa (Complejo IV)

La actividad de citocromo oxidasa fue monitoreada espectrofotométricamente por la oxidación de 50 μM de citocromo c reducido en un espectrofotómetro Hitachi U-3000 a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción se llevó a cabo con 50 μg de proteína a 30 °C en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.2. La velocidad de la reacción fue determinada como la pseudoconstante de primer orden k' y expresada como $k' \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de prot⁻¹.

11.1 Preparación de citocromo c reducido

Se disolvieron 24,8 mg de citocromo c en 2 ml de buffer fosfato 10 mM, pH 7,2 y se añadieron 10 mg de ácido ascórbico (reductor). Luego se pasó por una columna de Sephadex G25 para eliminar el ácido ascórbico que no reaccionó, eluyendo con buffer fosfato 10 mM. Se tituló espectrofotométricamente a 550 nm haciendo una dilución previa 1:20 en buffer fosfato 10 mM, pH 7,2. $\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

12. Medición de la actividad lactato deshidrogenasa:

La actividad de esta enzima fue medida espectrofotométricamente mediante la oxidación NADH a 340 nm. 25 µg de proteínas fueron agregados a buffer fosfato 100 mM, pH 7, en presencia de 1 mM de ácido pirúvico, 0,1% de Tritón X-100 y 0,22 mM de NADH. $\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

13. Secciones histológicas parafinadas

Los encéfalos fueron fijados en paraformaldehído al 4% (PFA, pH 7,4) toda la noche a 4°C y luego expuesto a pasos de deshidratación crecientes (desde etanol 70% a etanol 100%. Posteriormente, se realizó un aclaramiento con xilol 100%, un pasaje por xilol-parafina y por último se efectuó la inclusión en parafina.

El tejido incluido y presentado en un taco fue seccionado en un micrótomos de mesada. Se realizaron cortes transversos y seriados de 5 µm de espesor, ~~máximo~~ ^{máximo} aproximadamente entre 3 y 4 cortes en portaobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina (0,1 mg/ml). Las distintas muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su utilización.

14. Inmunofluorescencia

Las secciones histológicas fueron desparafinadas y rehidratadas. Se realizó un paso de recuperación antigénica colocando las secciones a 95°C en una solución de citrato de sodio 10 mM, pH: 6,0, por 40 min. Para minimizar la uniones inespecíficas durante la incubación con los anticuerpos, se realizó un tratamiento de bloqueo con suero fetal bovino al 5% en PBS/Tritón X-100 0,1%/Tween 20 0,05%/BSA 1%. El anticuerpo primario anti-8dOHG (Chemicon, Inc., CA, USA) (1:200) fue diluido en PBS/ Tritón X-100 0,1%/Tween 20 0,05%/ BSA 1% e incubado toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con AMCA (Chemicon, Inc., CA, USA) se diluyó en PBS y fue incubado con las secciones por 2 hs a 37°C. Se utilizó ioduro de propidio como contraste nuclear y se utilizó medio de montaje adecuado para fluorescencia (Fluorsave, DAKO). Los controles negativos no mostraron *background* ni señales inespecíficas.

15. Técnica de TUNEL

Para visualizar el rupturas en el ADN doble cadena en núcleos apoptóticos *in situ*, el tejido de SNC de pollo fue sujeto a la técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling*) realizada según instrucciones de los fabricantes (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL 31 System Kit, Promega Madison, USA)

Las secciones de tejido fueron desparafinizadas y rehidratadas. Luego se incubaron en buffer de equilibrio por 10 min, seguida de una incubación en buffer de reacción (buffer de equilibrio + mezcla de nucleótidos con dUTP conjugados con fluoresceína + enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, TdT) 1 hora a 37°C. La reacción fue detenida mediante el agregado de SSC 2X, 15 min, lavadas y contrateñidas con Hoechst 33258 por 10 min.

16. Conteo de células

En el DE 12, el eje anatómico longitudinal es paralelo al eje de desarrollo, por lo que las secciones histológicas del LO poseen un polo rostral y uno caudal. Para eliminar cualquier variable debida al desarrollo, todas las mediciones fueron realizadas en regiones equidistantes de los polos rostral y caudal.

Las imágenes fueron obtenidas con 200X de aumento en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) mediante una cámara CCD. Las células positivas fueron cuantificadas y expresadas como células positivas/mm². Las cuantificaciones se realizaron utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

17. Microscopía electrónica

Inmediatamente luego de su disección, los LO fueron cortados en cubos de 1-2 mm³ y sumergidos en una solución 2,5% p/v de glutaraldehído disuelto en buffer fosfato 0,1 M durante 2hs a 4°C. Alternativamente, se fijaron las fracciones subcelulares descriptas anteriormente: HDC, NEF, PNF e IF. A continuación, las muestras fueron post-fijadas en la misma solución buffer suplementada con 1% p/v de tetróxido de osmio. Luego de dos lavados de 15 min con agua milliQ, las muestras se sumergieron durante 2h en acetato de uranilo 5% p/v, e inmediatamente fueron

deshidratadas. Luego de la inclusión en Durcupan, secciones ultrafinas (70-90 nm) fueron contrastadas con el método de Reynolds (Reynolds, 1963).

Para el análisis de la morfología de las mitocondrias, las micrografías fueron obtenidas con un aumento de 40.000X, con un microscopio electrónico Zeiss C 10. Se analizaron por lo menos 100 mitocondrias para cada condición experimental. Dado que las mitocondrias presentan formas elípticas en las microfotografías, el área de cada organela fue calculada midiendo los radios longitudinales y latitudinales, r_1 y r_2 , respectivamente. El área ocupada por cada mitocondria fue calculada siguiendo la fórmula del área de una elipse: $\pi \cdot r_1 \cdot r_2$.

18. Inmunomarcación con oro

Las muestras fueron fijadas con el procedimiento descrito para microscopía electrónica, pero incluidas en la resina LR-White (London Resin Co. Hampshire, UK). Secciones ultrafinas fueron montadas en grillas de níquel, bloqueadas durante 45 min con una solución 0,2%BSA/0,1% Tween 20 en PBS a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS, las grillas fueron incubadas en cámara húmeda toda la noche a 4°C con una gota de anticuerpo primario (dilución 1/20). Luego de tres lavados con PBS, las grillas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro (dilución 1/50, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO) durante 2 hs. Las secciones fueron posteriormente contrastadas suavemente con acetato de uranilo. El control negativo, omitiendo el anticuerpo primario, no presentó marcación con oro. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-109 T a 80 kv.

19. Análisis de los datos

Para comparar las frecuencias de daños ultraestructurales se utilizó una prueba de bondad de ajuste (test χ^2).

En el resto de los casos, los datos se analizaron por ANOVA de una vía, y por método de Dunnett de comparaciones a posteriori. En el caso en el que los grupos experimentales a comparar fueran

sólo dos, se utilizó el test t de Student. Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedacia. La significancia estadística fue aceptada cuando $p < 0,05$.

Resultados

1. La hipoxia-reoxigenación induce un incremento en los índices de stress oxidativo

Se analizaron dos indicadores de stress oxidativo a lo largo de 9 h posteriores a la reoxigenación: el daño oxidativo a lípidos mediante el ensayo de TBARS (*thiobarbituric acid-reactive substances*, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) en homogenatos de lóbulo óptico (LO), y el daño oxidativo en el ADN mediante la cuantificación por inmunofluorescencia de residuos de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8dOHG) en secciones histológicas del LO. 8dOHG es un derivado oxidado de la deoxiguanosina y uno de los biomarcadores principales de la oxidación del ADN.

La cinética temporal de TBARS mostró un aumento significativo máximo a las 2 h post-hipoxia (Tabla 1)

	nmoles TBARS/mg. prot.	%cambio
control	14,28 ± 3,25	-
<i>tiempo post-hipoxia</i>		
0h	13,37 ± 2,10	-6,35
0,5h	14,02 ± 2,00	-1,76
1h	15,13 ± 3,60	6,00
1,5h	18,56 ± 3,05*	29,97
2h	21,56 ± 3,24**	50,98
4h	16,76 ± 2,21*	17,36
6h	14,48 ± 2,32	1,40
9h	14,24 ± 3,18	-0,28

Tabla 1. Daños oxidativos en lípidos inducidos por hipoxia-reoxigenación

Se midieron TBARS espectrofotométricamente en homogenatos de LO. Los valores son promedios ± SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto del control (**p < 0.01, *p < 0.05, ANOVA y post-test de Dunnett).

Coincidentemente, la cuantificación de células positivas para 8-dOHG mostró un aumento significativo a las 2 h post-hipoxia (Figura 7).

El análisis de las microfotografías ópticas reveló que la marca positiva de 8-dOHG no coincidía exactamente con el núcleo, sino que también se extendía por fuera de él, adoptando una distribución 'granular', compatible con la existencia de daños oxidativos en el ADN mitocondrial.

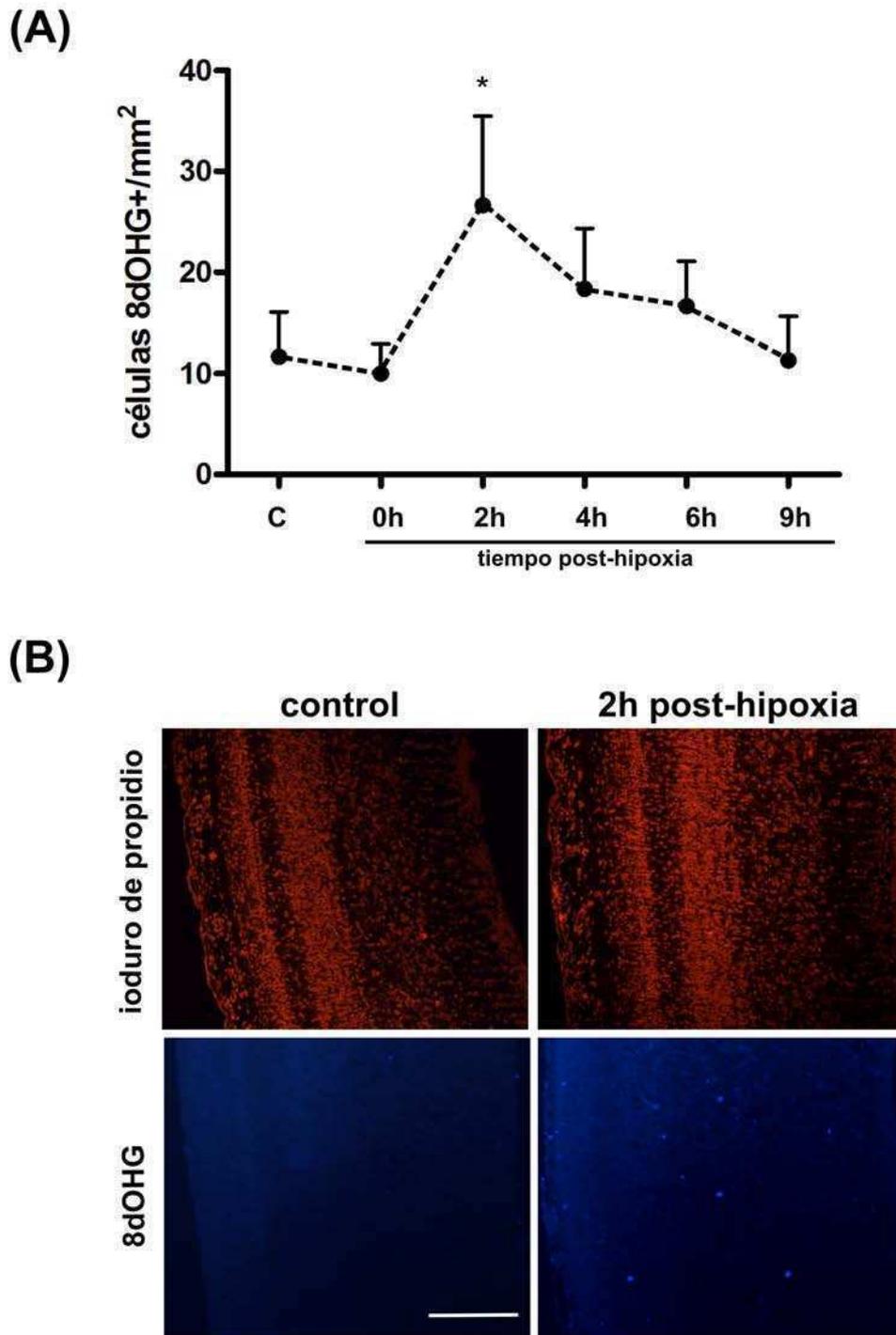


Figura 7. Daños oxidativos en el ADN inducidos por hipoxia/reoxigenación. (A) Cinética temporal de células positivas para 8-deoxiguanosina (8-dOHG). Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. *Significativamente distinto del control ($p < 0.05$, ANOVA y post-test de Dunnett). (B) Microfotografías mostrando secciones histológicas del LO teñidas con el contraste nuclear ioduro de propidio (rojo) y con inmunomarca positiva para 8-dOHG (azul). Barra: 300 μ m.

Para determinar exactamente la localización subcelular de la marca positiva, realizamos una inmunomarcación con oro que fue visualizada mediante microscopía electrónica. De acuerdo con lo esperado, el análisis de las microfotografías electrónicas reveló la presencia de 8-dOHG en el núcleo y en las mitocondrias (Figura 8). La mayoría de las marcas se encontraron en el núcleo, hecho que probablemente refleja el mayor contenido de bases del ADN nuclear que pueden ser utilizadas como sustrato de reacciones oxidativas.

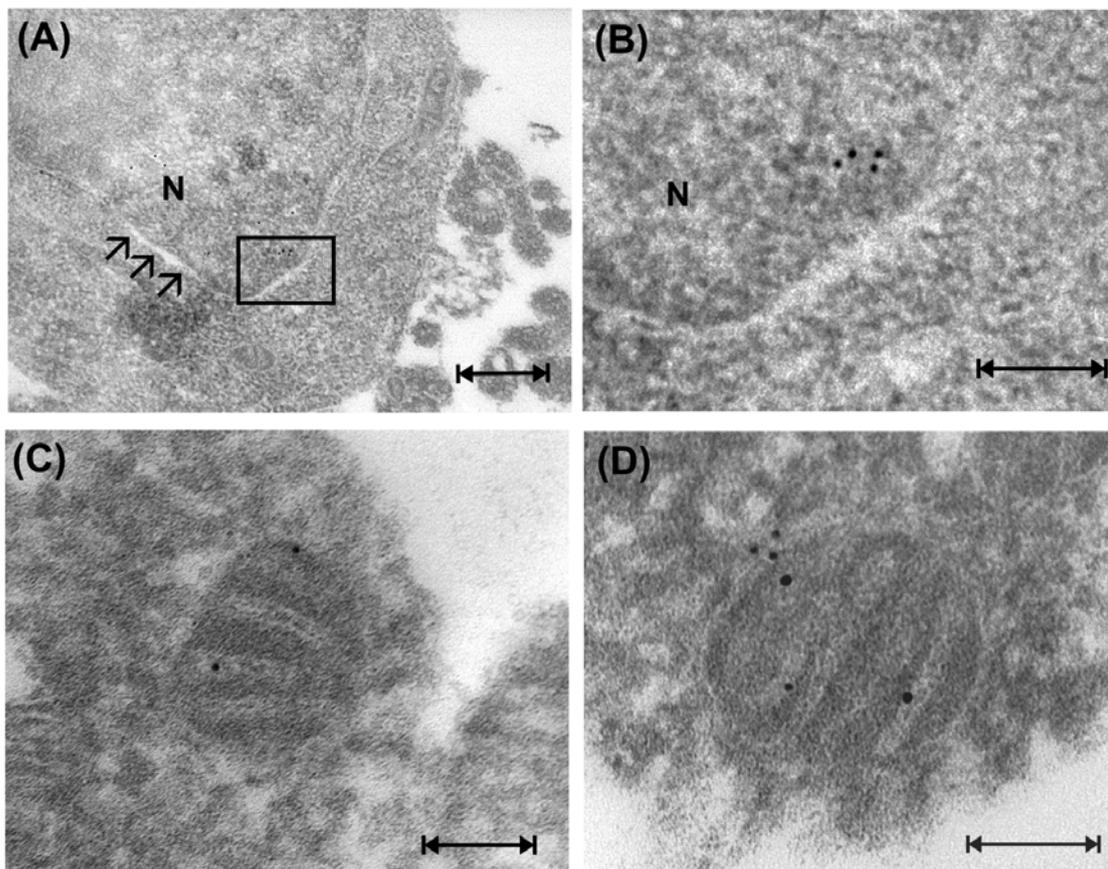


Figura 8. Localización nuclear y mitocondrial de los daños oxidativos en el ADN. Microfotografías electrónicas de secciones de LO inmunomarcadas con oro, utilizando anticuerpos específicos para 8-deoxiguanosina (partículas de oro de 10 nm). El ensayo se realizó a las 2h post-hipoxia. (A) Célula con marca en el compartimiento nuclear (N). Se observa el límite entre el núcleo y el citoplasma (flechas). Barra: 350nm. (B) Detalle de la sección rectangular que se muestra en (A). Se observan partículas de oro en el núcleo. Barra: 150 nm. (C) Mitocondria con marcas positivas. Barra: 100 nm. (D) Mitocondria en la que se observan marcas positivas para una doble inmunomarcación. Las muestras fueron tratadas con anticuerpos específicos para la subunidad de 39 KDa del Complejo I (partículas 5 nm) y para 8-deoxiguanosina (partículas 10 nm). Barra: 100nm.

2. La hipoxia-reoxigenación induce la translocación de citocromo c al citosol

Analizamos la cinética de liberación de citocromo c hasta las 9h post-hipoxia (Figura 9). Se determinó la presencia de citocromo c en fracciones citosólicas mediante western blot. Un incremento agudo y significativo fue observado a las 4 h post-hipoxia, regresando a valores control 2 h después.

En conjunto con otros marcadores de muerte celular medidos en el laboratorio, tales como la activación de caspasa-3 y la fragmentación del ADN, este resultado sugiere fuertemente la progresión de un mecanismo apoptótico de muerte celular.

Dado que las mitocondrias juegan un rol central tanto en la integración de señales pro- y anti-apoptóticas como en la producción de especies oxidantes, decidimos estudiar a continuación: a- los cambios ultraestructurales tempranos en mitocondrias y b- la posible modulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) por la hipoxia.

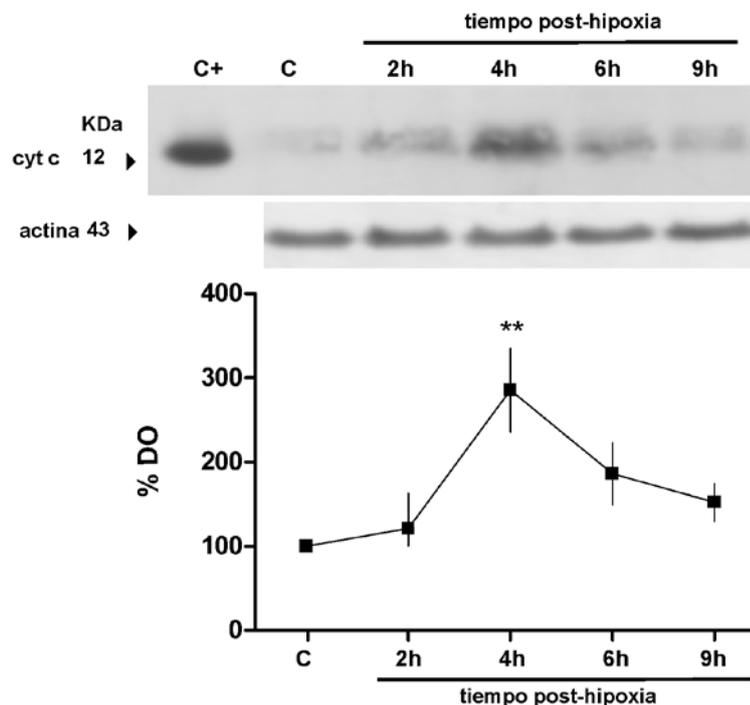


Figura 9. Cinética de liberación de citocromo c. Inmunoblot representativo de fracciones citosólicas reveladas con anticuerpo anti-citocromo c. Se incluye el análisis densitométrico normalizado al valor control. Las membranas fueron strippeadas y rehibridadas con anti-actina para confirmar igual carga de proteínas. C+: citocromo c equino purificado fue utilizado como control positivo. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto del control (**p < 0.01, ANOVA y post-test de Dunnett).

3. Cambios ultraestructurales en las mitocondrias inducidos por hipoxia-reoxigenación

Las mitocondrias provenientes de animales controles mostraron al microscopio electrónico crestas bien definidas e integridad de sus membranas. Los principales indicadores de daño ultraestructural luego del evento hipóxico estuvieron fuertemente asociados con el fenotipo de *swelling* mitocondrial: pérdida de electrondensidad de la matriz con crestas poco definidas, dilataciones dentro de las crestas y ruptura de las membranas (Figura 10A). Observamos un período agudo de daño en las 2 primeras horas de reoxigenación demostrado por la coincidencia de los valores más altos de los parámetros de daño (Figura 10B). De manera coincidente, el área promedio ocupada por cada mitocondria, un indicador de *swelling*, se incrementó durante el mismo período (Tabla 2).

Tratamiento	Área ($\times 10^4$ nm ²)
Control DE 12	4.64 \pm 0.35
Control DE 13	5.12 \pm 0.39
Control DE 14	4.54 \pm 0.41
<i>Tiempo post-hipoxia</i>	
0h	5.53 \pm 0.45
1h	10.86 \pm 2.85**
2h	10.05 \pm 1.04*
3h	7.87 \pm 0.80
4h	6.63 \pm 0.64
24h (DE 13)	5.04 \pm 0.36
48h (DE 14)	4.94 \pm 0.38

Tabla 2. Área ocupada por cada mitocondria. Al menos 100 mitocondrias fueron analizadas en cada condición. ED, día embrionario. Los valores son promedios \pm SEM. Significativamente distinto de valores controles pareados por día embrionario (**p < 0.01, *p < 0.05, ANOVA y post-test de Dunnett).

En períodos tardíos de reoxigenación, i.e 24 y 48 h luego de la hipoxia, no se encontraron diferencias respecto de los controles pareados por día embrionario (DE). La reversión de los daños mitocondriales probablemente se deban a la pérdida de células afectadas y no a un incremento en la biogénesis mitocondrial, ya que western blots de fracciones citosólicas y mitocondriales no

mostraron diferencias en mTFA, un marcador de biogénesis mitocondrial, hasta las 48 h post-hipoxia (datos no mostrados)

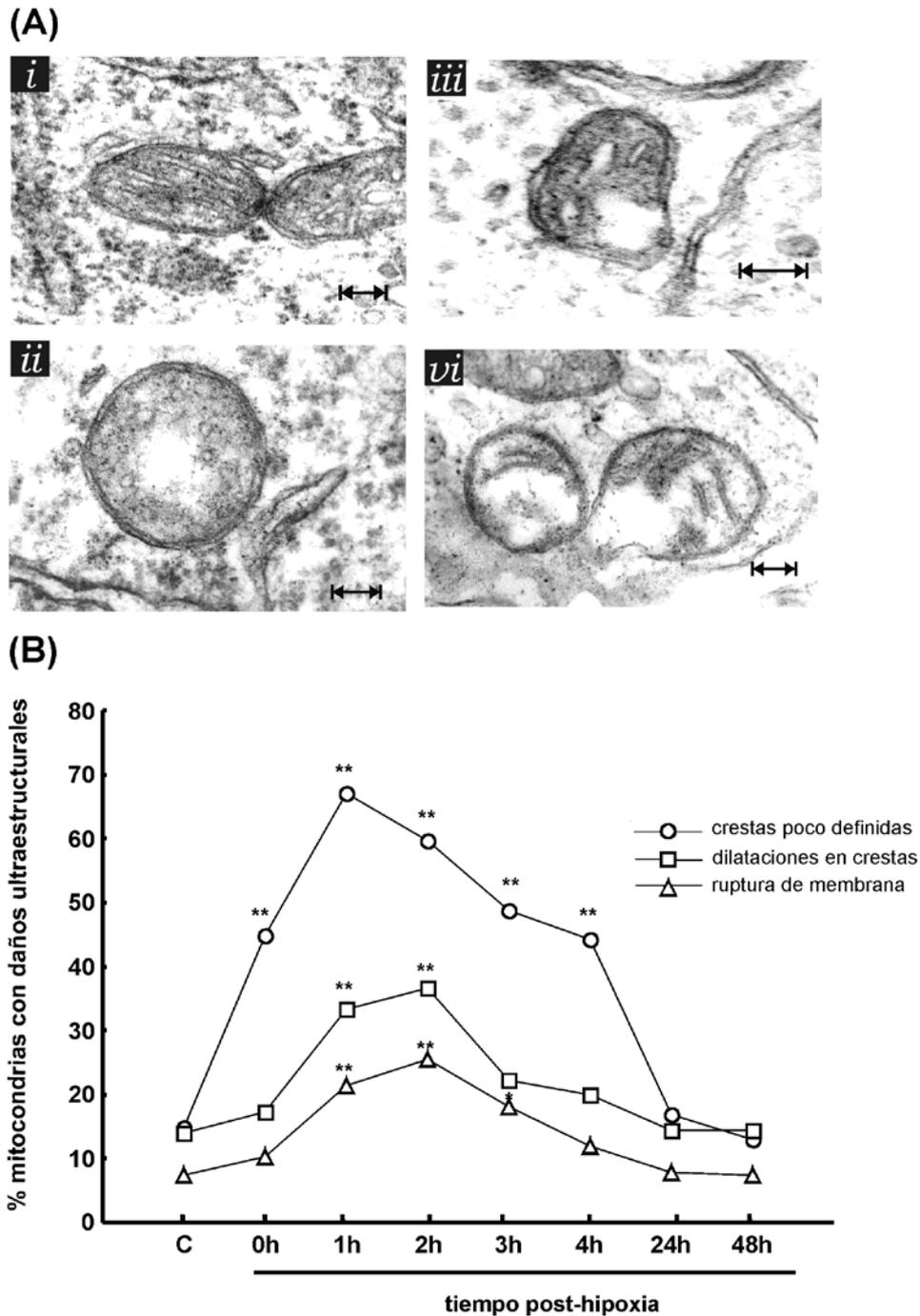


Figura 10. La hipoxia-reoxigenación produce cambios ultraestructurales en las mitocondrias. (A) Microfotografías electrónicas de mitocondrias de LO. (i) Mitocondrias control mostrando estructura conservada y crestas bien definidas. (ii) Crestas poco definidas, (iii) dilataciones dentro de las crestas y (iv) rupturas de la membrana son los daños ultraestructurales principales observados luego de la hipoxia-reoxigenación. (B) Curso temporal de las frecuencias de daños ultraestructurales. Al menos 100 mitocondrias fueron analizadas en cada condición. Significativamente diferente del valor control pareado por día embrionario (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, bondad de ajuste, test χ^2). Barra: 100 nm.

4. La hipoxia incrementa la expresión de mtNOS, pero no la expresión de nNOS citosólica o total

Inmunoblots de fracciones totales y citosólicas con anticuerpos específicos no revelaron variaciones sustanciales en los niveles de nNOS α respecto de valores controles hasta 4 h luego del inicio de la reoxigenación (Figura 11A-B). Sin embargo, las fracciones mitocondriales mostraron un incremento significativo, aunque transitorio, en el contenido de mtNOS hacia el fin de la hipoxia hasta las 2 primeras horas de reoxigenación (Figura 11C-D). De modo coincidente con este resultado, se observó un incremento en la tasa de producción de NO dependiente de NOS en fracciones mitocondriales, con idéntico perfil temporal (Figura 11E).

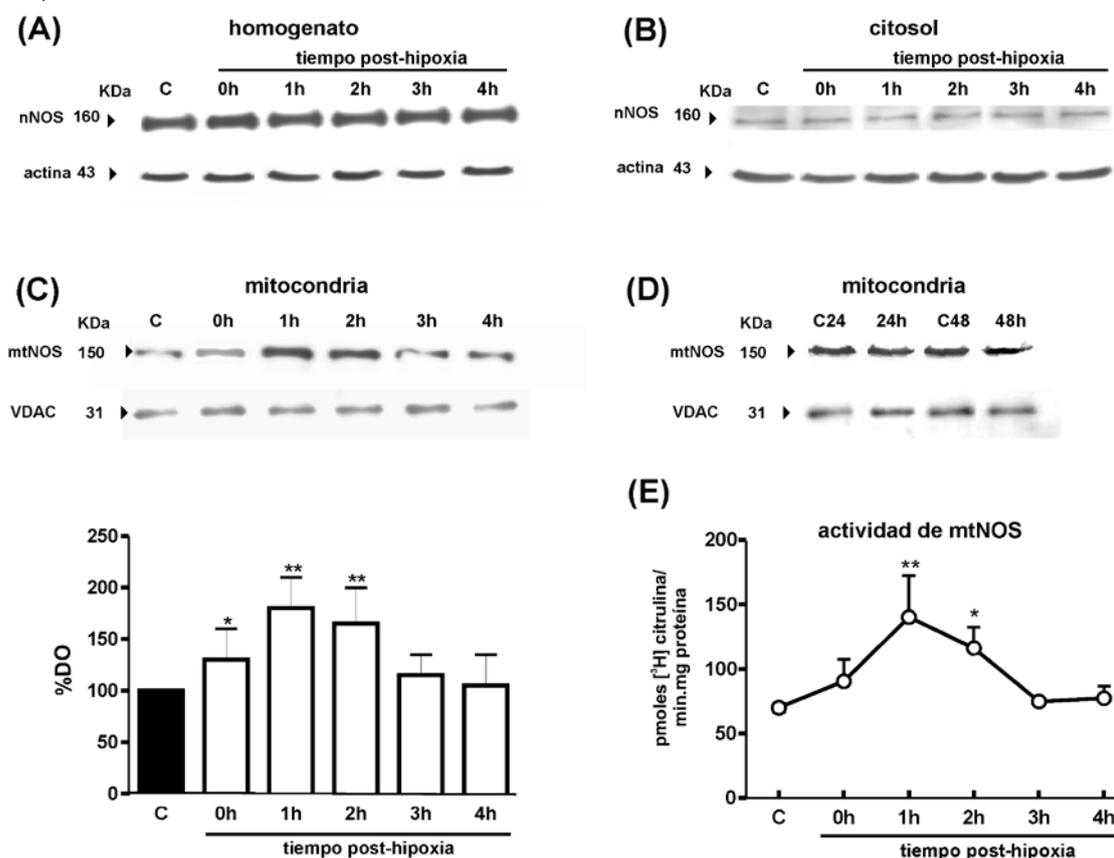


Figura 11. Inducción de mtNOS luego de hipoxia-reoxigenación. (A) Inmunoblot representativo de fracciones totales y (B) citosólicas reveladas con un anticuerpo anti-nNOS. Las membranas fueron strippeadas y rehidridadas con anti-actina para confirmar igual carga de proteínas. (C) y (D) Inmunoblot representativo de fracciones mitocondriales reveladas con un anticuerpo anti-nNOS y análisis densitométrico de la cinética temporal 0-4 h post-hipoxia. El control de carga en fracciones mitocondriales se realizó mediante el anticuerpo contra la proteína mitocondrial constitutiva VDAC (*voltage-dependent anion channel*). (e) La actividad de mtNOS en fracciones mitocondriales se midió a través de la conversión de ^3H -L-arginina a ^3H -L-citrulina. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de valores controles (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ANOVA y post-test de Dunnett).

5. La hipoxia-reoxigenación incrementa la nitración de proteínas mitocondriales

Mediante la utilización de un anticuerpo anti-3-nitrotirosina detectamos un incremento en la cantidad de proteínas mitocondriales nitradas, un biomarcador de stress nitrativo, que sigue el perfil temporal de expresión y actividad de mtNOS y que es claramente superior a la nitración que presentan las muestras controles (Figura 12A). Los valores de proteínas nitradas regresaron a valores control durante la reoxigenación tardía y hasta el fin del experimento (Figura 12B).

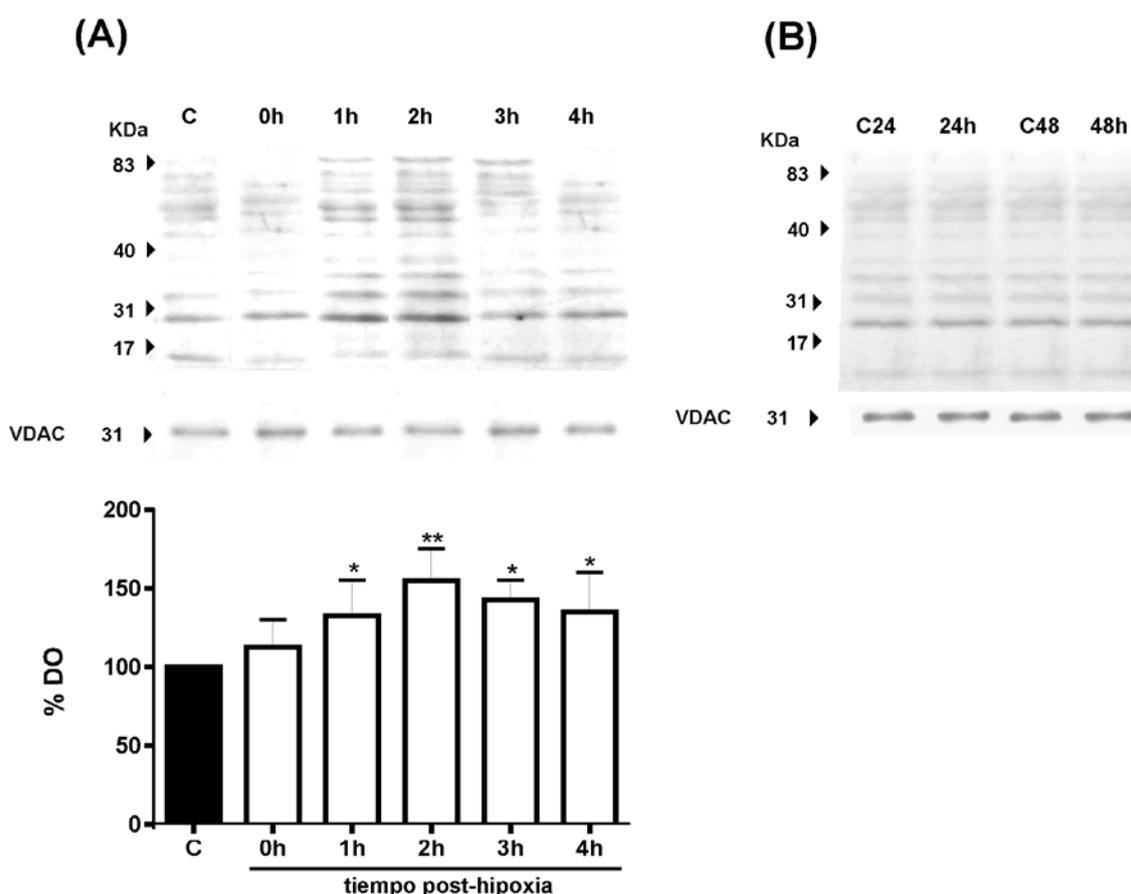


Figura 12. Nitración de proteínas mitocondriales. Immunoblot representativo de fracciones mitocondriales reveladas con anticuerpos anti-3-nitrotirosina en la reoxigenación (A) temprana y (B) tardía. Se incluye el análisis densitométrico entre las 0-4 hs. Se determinó la densidad óptica de toda la calle. El control de carga en fracciones mitocondriales se realizó mediante el anticuerpo contra la proteína mitocondrial constitutiva VDAC (voltage-dependent anion channel). Los valores de densidad óptica son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de valores controles (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ANOVA y post-test de Dunnett).

6. La hipoxia-reoxigenación produce una inhibición de la tasa de transferencia de electrones

Se determinó la tasa de transferencia electrónica mitocondrial midiendo las actividades máximas del complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y del complejo IV (citocromo c oxidasa) en fracciones mitocondriales. Bajo condiciones control, no se observaron variaciones en las actividades máximas de los complejos en ninguno de los días embrionarios estudiados. El valor promedio para el complejo I fue de $12,75 \pm 0,48$ nmoles de NADH oxidado por minuto por miligramo de proteína, y k' para el complejo IV fue de $8,15 \pm 0,67$ por minuto por miligramo de proteína (n=4).

La hipoxia-reoxigenación no afectó la actividad máxima del complejo IV en ninguno de los tiempos analizados (Figura 13B). En cambio, la actividad máxima del complejo I permaneció significativamente inhibida desde el final de la hipoxia y sólo se recuperó luego de 48 h de reoxigenación (Figura 13A). Inmunoblots de fracciones mitocondriales utilizando anticuerpos anti la subunidad de 39 KDa del complejo I y la subunidad de 8,8 KDa del complejo IV no mostraron variaciones entre los tratamientos, sugiriendo que la expresión de los complejos no ha variado durante las distintas horas de reoxigenación (Figura 13C).

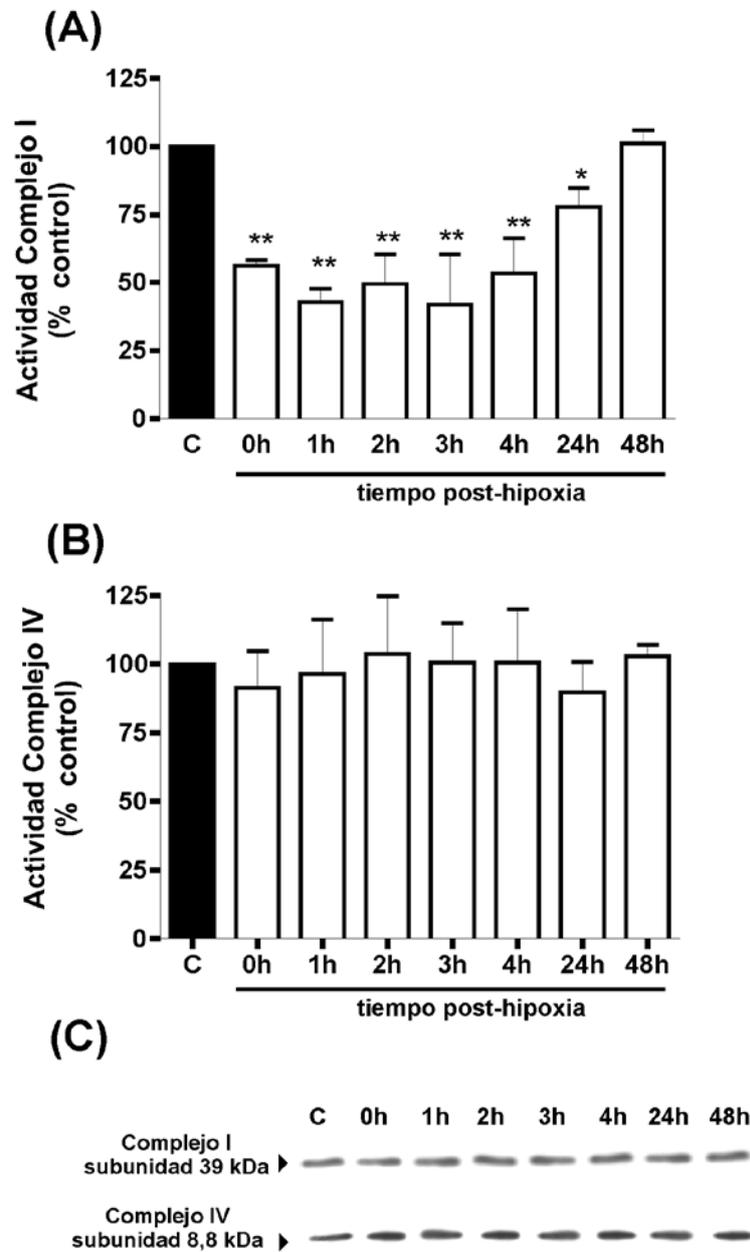


Figura 13. Inhibición del complejo I inducida por hipoxia-reoxigenación. Actividades máximas del complejo I (A) y el complejo IV (B) expresadas como porcentajes de los valores control. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de valores controles (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ANOVA y post-test de Dunnett). (C) Inmunoblot con anticuerpos contra una subunidad de cada complejo. El análisis densitométrico no mostró variaciones entre los tratamientos

7. Los daños bioquímicos y ultraestructurales de las mitocondrias, inducidos por la hipoxia, son dependientes de NO

La administración *in vivo* del inhibidor de nNOS 7-nitroindazol (7-NI) 20 min previos a la hipoxia pudo prevenir la inhibición del complejo I inducida por la hipoxia de manera dosis dependiente (Figura 14). 7-NI también pudo evitar la ruptura de las membranas mitocondriales y la aparición de dilataciones dentro de las crestas, aunque tuvo un efecto mucho menor sobre la definición de las mismas (Figura 15). Efectos similares se observaron con el inhibidor general de NOS N^ω-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME), aunque fue menos efectivo que 7-NI, a las mismas concentraciones (Figuras 14-15).

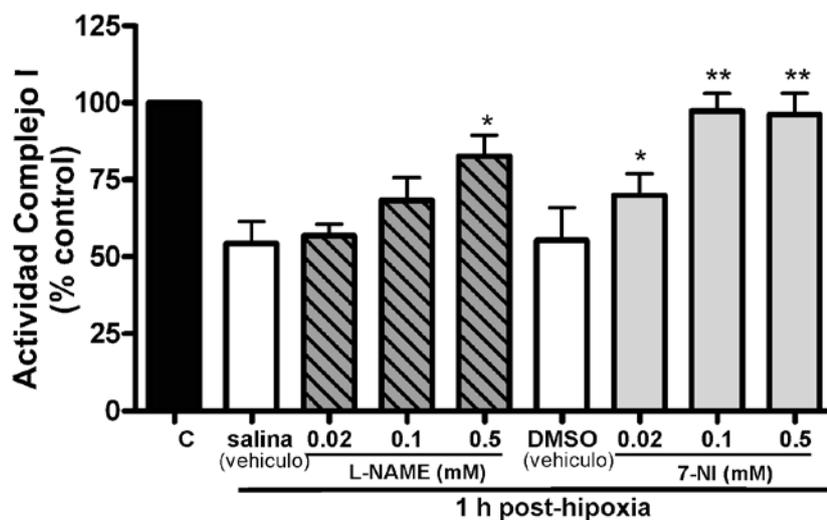


Figura 14. Efecto de la administración *in vivo* de inhibidores de NOS sobre la inhibición del complejo I inducida por hipoxia-reoxigenación. Los embriones fueron inyectados 20 min antes de la hipoxia con l-NAME, 7-NI o sus respectivos vehículos, solución salina o DMSO. Los controles fueron inyectados con vehículo. La actividad máxima del complejo I se midió 1 h post-hipoxia y fue expresada como porcentaje de los valores controles. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. **p < 0.01, *p < 0.05, vs. valor de 1 hs post-hipoxia tratado con vehículo (ANOVA y post-test de Dunnett).

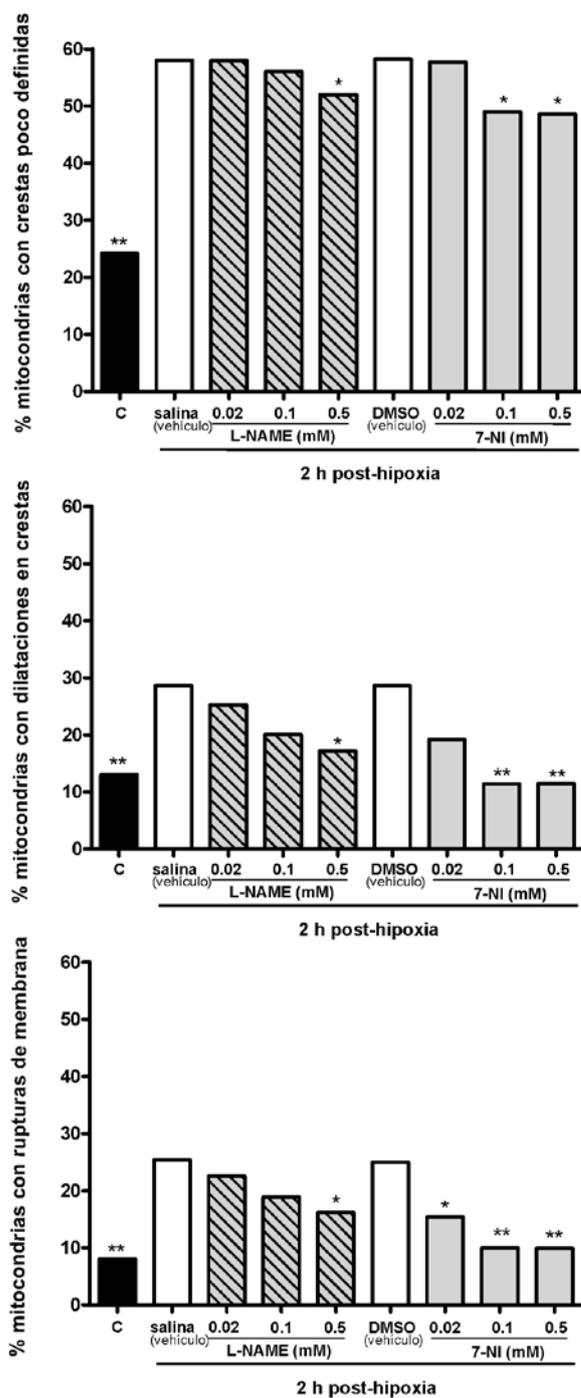


Figura 15. Efecto de la administración *in vivo* de inhibidores de NOS sobre los daños ultraestructurales inducidos por la hipoxia. Los embriones fueron inyectados 20 min antes de la hipoxia con L-NAME, 7-NI o sus respectivos vehículos, solución salina o DMSO. Los controles fueron inyectados con vehículo. Las frecuencias de daño ultraestructural fueron determinadas en al menos 100 mitocondrias para cada condición. *p < 0.05 o **p < 0.01 vs. valor 2h post-hipoxia, prueba bondad de ajuste, test χ^2 .

8. La administración de 7-NI, inhibidor específico de nNOS, posee efectos neuroprotectores

La administración *in vivo* del inhibidor de nNOS 7-NI, 20 min previos a la hipoxia, pudo revertir parcial y significativamente la liberación de citocromo c y la fragmentación del ADN, dos marcadores de muerte celular (Figura 16). Estos marcadores fueron medidos en aquellos tiempos post-hipoxia en el que alcanzaban sus valores máximos: 4 h para citocromo c y 6 h para las células TUNEL positivas.

Este resultado sugiere que los daños bioquímicos y ultraestructurales dependientes de NO, observados en las mitocondrias, se encuentran río arriba en la cascada de eventos que conducen a muerte celular inducida por hipoxia en nuestro modelo experimental.

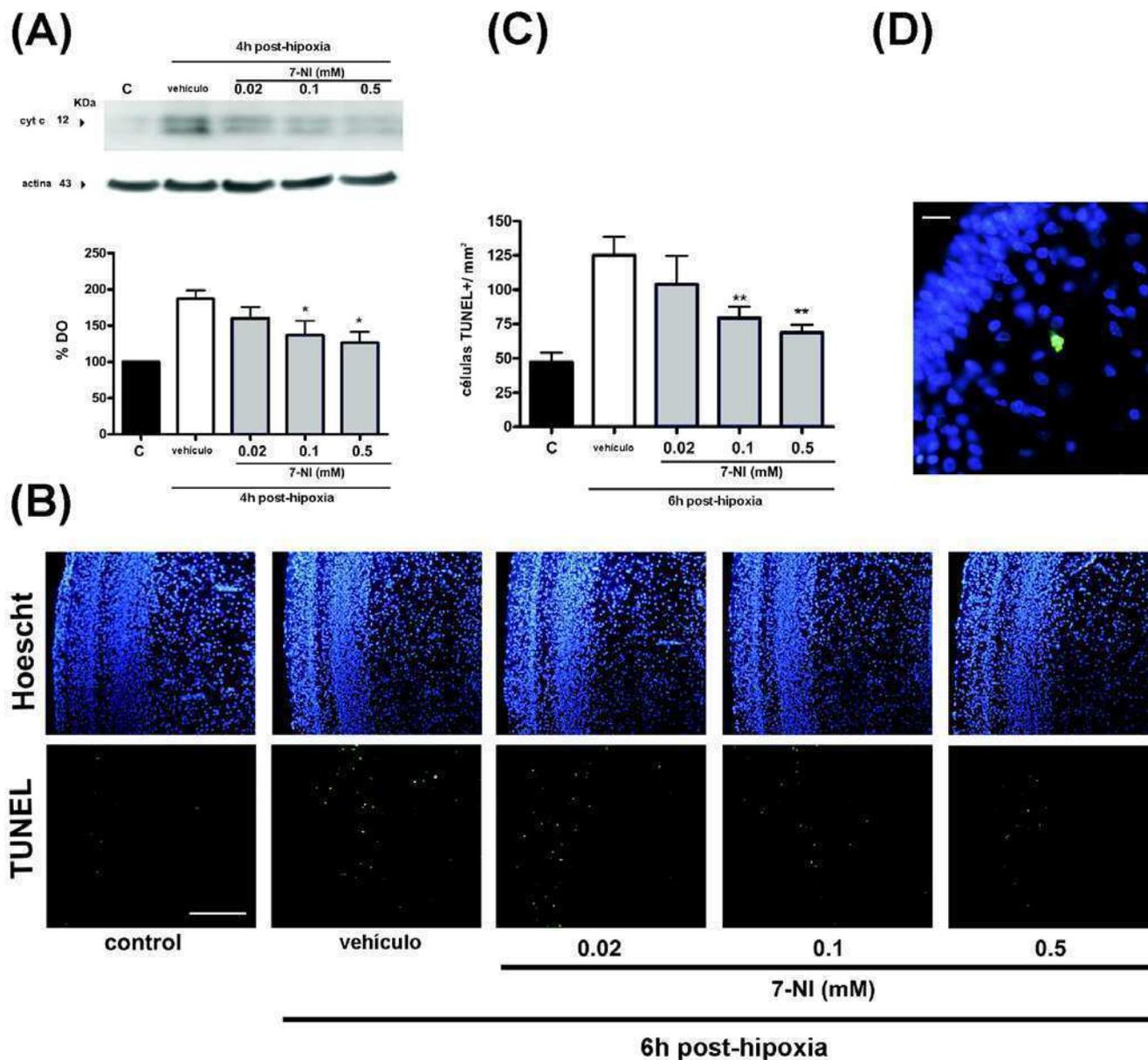


Figura 16. Efecto de la administración *in vivo* de inhibidores de NOS sobre la muerte celular inducida por la hipoxia. Los embriones fueron inyectados 20 min antes de la hipoxia con L-NAME, 7-NI o sus respectivos vehículos, solución salina o DMSO. Los controles fueron inyectados con vehículo. (A) Inmunoblot representativo de fracciones citosólicas reveladas con anticuerpo anti-citocromo c. Se incluye el análisis densitométrico. Las membranas fueron strippeadas y rehibridadas con anti-actina para confirmar igual carga de proteínas. (B) Microfotografías mostrando secciones histológicas del lóbulo óptico teñidas con el contraste nuclear Hoechst y núcleos TUNEL positivos para cada tratamiento. Barra: 300 μ m. (C) Cuantificación de núcleos TUNEL +. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ o ** $p < 0.01$, vs. valor post-hipoxia tratado con vehículo (ANOVA y post-test de Dunnett). (D) Detalle mostrando la co-localización de la señal de TUNEL (verde) con los núcleos teñidos con Hoechst (azul). Barra: 15 μ m.

9. El preconditionamiento hipóxico posee efectos neuroprotectores

Los modelos de preconditionamiento constituyen herramientas altamente adecuadas para elucidar las vías moleculares endógenas de neuroprotección. Con este objetivo, determinamos en primer lugar si un paradigma de preconditionamiento hipóxico que consta de 40 min de hipoxia aguda 24 h antes de la injuria hipóxica, posee efectos neuroprotectores en nuestro modelo experimental. Se evaluó el efecto del preconditionamiento hipóxico en dos marcadores de muerte celular apoptótica: la liberación de citocromo c y la fragmentación de ADN. Observamos que el preconditionamiento hipóxico pudo revertir parcial, pero significativamente ambos marcadores de daño (Figura 17).

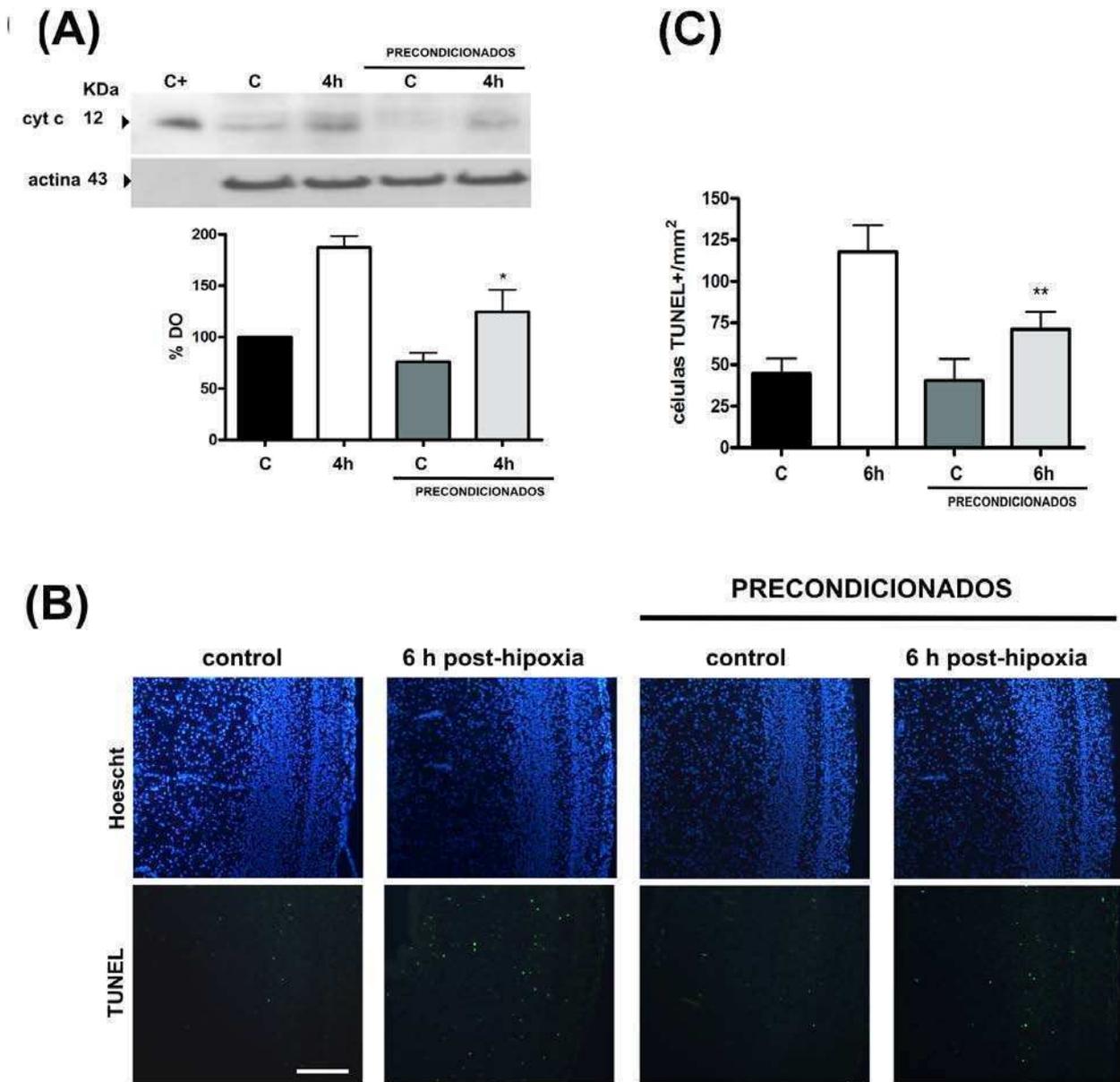


Figura 17. Efecto del preconditionamiento hipóxico sobre la muerte celular inducida por la hipoxia. Algunos embriones fueron preconditionados 24h antes de ser sometidos a una injuria hipoxia. (A) Inmunoblot representativo de fracciones citosólicas reveladas con anticuerpo anti-citocromo c. Se incluye el análisis densitométrico. Las membranas fueron strippeadas y rehibridadas con anti-actina para confirmar igual carga de proteínas. C+: citocromo c equino purificado fue utilizado como control positivo. (B) Microfotografías mostrando secciones histológicas del lóbulo óptico teñidas con el contraste nuclear Hoechst y núcleos TUNEL positivos para cada tratamiento. Barra: 300 μ m. (C) Se incluye el análisis cuantitativo. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ o ** $p < 0.01$, vs. valor post-hipoxia (ANOVA y post-test de Dunnett).

10. Optimización de un método de fraccionamiento subcelular para obtener fracciones nucleares puras a partir de tejido nervioso embrionario

Consideraciones teóricas orientaron la elucidación de las vías moleculares responsables del efecto neuroprotector del preconditionamiento hipóxico al análisis de factores de transcripción, entre ellos HIF-1 (*hipoxia-inducible factor-1*).

La técnica de western blot es uno de los métodos frecuentemente utilizados para la evaluación de la cinética e intensidad de activación de diversos factores de transcripción, y usualmente involucra la obtención de una fracción nuclear soluble como primer paso. Varios problemas surgen cuando se utiliza tejido nervioso embrionario como fuente de la fracción nuclear soluble. Los embriones son muy pequeños para ser perfundidos y, a pesar de exhaustivos lavados, la fracción nuclear cruda contiene grandes cantidades de glóbulos rojos, fragmentos de capilares y células enteras. También se encuentran en las fracciones nucleares contaminantes de baja densidad como fragmentos de retículo endoplasmático (RE) y mitocondrias. En conjunto, los contaminantes agregan una variabilidad considerable a los resultados y contribuyen a enmascarar señales sutiles, especialmente cuando la forma activa del factor de transcripción es inmunológicamente indistinguible de su forma inactiva y se encuentra en otro compartimento subcelular. Para resolver esos problemas se realizó una optimización de los métodos estándar cuyas principales modificaciones son: (1) la inclusión de una centrifugación de baja velocidad para separar contaminantes de alta densidad como glóbulos rojos, células intactas y fragmentos de capilares, (2) un gradiente discontinuo de sacarosa para remover membranas del retículo endoplasmático (RE) y mitocondrias perinucleares y (3) un proceso de extracción de proteínas basado en stress mecánico, el uso de alta concentraciones de sal y una combinación de dos detergentes, que incrementa significativamente el rendimiento. El procedimiento completo, delineado en la Figura 18, incluye el aislamiento de los núcleos y la posterior extracción de proteínas nucleares.

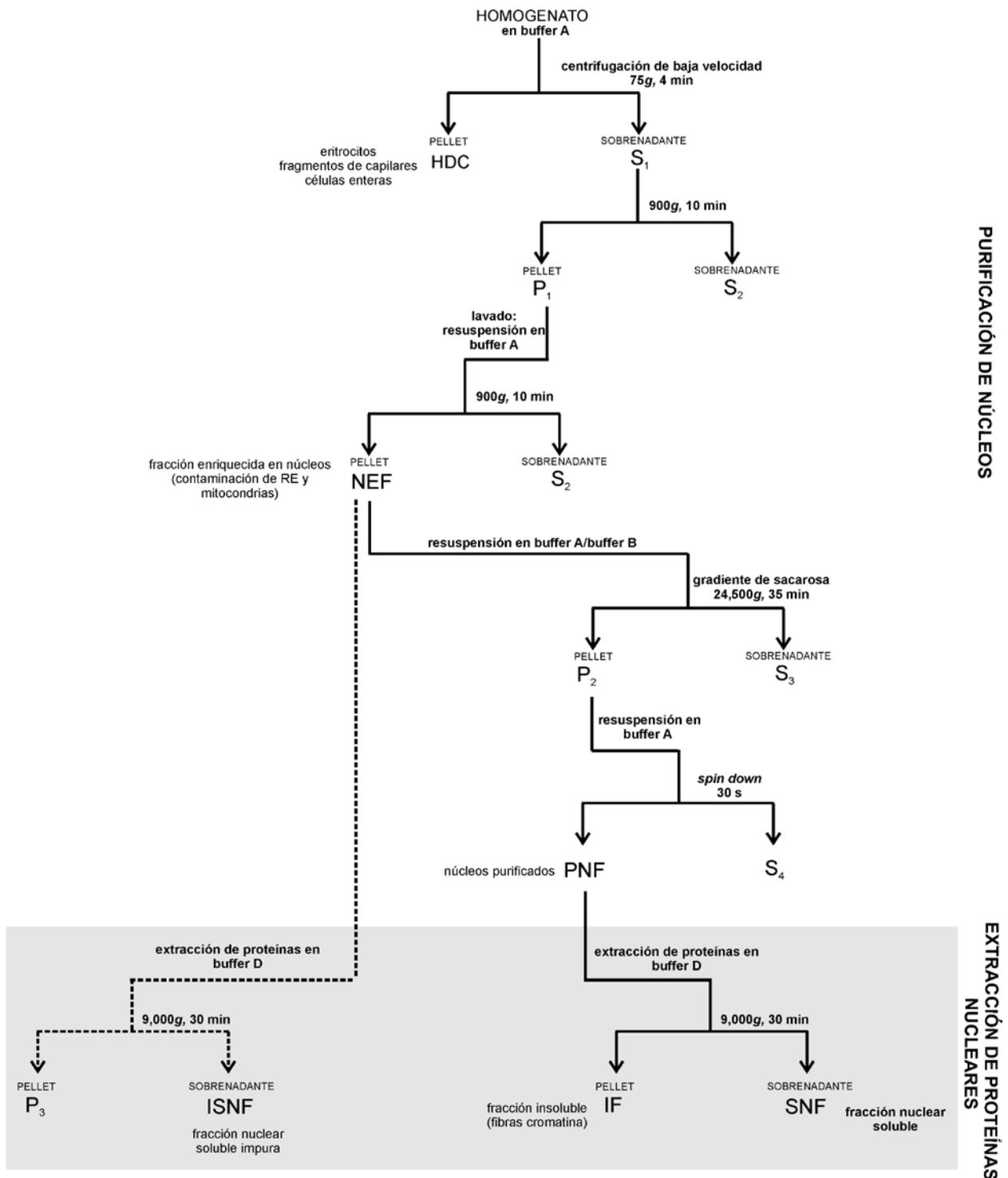


Figura 18. Diagrama esquemático ilustrando el método para obtener una fracción nuclear soluble a partir de tejido nervioso embrionario. Línea punteada: versión modificada del método para demostrar el efecto del gradiente de sacarosa en la pureza del extracto proteico (ver Figura 20). P, pellet; S, sobrenadante; HDC, contaminantes de alta densidad (*high density contaminants*); NEF, fracción enriquecida en núcleos (*nuclear enriched fraction*); PNF, fracción purificada de núcleos (*purified nuclear fraction*); IF, fracción insoluble (*insoluble fraction*); ISNF, fracción nuclear soluble impura (*impure soluble nuclear fraction*).

11. La centrifugación de baja velocidad separa los contaminantes de alta densidad

El análisis morfológico del pellet obtenido a partir de la centrifugación a baja velocidad (HDC, *high density contaminants*) evidenció un gran número de eritrocitos (nucleados en especies de aves), fragmentos de capilares y células intactas (Figura A-B). En contraposición, esos contaminantes de alta densidad no fueron hallados luego de la centrifugación de baja velocidad (Figura 19 C-D).

12. El agregado de SDS mejora el rendimiento durante la extracción proteica

El efecto del agregado de una baja concentración de SDS durante la extracción proteica fue puesto a prueba comparando el rendimiento proteico obtenido con o sin SDS en el buffer de extracción. Observamos un incremento significativo en el rendimiento al utilizar una baja concentración de SDS (Tabla 3).

	Rendimiento proteico (mg/g tejido fresco)	% cambio
sin SDS	1.18 ± 0.12	---
con SDS	1.49 ± 0.17**	26.3

Tabla 3. Efecto del SDS sobre el rendimiento de la extracción. La extracción de proteínas nucleares se efectuó con o sin SDS en el buffer de extracción (buffer D). Los valores son promedios ± SEM de cuatro experimentos independientes (**p < 0.01, test t de Student).

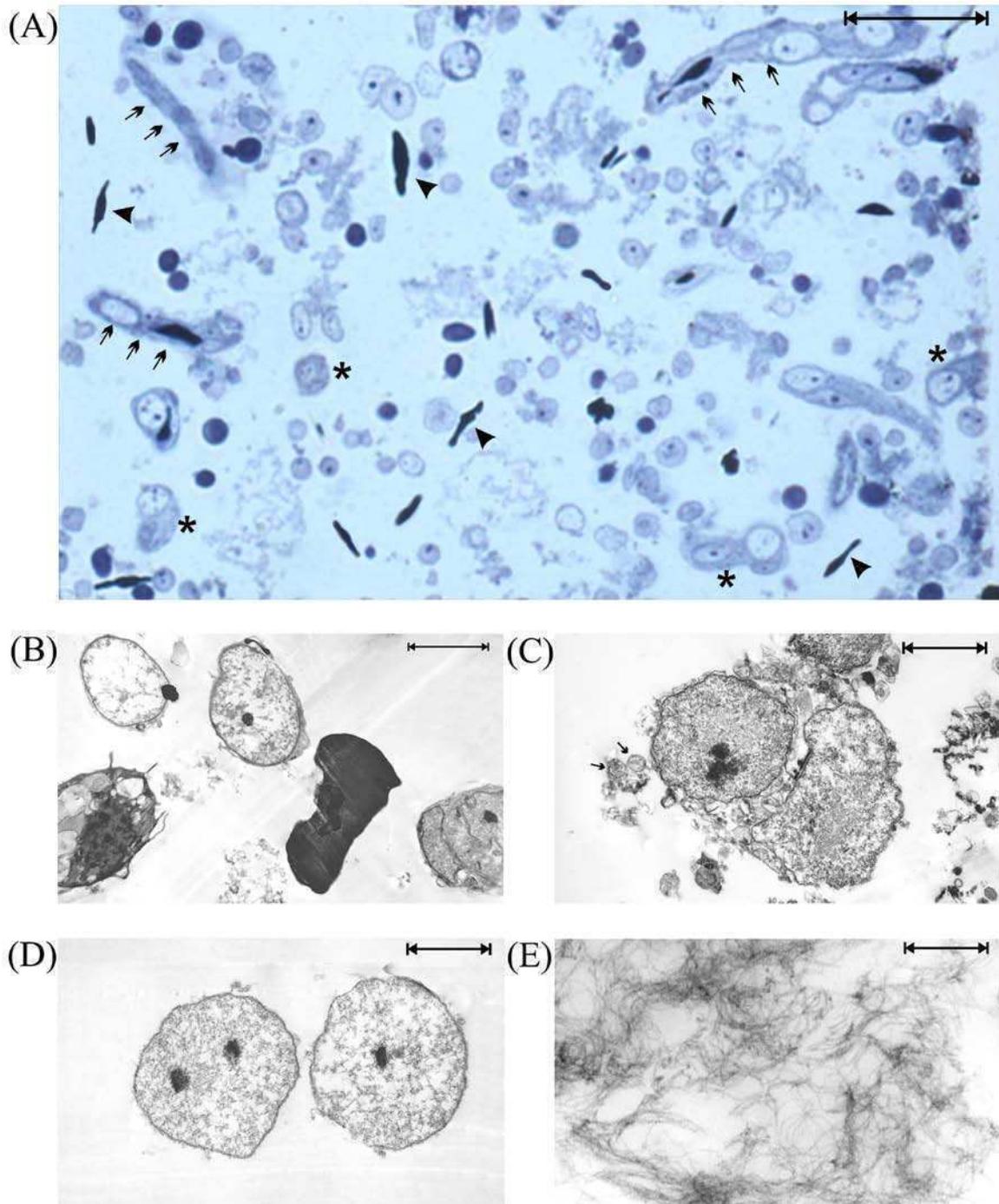


Figura 19. **Análisis morfológico de los pellets.** (A) Microfotografía óptica de campo caro de una muestra representativa de HDC conteniendo cantidades significativas de contaminantes de alta densidad: eritrocitos con apariencia de cuerpos oscuros (*cabezas de flechas*), células intactas (*asteriscos*) y fragmentos de capilares (*flechas*) ocasionalmente conteniendo un eritrocito. Sólo algunos de esos componentes se indican en la microfotografía. Barra: 15 µm. (B-E) Microfotografías electrónicas de los pellets. (B) HDC en la que se observan en detalle eritrocitos y células intactas. Barra: 500 nm. (C) Fracción enriquecida en núcleos, NEF, en la que se observan núcleos rodeados con contaminaciones de membranas perinucleares y algunas mitocondrias (*flechas*). Barra: 200 nm. (D) Núcleos puros en PNF. Barra: 250nm. (E) IF en la que se observan fibras de cromatina insolubles luego de la extensiva extracción proteica

13. La sedimentación a través del gradiente de sacarosa remueve membranas mitocondriales y del retículo endoplasmático

Microfotografías electrónicas de las fracciones nucleares enriquecidas en núcleos (NEF) permitieron detectar la presencia de membranas perinucleares (fragmentos del RE) y mitocondrias (Figura 19C) que no fueron observadas luego del paso por el gradiente de sacarosa en la fracción purificada de núcleos (PNF, Figura 19D).

Para confirmar la efectividad de la sedimentación a través del gradiente de sacarosa, se compararon dos extractos proteicos solubles. Uno de ellos fue preparado a partir de NEF y el otro a partir de PNF, obteniéndose una fracción nuclear soluble impura (ISNF) y una fracción nuclear soluble (SNF), respectivamente (ver Figura 18). Esos extractos reflejan el contenido proteico de los pellets antes y después del paso de sedimentación. La pureza de las fracciones solubles fue determinada por inmunoblot utilizando marcadores subcelulares específicos. Ambas fracciones fueron positivas para el marcador nuclear histona H3, pero ISNF presentó además niveles notablemente mayores del marcador de RE calnexina y del marcador mitocondrial citocromo c (Figura 20).

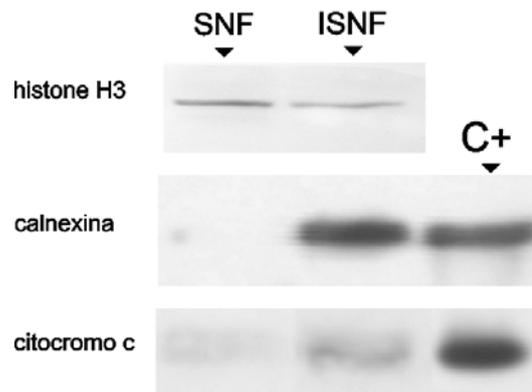


Figura 20. Análisis inmunológico de pureza de SFN. Inmunoblot representativo de las fracciones SFN e ISFN revelado con anticuerpos dirigidos a marcadores subcelulares específicos: histona H3 (nuclear), calnexina (RE) y citocromo c (mitocondrial). Como controles positivos (C+) para calnexina y citocromo c, se utilizaron fracciones microsomales y mitocondriales puras, respectivamente.

14. El pellet de núcleos puros (PNF) y la fracción nuclear soluble (SFN) derivada de ella son adecuados para ensayar la activación de factores de transcripción

Para demostrar que la PNF y la SFN obtenidas con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos son adecuadas para ensayar la activación de factores de transcripción en tejido nervioso embrionario, utilizamos el sistema de estabilización de HIF-1 por cloruro de cobalto (CoCl_2), extensamente caracterizado. Esta activación fue determinada a través de dos abordajes experimentales. En primer lugar, se realizó un análisis de inmunomarcación con oro de PNG con anticuerpos anti-HIF-1 α y su cuantificación mediante microscopía electrónica. La cuantificación de las partículas de oro reveló un incremento significativo de los niveles de HIF-1 α luego de de la administración *in vivo* de CoCl_2 en comparación con los embriones tratados con vehículo (Figura 21).

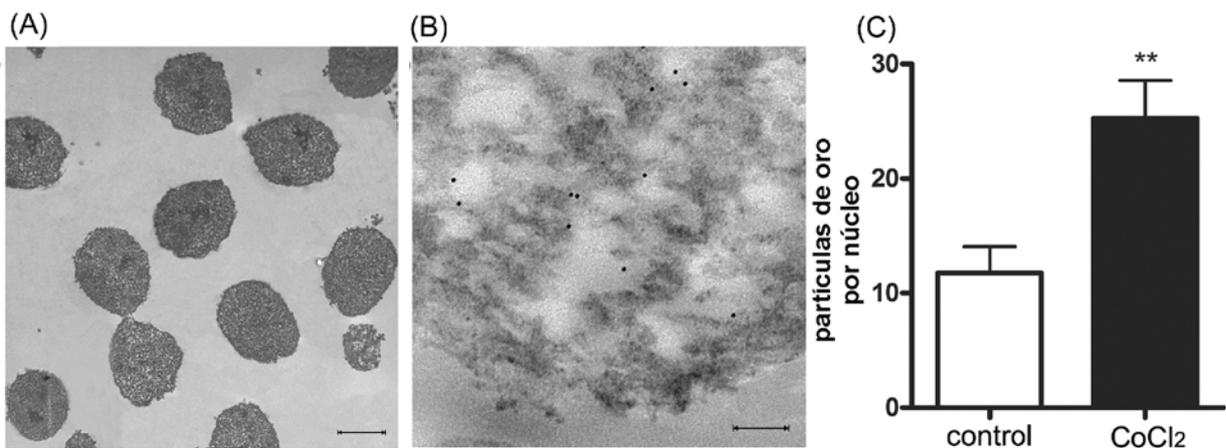


Figura 21. Cuantificación de factores de transcripción activos mediante inmunomarcación con oro. (A) Microfotografía electrónica de una muestra representativa de PNF sobre la que se realiza la inmunomarcación. Barra: 300 nm. (B) Detalle de un núcleo con inmunomarca positiva (10 nm) para HIF-1 α . Barra: 100 nm. (C) Análisis cuantitativo mostrando diferencias significativas entre los embriones tratados con CoCl_2 y los controles tratados con vehículo. ** $p < 0.01$, test t de Student. Se analizaron 50 núcleos en cada condición

En segundo lugar, HIF-1 α fue detectado mediante la técnica de western blot utilizando SFN obtenida a partir de lóbulos ópticos. De acuerdo con lo esperado y de manera consistente con el resultado de la inmunomarcación con oro, observamos niveles incrementados de HIF-1 α cuando se administró CoCl₂ 60 minutos antes de la decapitación (Figura 22)

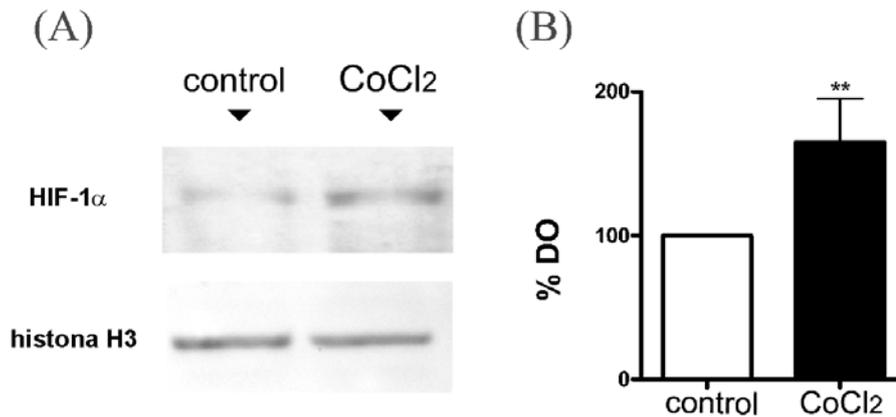


Figura 22. Cuantificación de factores de transcripción activos mediante western blot. (A) Inmunoblot representativo de fracciones nucleares solubles (SNF) provenientes de embriones control y tratados con CoCl₂, revelados con anti-HIF-1 α . Anti-histona H3 fue utilizado para confirmar igual carga de proteínas. (B) Análisis densitométrico mostrando diferencias significativas entre los tratamientos. **p < 0.01, test *t* de Student. Los valores de densidad óptica son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

15. Cinética de activación de HIF-1 α

Dado el rol central que cumple HIF-1 α en la homeostasis del oxígeno, decidimos evaluar el rol de este factor de transcripción en la neuroprotección mediada por el preconditionamiento hipóxico. En primer lugar, determinamos la cinética temporal de acumulación de HIF-1 α utilizando western blot de fracciones nucleares solubles. De acuerdo con lo esperado, observamos una rápida acumulación de HIF-1 α al finalizar la hipoxia que deja de observarse al cabo de los primeros 30 minutos de reoxigenación (Figura 23).

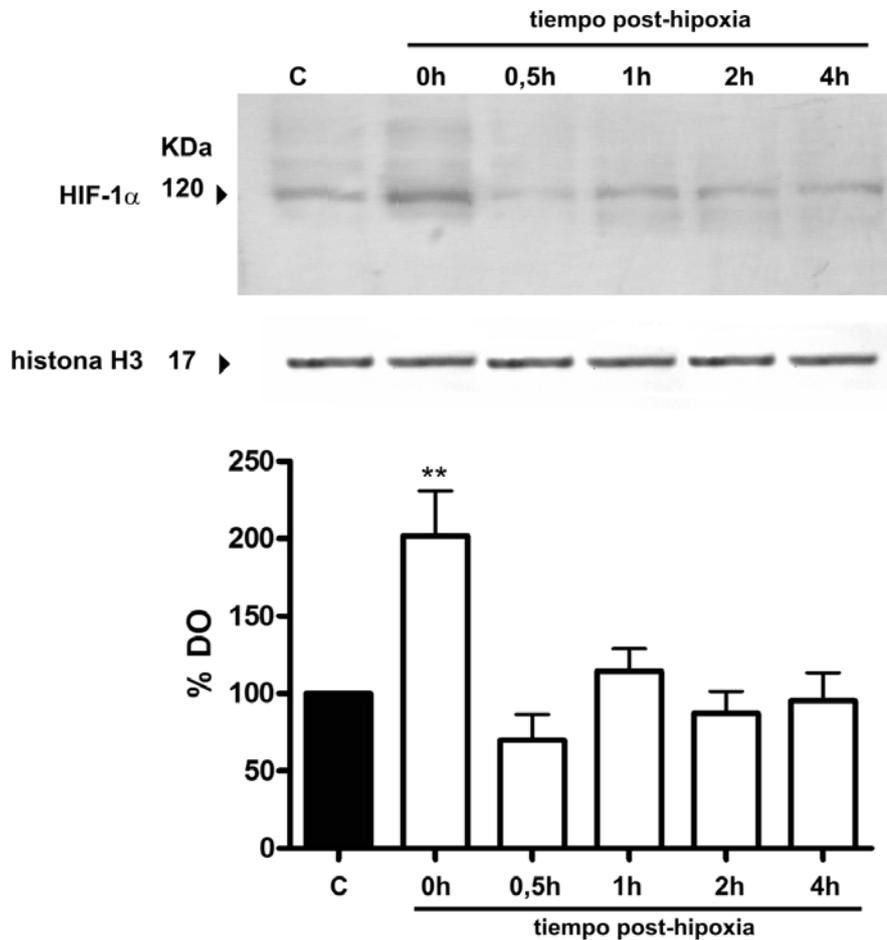


Figura 23. Cinética de acumulación de HIF-1 α . Inmunoblot representativo de fracciones nucleares solubles reveladas con un anticuerpo anti-HIF-1 α y análisis densitométrico de la cinética temporal 0-4 h post-hipoxia. Se utilizó un anticuerpo anti-histona H3 para confirmar igual carga de proteínas. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de valores controles (**p < 0.01, ANOVA y post-test de Dunnett).

La inducción de HIF-1 α a las 0h post-hipoxia fue confirmada mediante la inmunomarcación con oro de fracciones purificadas de núcleos (Figura 24).

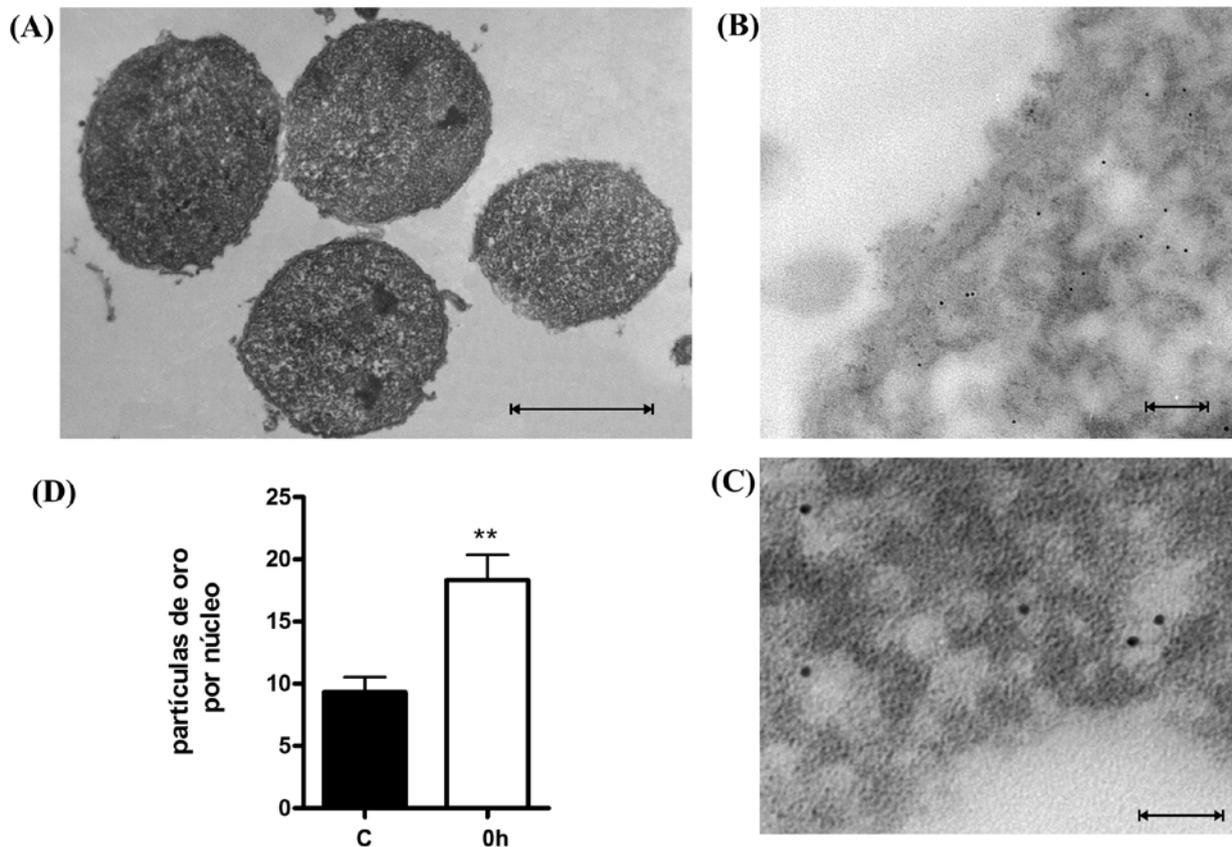


Figura 24. Acumulación de de HIF-1 α luego de la hipoxia. Inmunomarcación con oro utilizando fracciones de núcleos purificados (PNF). (A) Microfotografía electrónica de una muestra representativa de PNF sobre la que se realiza la inmunomarcación. Barra: 300 nm. (B y C) Detalles de núcleos con inmunomarca positiva para HIF-1 α (partículas de oro de 10 nm). Barras: (B) 150 nm y (C) 50 nm. (D) Análisis cuantitativo mostrando diferencias significativas entre los embriones controles y los hipóxicos (0h post hipoxia). Se analizaron 50 núcleos en cada condición. Los valores son promedios \pm SEM. **p < 0.01, test t de Student.

Además, determinamos que el acondicionamiento hipóxico (40 min, DE 11) es capaz de provocar *per se* la acumulación de HIF-1 α , aunque con menor intensidad que la injuria hipoxia de 60 min en el DE 12 (Figura 25).

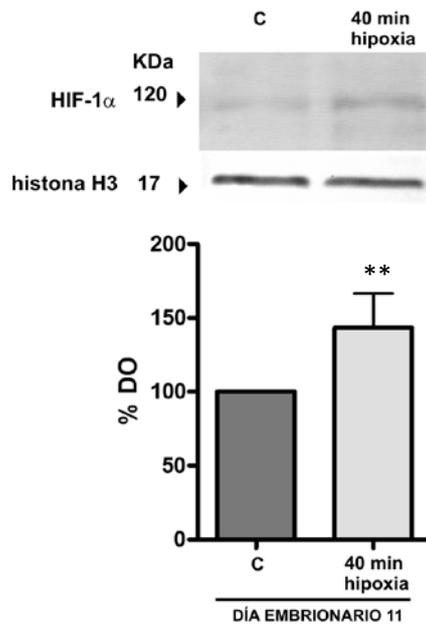


Figura 25. Efecto del preconditionamiento *per se* sobre la acumulación de HIF-1 α . Immunoblot representativo y análisis densitométrico de fracciones nucleares solubles reveladas con un anticuerpo anti-HIF-1 α . Para reproducir las condiciones del preconditionamiento, las fracciones fueron obtenidas en día embrionario 11. Algunos de ellos fueron sometidos a una hipoxia de 40 min y procesados inmediatamente después. Se utilizó un anticuerpo anti-histona H3 para confirmar igual carga de proteínas. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de valores controles (** $p < 0.01$, test t de Student).

16. El preconditionamiento intensifica la acumulación de HIF-1 α provocada por la hipoxia

Luego analizamos si el preconditionamiento tenía algún efecto observable en la acumulación de HIF-1 luego de la injuria hipóxica que se produciría 24 h después. Para ello, evaluamos la intensidad de la acumulación de este factor de transcripción luego de una hipoxia, en embriones que habían sido preconditionados el día anterior, en comparación con embriones no preconditionados. Observamos que el preconditionamiento intensifica la acumulación de HIF-1 α luego de la injuria hipóxica en ~30% (Figura 26).

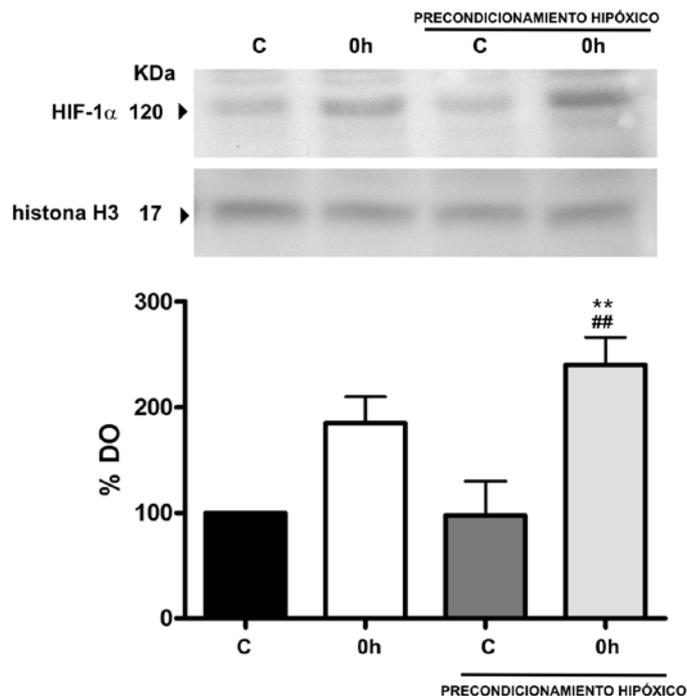


Figura 26. Efecto del preconditionamiento sobre la acumulación de HIF-1 α mediada por hipoxia. Inmunoblot representativo y análisis densitométrico de fracciones nucleares solubles reveladas con un anticuerpo anti-HIF-1 α . Algunos embriones fueron preconditionados en el DE 11. Se utilizó un anticuerpo anti-histona H3 para confirmar igual carga de proteínas. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. **Significativamente distinto de controles preconditionados y ## significativamente distinto de de 0h post-hipoxia ($p < 0.01$, ANOVA y post-test de Dunnett).

Para determinar si existe una relación causal entre la acumulación de HIF-1 α al final del preconditionamiento y la intensificación de la acumulación al cabo de la hipoxia, se realizaron los siguientes tratamientos: i- se reemplazó el preconditionamiento hipóxico por la administración de CoCl_2 , que induce específicamente HIF-1 mediante la inactivación de las HIF-prolil hidroxilasas (preconditionamiento con CoCl_2) ; ii- se realizó el preconditionamiento hipóxico con la administración previa (20 min antes) de ascorbato o Fe^{2+} , que disminuyen la acumulación de HIF-1 mediante la estimulación de la actividad de las HIF-prolil hidroxilasas.

Observamos que el preconditionamiento con CoCl_2 reproduce de manera dosis dependiente la intensificación de la acumulación de HIF-1 provocada por el preconditionamiento hipóxico (Figura 27).

Determinamos además, que los moduladores negativos de HIF-1 administrados 20 min antes del preconditionamiento hipóxico, revierten de manera dosis dependiente esta intensificación (Figura 28). En conjunto estos resultados sugieren que la acumulación de HIF-1 durante el preconditionamiento es necesaria para que se manifieste el efecto de intensificación de la acumulación de HIF-1 luego de la injuria hipóxica en el día posterior.

La administración conjunta de Fe^{2+} y ascorbato no fue testeada ya que resultó tóxica para los embriones aún en las dosis más bajas. Esto se debe probablemente a que el sistema Fe^{2+} /ascorbato reacciona generando una intensa producción de radicales libres de hidroxilo (Slivka, 1985).

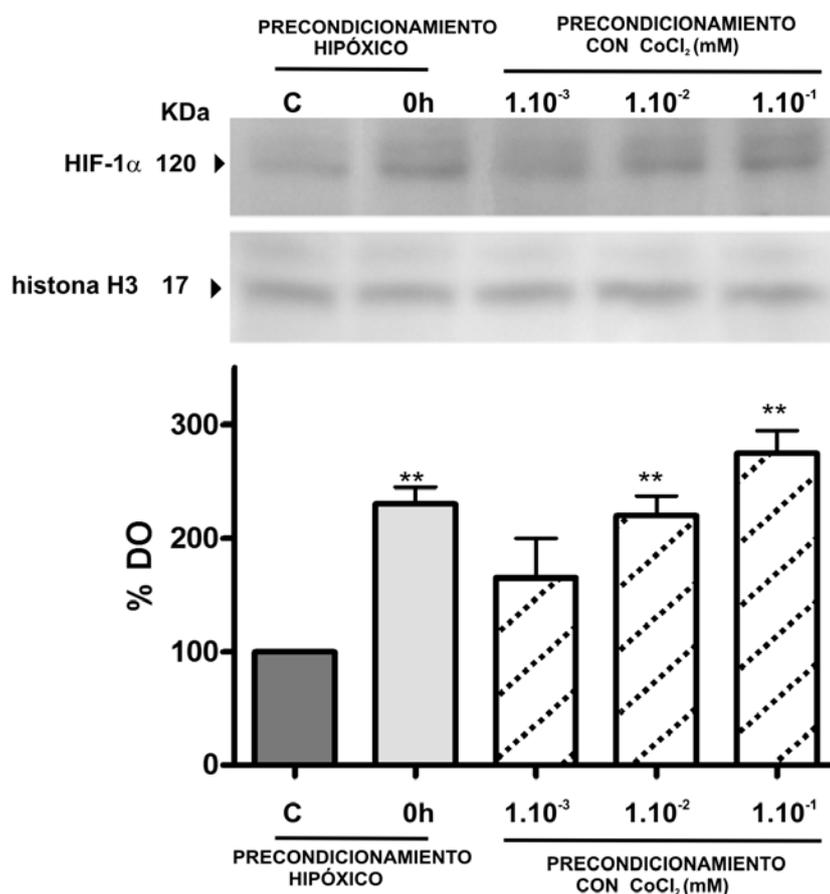


Figura 27. El preconditionamiento con CoCl_2 intensifica la acumulación de HIF-1 luego de la injuria hipóxica. Immunoblot representativo y análisis densitométrico de fracciones nucleares solubles reveladas con un anticuerpo anti-HIF-1 α . En el DE 11, algunos embriones recibieron un preconditionamiento hipóxico y otros fueron preconditionados con la administración de CoCl_2 . Se utilizó un anticuerpo anti-histona H3 para confirmar igual carga de proteínas. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. **Significativamente distinto de controles preconditionados ($p < 0.01$, ANOVA y post-test de Dunnett).

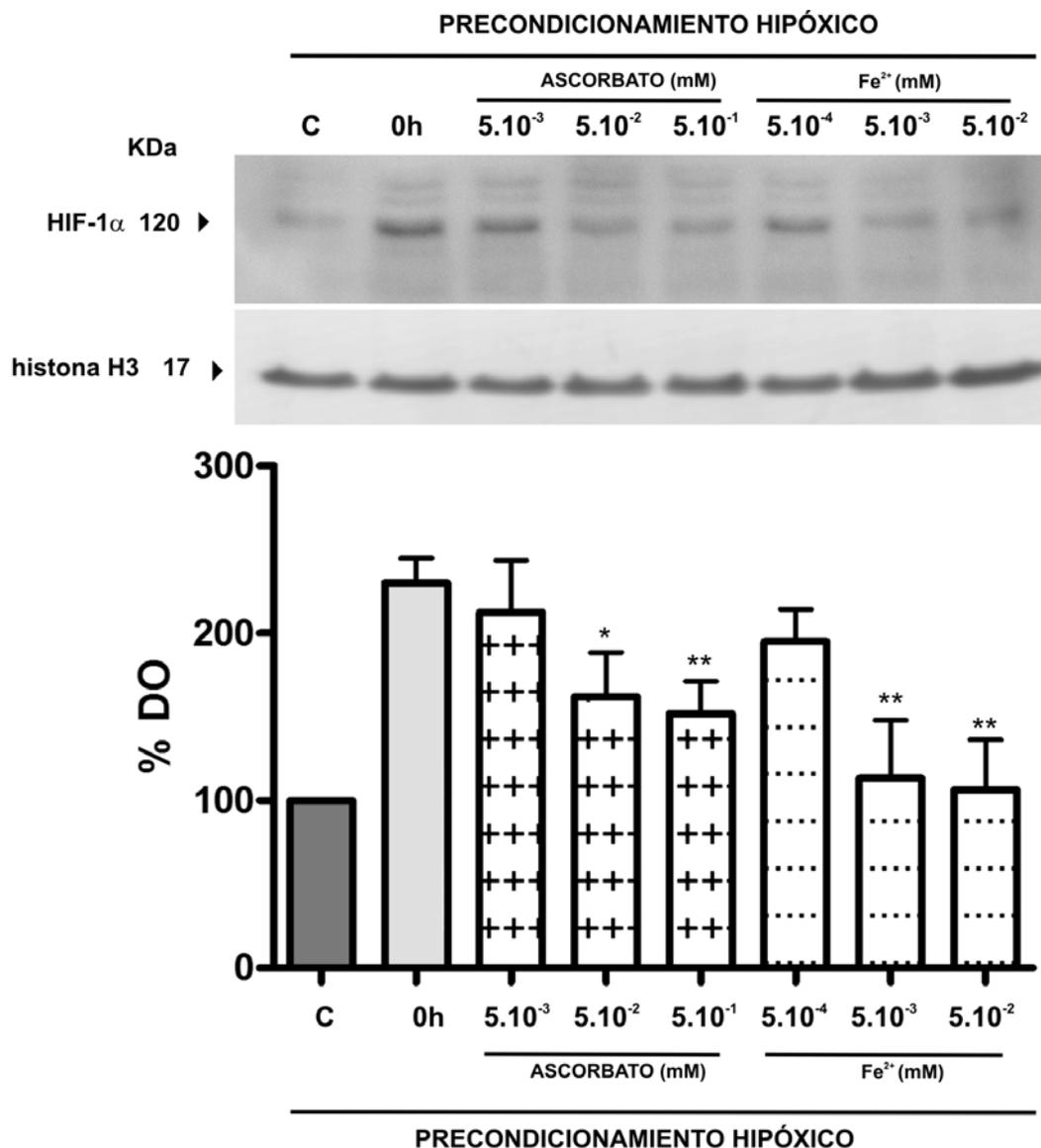


Figura 28. Efecto de Fe²⁺ y ascorbato sobre la acumulación de HIF-1 durante el preconditionamiento. Immunoblot representativo y análisis densitométrico de fracciones nucleares solubles reveladas con un anticuerpo anti-HIF-1α. Se utilizó un anticuerpo anti-histona H3 para confirmar igual carga de proteínas. En el DE 11, los embriones fueron tratados con Fe²⁺, ascorbato o vehículo (solución fisiológica) y preconditionados 20 min después. En el DE 12 fueron sometidos a una hipoxia aguda (excepto C). Los valores son promedios ± SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de 0h post-hipoxia (**p < 0.01, *p < 0.05, ANOVA y post-test de Dunnett).

17. La acumulación de HIF-1 durante el preconditionamiento es necesaria para que se produzca neuroprotección

Para determinar si existe alguna relación entre los efectos neuroprotectores del preconditionamiento y la acumulación de HIF-1 α durante el mismo, evaluamos marcadores de muerte celular apoptótica bajo las siguientes condiciones: i- preconditionamiento con CoCl₂, que induce HIF-1 independientemente del preconditionamiento hipóxico; ii- administración de Fe²⁺ o ascorbato 20 min antes del preconditionamiento hipóxico, que atenúa la acumulación de HIF-1.

Observamos que el preconditionamiento con CoCl₂ reproduce los efectos neuroprotectores del preconditionamiento hipóxico, previniendo la liberación de citocromo c y la fragmentación del ADN (Figuras 29-30). Determinamos además, que el efecto neuroprotector se ve atenuado fuertemente cuando se administraron Fe²⁺ o ascorbato 20 min antes del preconditionamiento hipóxico (Figuras 29-30). Adicionalmente, se realizaron controles que demostraron que la administración de CoCl₂, Fe²⁺ o ascorbato en el DE 11 no aumentan *per se* los marcadores de muerte celular en el DE 12 (Figura 29B).

En conjunto, estos resultados sugieren que la acumulación de HIF-1 durante el preconditionamiento hipóxico es necesaria para que se manifiesten los efectos neuroprotectores del mismo.

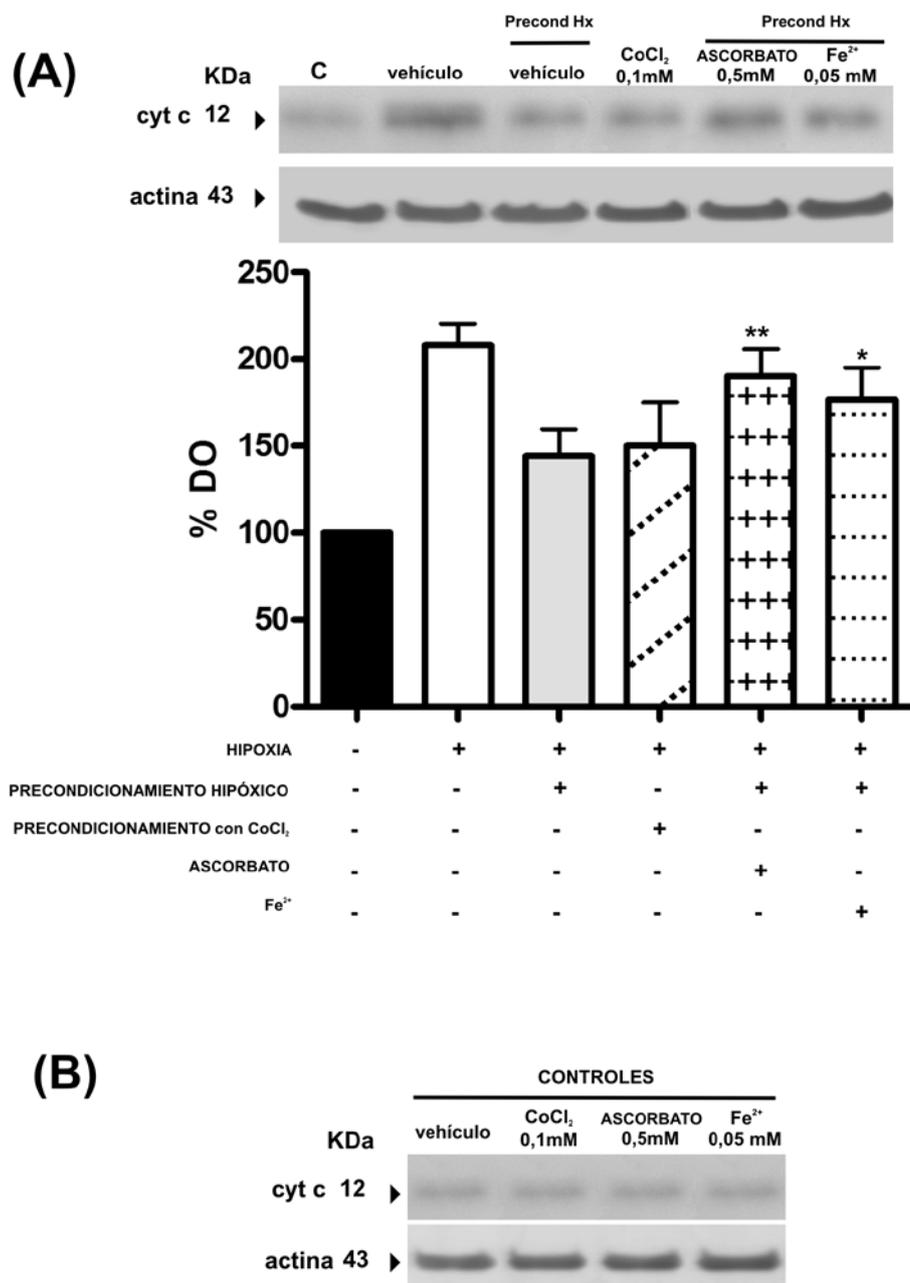


Figura 29. Efecto de moduladores positivos y negativos de HIF-1 sobre la liberación de citocromo c. En el DE 11, algunos embriones fueron tratados con Fe²⁺ (0,05 mM), ascorbato (0,5 mM) o vehículo (solución fisiológica) y precondicionados 20 min después. Otros fueron precondicionados mediante la administración de CoCl₂ 0,1 mM. En el DE 12 todos fueron sometidos a una hipoxia aguda (excepto C). Las determinaciones corresponden a las 4 h post-hipoxia. (A) Inmunoblot representativo de fracciones citosólicas reveladas con anticuerpo anti-citocromo c. Se incluye el análisis densitométrico. Las membranas fueron strippeadas y rehibridadas con anti-actina para confirmar igual carga de proteínas. Los valores son promedios ± SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de embriones precondicionados tratados con vehículo (**p < 0.01, *p < 0.05, ANOVA y post-test de Dunnett). (B) Inmunoblot representativo de fracciones correspondientes a embriones tratados con Fe²⁺ (0,05 mM), ascorbato (0,5 mM) o vehículo (solución fisiológica) y precondicionados 20 min después, o embriones precondicionados con CoCl₂ 0,1 mM, pero no sometidos a una hipoxia en el DE 12. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos (p>0.05, ANOVA)

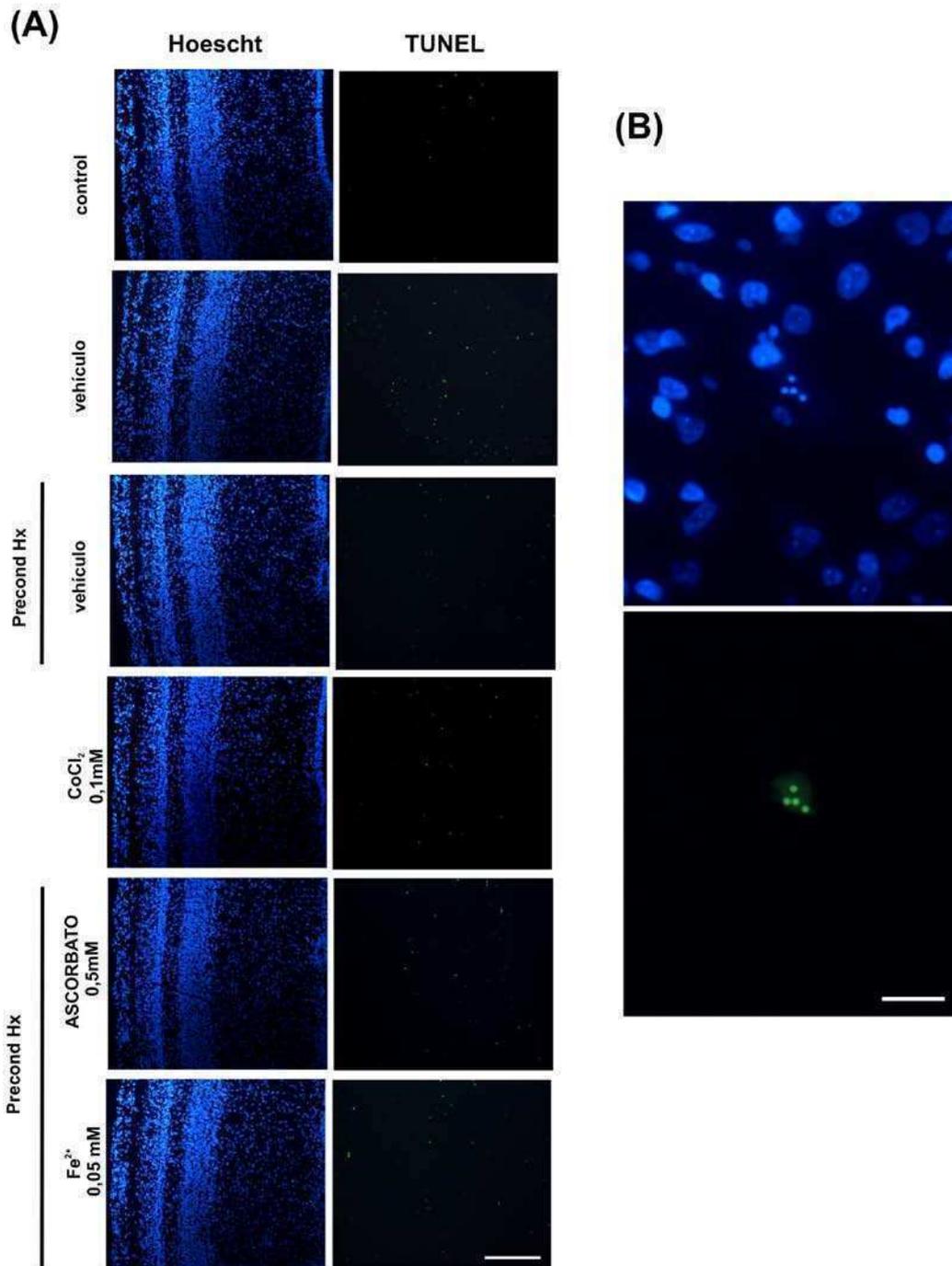


Figura 30. Efecto de moduladores positivos y negativos de HIF-1 sobre la fragmentación del ADN. En el DE 11, algunos embriones fueron tratados con Fe^{2+} (0,05 mM), ascorbato (0,5 mM) o vehículo (solución fisiológica) y precondicionados 20 min después. Otros fueron precondicionados mediante la administración de CoCl_2 0,1 mM. En el DE 12 todos fueron sometidos a una hipoxia aguda (excepto C). Las determinaciones corresponden a las 6 h post-hipoxia. (A) Microfotografías mostrando secciones histológicas del lóbulo óptico teñidas con el contraste nuclear Hoechst y núcleos TUNEL positivos para cada tratamiento. Barra: 300 μm . (B) Detalle en el que se observa, mediante la tinción de Hoechst, la morfología de los cuerpos nucleares picnóticos, característicos de una célula en los últimos estadios de la apoptosis. La tinción de TUNEL sobre la misma sección revela la fragmentación del ADN dentro de los cuerpos picnóticos. Barra: 15 μm .

(C)

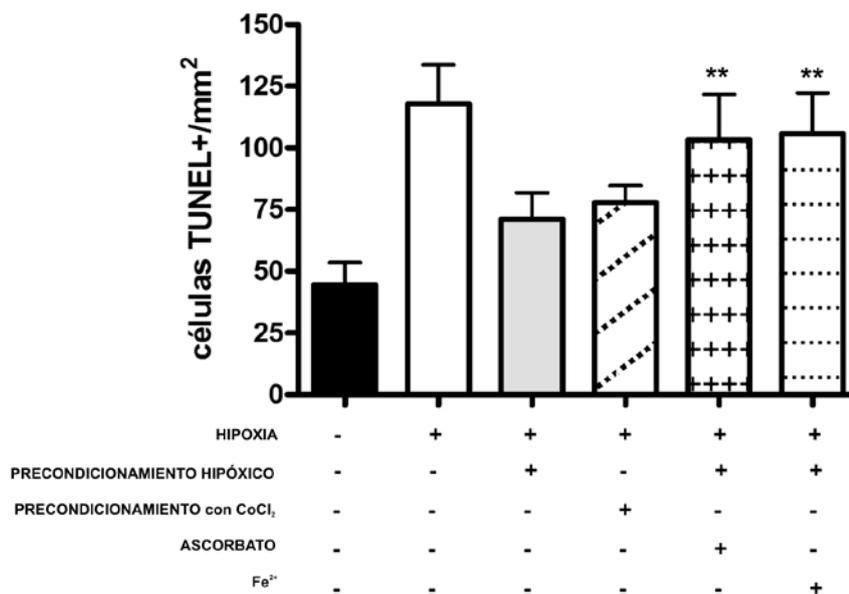


Figura 30 (continuación). (C) Cuantificación de núcleos TUNEL+. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto de embriones precondicionados tratados con vehículo (**p < 0.01, ANOVA y post-test de Dunnett).

18. Efecto conjunto del precondicionamiento hipóxico y la administración de 7-NI sobre la muerte celular apoptótica

Tanto el precondicionamiento hipóxico como la administración de 7-NI, logran un efecto de neuroprotección parcial frente a la injuria hipóxica. A continuación intentamos determinar el efecto conjunto del precondicionamiento hipóxico y la administración de 7-NI 20 min antes de la hipoxia sobre los parámetros de muerte celular apoptótica.

Observamos que el efecto conjunto de ambas estrategias de neuroprotección tuvo un efecto aditivo, logrando una neuroprotección completa (Figura 31). Estos resultados sugieren que no habría una vía molecular común mediando los efectos neuroprotectores. Si ese fuera el caso, esperaríamos un efecto sinérgico. En otras palabras, si el efecto máximo había sido alcanzado por una determinada vía molecular, el efecto conjunto no debería exteriorizarse en un mayor grado de neuroprotección.

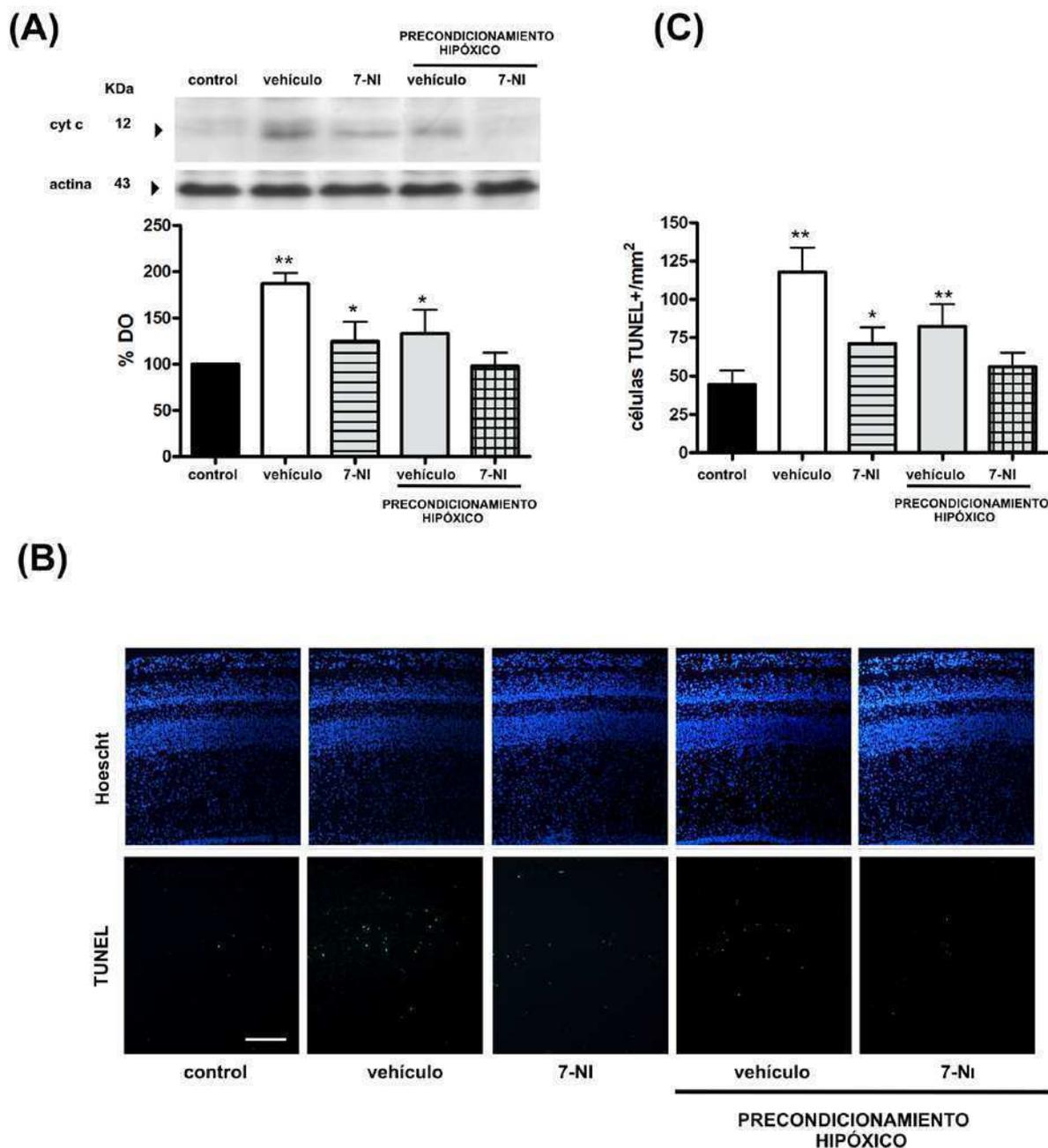


Figura 31. Efecto conjunto del preconditionamiento hipóxico y 7-NI sobre la muerte celular inducida por la hipoxia. En el DE 11, algunos embriones fueron preconditionados. En el DE 12 fueron sometidos a una hipoxia aguda (excepto C). 20 min antes de la hipoxia, algunos embriones fueron inyectados con 7-NI 0,5 mM. (A) Inmunoblot representativo de fracciones citosólicas reveladas con anticuerpo anti-citocromo c. Se incluye el análisis densitométrico. Las membranas fueron strippeadas y rehibridadas con anti-actina para confirmar igual carga de proteínas. Las determinaciones corresponden a las 4 h post-hipoxia. (B) Microfotografías mostrando secciones histológicas del lóbulo óptico teñidas con el contraste nuclear Hoechst y núcleos TUNEL positivos para cada tratamiento. Barra: 300 μ m. (C) Cuantificación de núcleos TUNEL+. Las determinaciones corresponden a las 6 h post-hipoxia. Los valores son promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Significativamente distinto del control (**p < 0.01, *p < 0.05, ANOVA y post-test de Dunnett).

Discusión

1. Activación de la vía apoptótica intrínseca inducida por hipoxia

Distintos abordajes experimentales han aportado evidencias morfológicas, histológicas y bioquímicas de que la injuria cerebral aguda provocada por una hipoxia-isquemia (H-I), produce acidosis, excitotoxicidad por glutamato y stress oxidativo conduciendo a muerte celular de tipo apoptótica durante el período de reoxigenación (Dirnagl *et al.*, 1999), tanto en el cerebro adulto (Endres *et al.*, 1998) como en el neonato (Cheng *et al.*, 1998).

De acuerdo con estos resultados, estudios previos realizados en nuestro modelo experimental, determinaron que una hipoxia hipóxica aguda produce un incremento en el número de células que presentan fragmentación del ADN, un indicador de apoptosis. La cinética de este marcador mostró un aumento significativo únicamente a las 6h post-hipoxia, volviendo a valores control a las 9 h post-hipoxia. De igual modo, se determinó un aumento de caspasa-3 clivada (activa) únicamente a las 6h post-hipoxia, habiéndose analizado un rango de 12 h de reoxigenación en ambos casos (Pozo Devoto *et al.*, 2006).

En la literatura, se describen dos vías moleculares clásicas que conducen a la activación de caspasa-3. La vía mitocondrial, o 'intrínseca', que se caracteriza por la liberación de citocromo c al citosol. Allí, el citocromo c se combina con APAF-1 (*apoptosis protease activating factor-1*), procaspasa-9 y dATP, produciendo caspasa-9 activa (Zou *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998) y generando subsecuentemente la activación proteolítica de caspasa-3. En la otra vía, la 'extrínseca', la unión de un ligando específico, como Fas, a un receptor de muerte desencadena el autoprocésamiento de caspasa-8 a su forma activa, que directamente activa a su vez a caspasa-3 (Muzio *et al.*, 1996). En el presente estudio hemos determinado que la hipoxia induce un marcado incremento en la translocación del citocromo c al citosol (Figura 9), precediendo temporalmente en 2 h a la fragmentación del ADN. Estos resultados demuestran que en nuestro modelo experimental la hipoxia activa la vía

apoptótica intrínseca. De manera similar, la activación de esta vía ha sido descrita en otros modelos de H-I (Bassetta *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Además, y en concordancia con nuestras observaciones, en la mayoría de las isquemias transitorias la muerte celular se manifiesta horas o incluso días después de la injuria (Kirino *et al.*, 1984; Dragunow *et al.*, 1994; Banasiak *et al.*, 2000).

En el presente trabajo hemos determinado que la liberación de citocromo c se encuentra precedida por un aumento en los marcadores de stress oxidativo (Tabla 1 y Figura 7). El daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN ha sido documentado en neuronas dentro de las lesiones isquémicas (Hayashi *et al.*, 1999). En línea con nuestros resultados, la generación de especies reactivas tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\bullet$) generadas durante la reoxigenación, sobrepasan los mecanismos antioxidantes endógenos y preceden al desencadenamiento de la apoptosis luego de un evento de H-I (Blomgren *et al.*, 2007; Gill & Perez-Polo, 2008). La mayor parte de la evidencia acumulada a lo largo de las últimas dos décadas en favor de la participación de las especies reactivas en el daño neuronal inducido por H-I, proviene del uso de antioxidantes y otros *scavengers* de especies reactivas que evitan la expansión de la lesión y que, en algunos casos, restauran la funcionalidad neurológica luego de la hipoxia (Yu *et al.*, 1998; Tagami *et al.*, 1999). Además, la sobreexpresión de enzimas antioxidantes tiene efectos protectores en casos de accidente cerebrovascular (Weisbrodt-Lefkowitz *et al.*, 1998) en tanto que ratones *knockout* para esas enzimas se muestran más susceptibles a la H-I (Kondo *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998).

Las mitocondrias son las principales fuentes intracelulares de ROS, produciendo grandes cantidades de reacciones redox y utilizando cantidades masivas de oxígeno (Christophe & Nicolas, 2006). Por esta razón, estas organelas son tanto las generadoras como los primeros blancos del stress oxidativo.

Se ha determinado que en muchas formas de isquemia las mitocondrias exhiben un *swelling* transitorio, que dura algunas horas (Petito & Pulsinelli, 1984; Yamamoto et al., 1990; Schulz et al., 1996). Estimaciones indirectas como la tasa metabólica del tejido medida mediante el consumo de glucosa, muestran una depresión temporaria de alrededor del 50% (Kozuka et al., 1989; Mies et al., 1990). Además, otros estudios han determinado que los niveles de ATP se reducen en niveles similares (Steen et al., 1978; Wagner et al., 1989), sugiriendo, en conjunto, una inhibición de la actividad mitocondrial. Es importante notar que las mitocondrias tienen un rol central en el desencadenamiento e integración de señales apoptóticas (Green & Reed, 1998) y ha sido establecido en diversos modelos experimentales del sistema nervioso, que la apoptosis se encuentra usualmente precedida por disfunción mitocondrial (Lipton, 1999; Hagberg, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que el óxido nítrico (NO) y otras especies derivadas como el peroxinitrito (ONOO⁻) tienen un efecto inhibitorio sobre los complejos respiratorios mitocondriales (Riobo et al., 2001; Murray et al., 2003). En este trabajo, indagamos una posible vinculación entre el daño mitocondrial inducido por la hipoxia y la participación del NO en ese daño.

2. Daños bioquímicos y estructurales dependientes de NO en las mitocondrias del SNC luego de un evento hipóxico.

En el presente trabajo demostramos, por primera vez, que las mitocondrias del SNC incrementan el contenido y actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), y exhiben daños ultraestructurales e inhibición del complejo I luego de un evento de hipoxia-reoxigenación. La secuencia de eventos que conducen al daño mitocondrial incluye: (i) un incremento agudo de mtNOS; (ii) la nitración transitoria de proteínas mitocondriales; (iii) el bloqueo prolongado de la transferencia

de electrones a nivel del el complejo I; y (iv) la recuperación al cabo de 1-2 días luego de la injuria.

Recientemente se ha postulado un rol relevante de mtNOS en la fisiología mitocondrial, controlando la tasa de consumo de oxígeno (Giulivi *et al.*, 2006; Galkin *et al.*, 2007). Este modelo fue propuesto en base a estudios pioneros que habían determinado que el complejo IV (citocromo oxidasa) es inhibido reversiblemente por NO (Giulivi, 2003; Haynes *et al.*, 2003). Como regulador negativo de la respiración mitocondrial, mtNOS permite la producción de cantidades suficientes de ATP a la vez que previene la aparición de focos anóxicos, por lo que facilita la redistribución de oxígeno dentro de la célula. Una alta concentración de calcio y la translocación de NOS a la mitocondria regularían este efecto. En este contexto, es altamente relevante el estudio del contenido y actividad de mtNOS luego de una injuria hipóxica.

El mecanismo de activación de mtNOS no se encuentra aún completamente elucidado. Estudios previos han demostrado que mtNOS es modulada por hormonas tiroideas (Carreras *et al.*, 2001) y por exposición al frío (Peralta *et al.*, 2003). Además, ha sido descripto que el aumento en la concentración intracelular de calcio es un estímulo de particular importancia para aumentar la actividad de mtNOS (Ghafourifar *et al.*, 1999). Considerando que la hipoxia estimula a mtNOS a la vez que incrementa el influjo de calcio (Fernandez-Gomez *et al.*, 2008), una conexión putativa entre ambos efectos necesita ser explorada. En este contexto, la activación de receptores NMDA podría gatillar el incremento de Ca^{2+} y la subsecuente activación de mtNOS.

Ha sido reportado que la actividad de mtNOS se incrementa luego de la hipoxia en mitocondrias aisladas de hígado (Schild *et al.*, 2003) y luego de una prolongada hipoxia hipobárica en corazones de ratas jóvenes (Zaobornyj *et al.*, 2005). Además, el efecto de una hipoxia-reoxigenación *in vivo* sobre mtNOS ha sido estudiada con anterioridad en ratones adultos utilizando preparaciones de hígado (Lacza *et al.*, 2001), en las que la actividad de mtNOS se

encontró aumentada a las 6 h post-hipoxia aunque no se observaron cambios en el contenido de mtNOS medido por inmunoblotting. Sin embargo, no hay evidencias previas en relación a los efectos de la hipoxia-reoxigenación sobre el contenido y actividad de mtNOS en el SNC. En este estudio observamos un incremento en contenido y actividad de mtNOS a las 0-2 h post-hipoxia (Figura 11). Este resultado sugiere un incremento en la translocación de nNOS a la mitocondria y no una síntesis *de novo* generalizada, ya que no se observaron variaciones en el contenido de esta enzima en fracciones totales (Figura 11). Esta translocación no se vio reflejada en la densidad óptica de los inmunoblots de fracciones citosólicas debido a la alta concentración de nNOS en esas fracciones en comparación con el contenido mitocondrial.

Durante la reoxigenación posterior a una H-I, hay un incremento agudo de aniones superóxido (O_2^-) producido por la transferencia de electrones desde varios complejos respiratorios al oxígeno molecular (Cadenas *et al.*, 1977; Turrens & Boveris, 1980; Han *et al.*, 2001). Estas reacciones están fuertemente favorecidas debido a la elevada concentración de componentes reducidos en la cadena de transporte de electrones. Un aumento concomitante de la concentración de NO mitocondrial es compatible con la activación observada de mtNOS. Además, ha sido reportado previamente que el Ca^{2+} , el principal regulador de la actividad de mtNOS se acumula en las mitocondrias durante la hipoxia (Puka-Sundvall *et al.*, 2000a; Solien *et al.*, 2005). También podría ocurrir que el NO derivado de la actividad de NOS citosólicas contribuya al incremento en las concentraciones de NO en mitocondria debido a que es un gas difusible. El incremento simultáneo de los niveles de NO y O_2^- , conduce a una sobreproducción de $ONOO^-$ y moléculas relacionadas. La sobreproducción de $ONOO^-$ ha sido implicada en el daño neuronal isquémico (Eliasson *et al.*, 1999) y es consistente con la acumulación de proteínas nitradas observadas en este estudio (Figura 12), ya que la nitración de tirosinas está mediada por $ONOO^-$ y otras especies reactivas del nitrógeno formadas como

productos secundarios del metabolismo del NO en presencia de oxidantes (Radi, 2004). Estudios previos demostraron mediante técnicas bioquímicas e inmunológicas un incremento en la formación de nitrotirosina luego de una H-I en el cerebro de ratas neonatas (Hattori *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004). De modo coincidente, también se observó un aumento en la nitración de tirosinas durante el periodo de reoxigenación, en un modelo *in vitro* de mitocondrias aisladas sometidas a hipoxia (Koeck *et al.*, 2004). Los daños oxidativos observados incluyen, además, la presencia de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8dOHG) en el ADN mitocondrial a las 2 h post-hipoxia (Figura 7), coincidiendo con la inducción de mtNOS y probablemente, con el incremento en las concentraciones locales de ONOO⁻. 8dOHG es un biomarcador establecido de daños oxidativos en el ADN (Kasai, 2002; Ohtaki *et al.*, 2007) cuya producción puede ser inducida por ONOO⁻ (Inoue & Kawanishi, 1995; Yuasa *et al.*, 2008).

En este estudio hemos demostrado que, a diferencia del complejo IV, el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) presenta una inhibición de su actividad máxima (45%) que sigue el perfil temporal de la inducción de mtNOS y acumulación de proteínas nitradas (Figura 13). Hemos demostrado, por primera vez, que esta inhibición depende de NO ya pudo ser prevenida de manera dosis dependiente por 7-nitroindazol (7-NI), un inhibidor selectivo de nNOS (Figura 14). Esta observación permite vincular la disminución en la tasa de respiración mitocondrial inducida por la hipoxia (Puka-Sundvall *et al.*, 2000b; Clarkson *et al.*, 2007) con el efecto inhibitorio específico de NO y ONOO⁻ sobre el complejo I. Este último ha sido observado en tres modelos experimentales: preparaciones enriquecidas en complejo I (Pearce *et al.*, 2005), membranas mitocondriales aisladas (Riobo *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2003) y neuronas en cultivo (Yamamoto *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2004).

El complejo I está formado por más de 40 subunidades peptídicas, una flavina unida de modo no covalente, grupos hemo y una serie de grupos hierro-azufre (Carroll *et al.*, 2003). Diversos mecanismos han sido postulados para explicar la inhibición

dependiente de NO de este complejo. Uno de ellos, con gran sustento en la literatura, es la nitración de tirosinas de sus subunidades peptídicas. De hecho, técnicas inmunológicas y de espectrometría de masas acopladas con electroforesis desnaturizantes en 2 dimensiones, revelaron que 5 subunidades del complejo I presentaban tirosinas nitradas luego de incubar mitocondrias con ONOO⁻ (Murray *et al.*, 2003). Esto ha sido corroborado en otros estudios sobre la inhibición del complejo I mediante la observación de subunidades nitradas (Yamamoto *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2005). Además, Pearce y colaboradores (2005) examinaron cuidadosamente los efectos del NO y ONOO⁻ sobre los cofactores del complejo I aislado y observaron que ni los grupos hemo, ni los hierro-azufre, así como tampoco la flavina se encontraban afectadas. Estos estudios sugieren que la inhibición dependiente de NO del complejo I observada en este estudio podría estar asociada a la nitración de tirosinas de las subunidades proteicas.

La falta de inhibición irreversible del complejo IV descrita en este trabajo es consistente con estudios previos mostrando que el NO sólo inhibe de manera competitiva a este complejo (Cleeter *et al.*, 1994; Giulivi, 2003; Haynes *et al.*, 2003).

En este estudio hemos reportado por primera vez que la hipoxia-reoxigenación por sí misma, independientemente de otros factores que podrían actuar en la isquemia, induce cambios ultraestructurales compatibles con el *swelling* mitocondrial (Figura 10), que alcanzan un máximo al mismo tiempo que los indicadores de stress nitrativo. Esos cambios podrían estar asociados a la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT, *mitochondrial permeability transition*) ya, que ha sido demostrado que MTP puede ser inducido cuando las mitocondrias acumulan grandes cantidades de calcio y/o están expuestas a stress oxidativo, generando un colapso en el potencial de membrana mitocondrial y disipando los gradientes iónicos (Zoratti & Szabo, 1995).

La reversión espontánea de los daños mitocondriales podría deberse al surgimiento de una nueva población de mitocondrias

como consecuencia del reemplazo de células afectadas o a un incremento en la biogénesis mitocondrial, o bien a la denitración proteica. Los resultados obtenidos sugieren que la primera opción es la más probable, considerando que el análisis mediante western blot de fracciones citosólicas y mitocondriales no mostraron variaciones en mTFA, un marcador de biogénesis mitocondrial, hasta las 48 h luego del comienzo de la reoxigenación (datos no mostrados), y que la denitración requiere de enzimas específicas no descriptas en embriones de aves.

Hemos demostrado que los daños ultraestructurales observados en nuestro modelo son, al menos en parte, dependientes de NO, ya que las dilataciones dentro de las crestas y la ruptura de membranas pudieron evitarse mediante la administración de 7-NI y L-NAME (Figura 15). Sin embargo, las crestas permanecieron poco definidas reflejando el hecho de que este es el parámetro más sensible y que otros factores de daño, e.g especies reactivas del oxígeno podrían estar actuando.

La inhibición de mtNOS por diferentes inhibidores de NOS impide la sobreproducción de NO en mitocondria y la consecuente sucesión de eventos de daño. Se observó una notable protección de los daños mitocondriales con el uso de 7-NI. Ha sido demostrado que una dosis alta de este fármaco produce una abolición prácticamente total de la actividad de mtNOS (Carreras *et al.*, 2002). La administración de esta droga se realizó sobre la membrana corion-alantoidea, altamente vascularizada, que permite un pasaje rápido de moléculas a la circulación embrionaria y la difusión a través de la barrera hematoencefálica aún inmadura (Ribatti *et al.*, 1993). 7-NI difunde, además, rápidamente en el tejido nervioso en general y en el SNC en particular (Bush & Pollack, 2001).

Cabe preguntarse si el NO que desencadena los daños mitocondriales proviene de la inducción de la mtNOS, de nNOS o de qué proporciones relativas de ambas isoformas. En este trabajo hemos demostrado una importante inducción de mtNOS, pero también podría ocurrir que el NO derivado de de la actividad de

NOS citosólicas contribuya al incremento en las concentraciones de NO en mitocondria ya que es un gas cuyo coeficiente de difusión es de $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$, similar al del O_2 (Wise, D. 1968). Sin embargo, en el citosol el NO se une a diversos compuestos, por lo que la posibilidad de que el NO presente en las mitocondrias, cuya concentración se encuentra entre 30-100 nM, provenga del NO citosólico es relativamente baja. En concordancia con esto, hay evidencias experimentales que indican que la concentración en estado estacionario de NO en la mitocondria se debe a la actividad constitutiva de mtNOS (Giulivi, 1999). Además, debido a que aún no se han desarrollado inhibidores farmacológicos específicos de mtNOS vs. nNOS, esta la contribución diferencial de ambas isoformas no puede ser evaluada experimentalmente de manera directa.

Estudios pioneros demostraron hace poco más de una década, efectos neuroprotectores del 7-NI en modelos de isquemia focal transitoria en ratas (Escott *et al.*, 1998) y de hipoxia-isquemia en ratas neonatas (Ishida *et al.*, 2001). En ambos casos se analizaron parámetros globales de daño como la exclusión del colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) o la diferencia del peso de los hemisferios ipsi y contralateral. Sin embargo, en estos estudios no se evaluó el mecanismo molecular que subyacía a la neuroprotección por 7-NI. Trabajos recientes han determinado que la inhibición selectiva de nNOS tiene efectos neuroprotectores impidiendo la activación de la cascada de caspasas inducida por hipoxia en el cerebro de cerdos neonatos (Mishra & Delivoria-Papadopoulos, 2006), y disminuyendo la tasa de apoptosis en ratas neonatas sometidas a hipoxia isquemia (Chu *et al.*, 2004). En línea con esos resultados, hemos demostrado en nuestro modelo experimental que la administración de 7-NI 20 minutos antes de la hipoxia evita la activación de vía apoptótica intrínseca (Figura 16), sugiriendo que los daños mitocondriales dependientes de NO descritos anteriormente se encuentran río arriba en la cascada de eventos que conducen a la muerte neuronal.

3. Obtención de fracciones nucleares solubles puras

En el presente estudio se han optimizado los procedimientos de obtención de fracciones nucleares solubles a partir de tejido nervioso embrionario. Las principales mejoras incluyen: (i) una centrifugación de baja velocidad para excluir contaminantes de alta densidad como glóbulos rojos, células enteras y fragmentos de capilares, (ii) una modificación del gradiente de densidad de sacarosa propuesto originalmente por Blobel y Potter (Blobel & Potter, 1966) para remover membranas mitocondriales y de retículo endoplasmático y (iii) una metodología de extracción proteica basada en stress mecánico, alta sal y la combinación de dos clases de detergentes, que incrementa el rendimiento obtenido.

La examinación morfológica del pellet HDC (*high density contaminants*) evidenció la importancia de la centrifugación de baja velocidad como un paso clave para evitar la contaminación por glóbulos rojos, células no lisadas durante la homogenización y fragmentos de capilares (Figura 19). El siguiente paso, el gradiente de sacarosa, mostró ser efectivo en remover fragmentos de RE y mitocondrias perinucleares ya que la evaluación mediante microscopía electrónica de PNF (*purified nuclear fraction*) reveló preparaciones con ausencia de contaminaciones membranosas (Figura 19). Además, el análisis mediante western blot de marcadores nucleares, mitocondriales y de RE presentes en fracciones nucleares solubles derivadas de PNF sugieren que este paso permite obtener una muestra pura (Figura 20).

La densidad específica del colchón (*cushion*) de sacarosa es un parámetro crítico. Si es muy baja, no permite remover las membranas contaminantes, y si es muy alta no permite el descenso de los núcleos. En el reporte original (Blobel & Potter, 1966), la densidad del colchón fue fijada en 2,3M para preparaciones de hígado de ratas adultas. Posteriormente se han descrito diferentes pasos de densidad para aislar núcleos. Muchos procedimientos experimentales usan un colchón 2M de sacarosa (Greenberg, 1997; Farrell, 1998). Sin embargo, núcleos de fuentes variadas no son lo suficientemente densos como para

atravesar ese gradiente, lo que disminuye drásticamente el rendimiento de núcleos puros. Resulta claro que la densidad apropiada del gradiente de sacarosa es tejido dependiente (Wheeler *et al.*, 1997; Kim & Shukla, 2006), pero hasta el momento no ha sido descrita para tejido nervioso embrionario. En este estudio, determinamos que una densidad de sacarosa de 1,6M es adecuada para tejido nervioso embrionario. Pequeños incrementos por encima de 1,6M se tradujeron en marcados descensos del rendimiento obtenido.

Otros abordajes experimentales para preparar extractos nucleares están basados en el método de Dignam (Dignam *et al.*, 1983; Helenius *et al.*, 1996), que consiste en una extracción de proteínas con una solución de alta sal, partiendo de una fracción nuclear cruda. Incluso ciertos estudios utilizan como extractos nucleares muestras derivadas de una extracción por alta sal a partir de un homogenato (Bergeron *et al.*, 2000) y conteniendo, por ello, una significativa contaminación de componentes citoplasmáticos. Ninguno de esos sistemas remueve contaminantes de alta densidad ni componentes membranosos perinucleares.

La metodología de extracción proteica, utilizada en este estudio, aprovecha las ventajas de la extracción con soluciones de alta sal para precipitar el ADN. También se utilizaron detergentes durante la extracción. Numerosos estudios han demostrado que muchas proteínas permanecen en las fracciones insolubles cuando sólo se utilizan detergentes no iónicos (Dechat *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Biggs *et al.*, 2005). Una optimización importante del procedimiento de extracción descrito en este estudio es la adición de una baja concentración del detergente iónico SDS al buffer de extracción, que ya contiene el detergente no iónico Tritón-X-100, incrementa el rendimiento proteico en ~25% (Tabla 3) comparado con la utilización del Tritón-X-100 como único detergente. La utilización de SDS no interfiere con la utilización de las fracciones nucleares solubles en electroforesis, ya que en esta técnica los buffers de siembra contienen típicamente

concentraciones de SDS 80 veces más altas que las utilizadas en la extracción.

En conclusión, este procedimiento parece ser confiable y conveniente para la obtención de fracciones nucleares solubles puras a partir de una cantidades relativamente pequeñas de tejido nervioso embrionario.

4. El rol de HIF-1 en la neuroprotección por preconditionamiento hipóxico

Diversos modelos experimentales han establecido que injurias breves y moderadas pueden conducir a una regulación metabólica y molecular autoprotectora que ha sido denominada 'preconditionamiento' (Chen & Simon, 1997). Se asume que la exposición inicial al stress estimula una serie de mecanismos endógenos protectores o preventivos que conducen al desarrollo de la tolerancia. En particular, ha sido demostrado que el preconditionamiento con una hipoxia moderada puede proteger al cerebro ante injurias hipóxico-isquémicas posteriores (Ran et al., 2005). Esto ha sido corroborado en modelos de animales neonatos para los que un preconditionamiento hipóxico con 8% O₂ por 3 h, los protege de una injuria hipóxico-isquémica subsiguiente (Bergeron et al., 2000; Ferriero, 2005). Usualmente, este efecto se manifiesta entre 1 y 3 días posteriores al preconditionamiento hipóxico (Shpargel et al., 2008). El efecto neuroprotector del preconditionamiento hipóxico ha sido también reproducido en modelos *in vitro* de cultivos neuronales sometidos a una injuria por privación de glucosa y oxígeno (Liu et al., 2000). En concordancia con esas observaciones, en el presente estudio hemos establecido que el preconditionamiento con un estímulo hipóxico de baja intensidad, confiere tolerancia a una injuria hipóxica más severa 24 h después. (Figura 17).

Numerosos estudios han evaluado cambios en la expresión génica en modelos animales de isquemia cerebral global y focal (Koistinaho & Hokfelt, 1997; Sharp et al., 2000). Dado que el

tejido nervioso es extremadamente sensible a la H-I (Siesjo, 1978), la regulación cerebral de HIF-1 es probablemente un punto de control altamente relevante. Específicamente, HIF-1 ha sido estudiado en modelos animales de hipoxia, isquemia cerebral global, isquemia focal e hipoxia-isquemia neonatal. Esos resultados demuestran un incremento de los niveles proteicos de HIF-1 α medidos por western blot e inmunohistoquímica (Jin et al., 2000b). Evidencia combinada proveniente de estudios de hibridización *in situ* e inmunohistoquímica han demostrado la expresión de HIF-1 α en neuronas (Kietzmann et al., 2001) (Bergeron et al., 1999). *In vivo*, la estabilización de HIF-1 α inducida por hipoxia, ha sido observada en ratas expuestas a hipoxia sistémica (Wiener et al., 1996; Bergeron et al., 2000; Bernaudin et al., 2002) o sometidas tanto a isquemia focal como global (Bergeron et al., 1999; Jin et al., 2000b). También se ha reportado que compuestos miméticos de la hipoxia, como el cloruro de cobalto (CoCl₂) y la desferrioxamina (DFX) incrementan los niveles proteicos y de mensajeros de HIF-1 α en el cerebro (Wiener et al., 1996; Bergeron et al., 2000; Bernaudin et al., 2002). De manera similar, se encuentran incrementados los niveles de HIF-1 α y la actividad de unión al ADN de HIF-1 luego de una exposición a hipoxia en diversas líneas celulares (Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996) y en cultivos primarios (Ruscher et al., 1998; Zaman et al., 1999). HIF-1 α es continuamente sintetizado y degradado bajo condiciones normóxicas, teniendo, en estas condiciones, una vida media extraordinariamente corta (menos de 5 min a 21%O₂) y con concentraciones de estado estacionario muy bajas (Jewell et al., 2001). Sin embargo, la cinética de acumulación y degradación parece depender notablemente de la intensidad de la injuria hipóxica, de la especie y de la edad del animal. En el presente trabajo, hemos determinado que a lo largo de la hipoxia se induce la acumulación de HIF-1 α en los núcleos celulares, y que su degradación se produce rápidamente luego de la reoxigenación (Figuras 23-24). También se observó que una hipoxia moderada

(utilizada para preconditionar) puede, *per se*, inducir una acumulación de HIF-1, aunque de menor intensidad (Figura 25).

Aunque los mecanismos moleculares que subyacen a la neuroprotección por preconditionamiento hipóxico aún se encuentran incompletamente comprendidos, estudios recientes en modelos de roedores han demostrado que la inducción de HIF-1 α está involucrada en la tolerancia a la hipoxia inducida por un preconditionamiento hipóxico hiperbárico (Sharp *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2008) (Gu *et al.*, 2008). En el presente trabajo hemos determinado que el preconditionamiento intensifica en ~30% la acumulación de HIF-1 α provocada por la hipoxia (Figura 26). Este resultado coincide con observaciones de otros grupos que han detectado una acumulación incrementada de HIF-1 (Bergeron *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005) y de sus genes blanco, incluyendo transportadores de glucosa, enzimas glicolíticas (Jones & Bergeron, 2001), EPO y VEGF (Bernaudin *et al.*, 2002) luego de la exposición al preconditionamiento hipóxico.

Mientras la mayoría de los estudios sugieren una función positiva para HIF-1 bajo condiciones hipóxicas, algunos estudios sugieren que un incremento agudo de este factor de transcripción puede funcionar como una señal de daño hipóxico severo, que conduce a la muerte celular mediante la activación de otros genes blanco (Semenza, 2000), entre ellos miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 como BNIP-3 (Bruick, 2000), Nix (Sowter *et al.*, 2001), p53 y caspasas (Li *et al.*, 2005). Este rol multifacético también lo han mostrado algunos genes blanco de HIF-1, tales como VEGF, que ha demostrado ser neuroprotector en diversas condiciones (Sun & Guo, 2005; Wang *et al.*, 2006), en tanto que otros paradigmas experimentales indican que VEGF incrementa la permeabilidad vascular y la inflamación, contribuyendo de este modo al edema cerebral (Lafuente *et al.*, 2002; Althaus *et al.*, 2006; Chi *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, un trabajo reciente ha demostrado que la administración de 2-metoxiestradiol y triciclododecan-9-il-xantogenato, dos fármacos capaces de regular negativamente a HIF-1, poseen efectos neuroprotectores en un modelo de isquemia focal inducida por

MCAO (*middle cerebral artery occlusion*) en ratas (Chen *et al.*, 2007). Para explicar el comportamiento bimodal de HIF-1, se ha sugerido que diferentes niveles de hipoxia desencadenan respuestas divergentes: niveles moderados de HIF-1 facilitan el aporte energético bajo condiciones hipóxicas y altos niveles de HIF-1 interactúan con la maquinaria apoptótica contribuyendo eventualmente a la muerte celular (Schmid *et al.*, 2004) (Chen *et al.*, 2009). Por estas razones, las consecuencias de la estabilización de HIF-1 deben determinarse en cada paradigma experimental.

En este estudio, demostramos que la acumulación de HIF-1 durante el preconditionamiento hipóxico es necesaria para que se manifieste la tolerancia a una injuria hipóxica posterior. Para ello, utilizamos un abordaje experimental basado en la modulación positiva y negativa de las HIF-prolil hidroxilasas (PHDs), principales reguladoras de HIF-1. Por un lado estimulamos la actividad de las PHDs -20 min antes del preconditionamiento- mediante el agregado de Fe^{2+} o de ascorbato. El ión ferroso (Fe^{2+}) constituye un elemento importante en la regulación de la actividad enzimática. Se localiza en el sitio activo de las PHDs - predominantemente hidrofóbico- y es requerido para que la enzima adquiera una conformación activa (McDonough *et al.*, 2006). Por su parte, el ascorbato es requerido para regenerar Fe^{2+} a partir del Fe^{3+} que se produce durante las reacciones desacopladas de la enzima (Counts *et al.*, 1978; Nietfeld & Kemp, 1981). Trabajos previos en estudios con cultivos celulares han demostrado que tanto los niveles intracelulares de Fe^{2+} como los de ascorbato pueden afectar la actividad enzimática de las PHDs y la acumulación de HIF-1 α (Knowles *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2006). Aquí, observamos que la administración *in vivo* de Fe^{2+} y ascorbato impidieron el incremento de HIF-1 inducido por el preconditionamiento y sus efectos neuroprotectores (Figuras 28,29,30). Este estudio verifica, por lo tanto, correlaciones preexistentes entre los efectos protectores de los quelantes de hierro y su habilidad para estabilizar HIF-1 (Zaman *et al.*, 1999). Por otro lado,

administramos CoCl_2 para inducir la expresión de HIF-1 mediante una vía independiente del preconditionamiento hipóxico. La administración de CoCl_2 inhibe la actividad de las PHDs, ya que cationes metálicos divalentes, como Co^{2+} o Ni^{2+} sustituyen al Fe^{2+} en el sitio activo de la enzima (Maxwell & Salnikow, 2004). Determinamos que el preconditionamiento con CoCl_2 reprodujo la intensificación de la acumulación de HIF-1 luego de la hipoxia - previamente observada como producto del preconditionamiento hipóxico- y el desarrollo de la tolerancia a una injuria hipóxica posterior. (Figuras 27,29,30).

Evidencias indirectas de un rol neuroprotector de los mecanismos reguladores de hipoxia, derivan del conocimiento de los efectos neuroprotectores de dos productos génicos inducidos por HIF-1: eritropoyetina (Sakanaka *et al.*, 1998) y VEGF (Jin *et al.*, 2000a). Además, diversas estrategias experimentales que promueven la estabilización de HIF-1 α han demostrado tener efectos neuroprotectores en líneas celulares (Aminova *et al.*, 2005), cultivos primarios (Siddiq *et al.*, 2005) y varios modelos de isquemia (Warnecke *et al.*, 2003; Milkiewicz *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado que los efectos neuroprotectores del quelante de hierro DFX se encuentran directamente mediados por HIF-1 α , ya que este efecto pudo ser revertido mediante la supresión de HIF-1 α con un oligonucleótido antisentido (Hamrick *et al.*, 2005). De modo similar Taie y colaboradores demostraron, utilizando una cepa de ratones deficientes en HIF-1 α en tejido nervioso, el rol central de este factor en la neuroprotección mediada por preconditionamiento hipóxico (Taie *et al.*, 2009). Es interesante notar que las vías moleculares mediante las cuales el preconditionamiento hipóxico confiere tolerancia dependen de la naturaleza de la injuria. En ese sentido, otros paradigmas experimentales, como el efecto neuroprotector del preconditionamiento hipóxico sobre la muerte de los fotorreceptores de la retina inducida por luz intensa, han demostrado ser independientes de la estabilización de HIF-1 α (Thiersch *et al.*, 2009).

5. Efecto conjunto del 7-NI y el preconditionamiento hipóxico sobre la muerte celular inducida por hipoxia

Dado que las dos estrategias de neuroprotección aplicadas en el presente estudio - inhibición de nNOS/mtNOS mediante 7-NI y preconditionamiento hipóxico- tuvieron un efecto parcial en la atenuación de la muerte celular inducida por hipoxia, decidimos poner a prueba el efecto de ambas en forma conjunta. Observamos que el efecto conjunto de ambas estrategias de neuroprotección tuvo un efecto aditivo, logrando una neuroprotección completa (Figura 31).

Numerosas interacciones entre las vías moleculares del NO y HIF-1 han sido reportadas en la literatura. Bajo condiciones normóxicas, NO conduce a la estabilización de HIF, probablemente mediante la inhibición directa de PHDs (Kaelin, 2005). Paradójicamente, NO inhibe la inducción de HIF bajo condiciones hipóxicas. Se demostró, utilizando dos líneas celulares, que NO generado por dadores de NO, evitó la acumulación de HIF-1 α inducida por hipoxia (Agani *et al.*, 2002). En este estudio, la exposición a NO estuvo asociada, además, a la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por otro lado, se ha demostrado que el efecto del NO puede ser simulado (*mimicked*) por inhibidores farmacológicos del complejo I, tales como la rotenona y el DPI (*diphenyleneiodonium*), bloqueando la expresión de HIF-1 α inducida por hipoxia (Chandel *et al.*, 1998; Chandel *et al.*, 2000). En conclusión, NO interfiere con los eventos de señalización que conducen a la acumulación de HIF-1 α durante la hipoxia. Para explicar este fenómeno de interferencia, se ha sugerido que bajo condiciones hipóxicas la disponibilidad de oxígeno para las PHDs sería aún suficiente para hidroxilar a HIF-1 α . Sin embargo, el poco oxígeno disponible es utilizado en gran parte por las mitocondrias, lo que disminuye aún más las concentraciones intracelulares de oxígeno y priva a las PHDs del sustrato necesario para hidroxilar a HIF-1 α . Esto no ocurre cuando la cadena de transporte de electrones se encuentra inhibida, por ejemplo por NO o inhibidores farmacológicos de los complejos respiratorios,

conduciendo a la hidroxilación y degradación de HIF bajo condiciones hipóxicas (Hagen *et al.*, 2003; Brune & Zhou, 2007). A la luz de este modelo se plantea la posibilidad de que los efectos beneficiosos del 7-NI en nuestro sistema experimental estén mediados indirectamente a través de la estabilidad de HIF: La inhibición de la producción de NO permitiría una alta velocidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, consumiendo el oxígeno intracelular y favoreciendo la estabilización de HIF-1. En particular, la inhibición de mtNOS impediría la producción localizada de NO en la membrana mitocondrial interna, donde tiende a concentrarse por su hidrofobicidad, impidiendo entonces la inhibición del Complejo I observada en nuestro sistema experimental (Figura 13). Sin embargo, nuestros resultados muestran que un aumento en la acumulación de HIF por encima del logrado mediante el preconditionamiento hipóxico -obtenido mediante la administración de CoCl_2 0,1mM (Figura 27)- no se refleja en un mayor grado de neuroprotección (Figuras 29-30). Por otro lado, resultados preliminares del laboratorio muestran que HIF-1 α no sufre una mayor acumulación cuando se administra 7-NI el día posterior al preconditionamiento hipóxico (datos no mostrados). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que los efectos neuroprotectores del 7-NI en nuestro modelo se deben a efectos independientes de la acción de NO sobre la vía de HIF-1. Por ejemplo, previniendo señales pro-apoptóticas gatilladas por daños bioquímicos y ultraestructurales en las mitocondrias.

Conclusiones

En el presente estudio hemos utilizado embriones de aves en un modelo experimental de hipoxia aguda normobárica, con el objetivo de elucidar las vías moleculares y eventos de señalización celular que forman parte de los mecanismos de injuria y neuroprotección.

Los resultados obtenidos han demostrado que la hipoxia induce un marcado incremento en la translocación del citocromo c al citosol, precediendo temporalmente a la fragmentación del ADN, indicando que en nuestro modelo experimental la hipoxia activa la vía apoptótica intrínseca. También hemos determinado que la muerte celular apoptótica se encuentra precedida por un aumento en los marcadores de stress oxidativo.

Dado que las mitocondrias juegan un rol central tanto en la integración de señales pro- y anti-apoptóticas como en la producción de especies oxidantes, decidimos estudiar a continuación daños mitocondriales y la posible modulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) por la hipoxia. Observamos, por primera vez, que luego de un evento de hipoxia-reoxigenación, las mitocondrias del SNC incrementan el contenido y actividad de mtNOS, exhibiendo daños ultraestructurales e inhibición del complejo I - ambos cambios dependientes de óxido nítrico (NO). Además, observamos que la administración de 7-NI - un inhibidor selectivo de nNOS- 20 minutos antes de la hipoxia evita parcialmente la activación de vía apoptótica intrínseca, sugiriendo que los daños mitocondriales dependientes de NO descritos anteriormente se encuentran río arriba en la cascada de eventos que conducen a la muerte neuronal.

En segundo lugar, hemos establecido que el preconditionamiento con un estímulo hipóxico de baja intensidad, confiere tolerancia parcial a una injuria hipóxica más severa 24 h después. Mediante la administración de moduladores positivos (CoCl_2) y negativos (Fe^{2+} , ascorbato) de las HIF-prolil hidroxilasas, demostramos que la acumulación de HIF-1 durante el preconditionamiento hipóxico es necesaria para que se manifieste la tolerancia a una injuria hipóxica posterior.

Por último, observamos que la administración de 7-NI y el preconditionamiento hipóxico aplicados en forma conjunta tuvo un efecto aditivo, logrando una neuroprotección completa. Los resultados obtenidos sugieren que los efectos neuroprotectores del 7-NI en nuestro modelo se deben a efectos independientes de la acción de NO sobre la vía de HIF-1.

Lic. Sebastián Giusti

Dra. Sara Fiszer de Plazas

Las publicaciones que surgieron de esta Tesis Doctoral se mencionan a continuación:

1- Hypoxia induces complex I inhibition and ultrastructural damage by increasing mitochondrial nitric oxide in developing CNS.

Giusti S , Converso DP, Poderoso JJ, Fiszler de Plazas S.
European Journal of Neuroscience. 2008 Jan;27(1):123-31.

2- Hypoxia-induced apoptotic cell death is prevented by oestradiol via oestrogen receptors in the developing central nervous system.

Pozo Devoto VM*, Giusti S*, Chavez JC, Fiszler de Plazas S.
(* ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo)
Journal of Neuroendocrinology. 2008 Mar;20(3):375-80.

3- An improved method to obtain a soluble nuclear fraction from embryonic brain tissue

Giusti S, Bogetti ME, Bonafina A, Fiszler de Plazas S.
Neurochemical Research. 2009 May 22 [Epub ahead of print] DOI
10.1007/s11064-009-9993-9

Manuscrito en preparación:

Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves up-regulation of HIF-1 in a prenatal model of hypoxia

Giusti S , Fiszler de Plazas S.

Referencias

- AGANI, F. H., PUCHOWICZ, M., CHAVEZ, J. C., PICHUOLE, P. & LAMANNA, J. (2002). Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1 α expression during hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C178-86.
- AGGARWAL, S., GOLLAPUDI, S. & GUPTA, S. (1999). Increased TNF- α -induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF- α receptor expression and activation of caspases. *J Immunol* **162**, 2154-61.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615.
- ALTHAUS, J., BERNAUDIN, M., PETIT, E., TOUTAIN, J., TOUZANI, O. & RAMI, A. (2006). Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int* **48**, 687-95.
- AMINOVA, L. R., CHAVEZ, J. C., LEE, J., RYU, H., KUNG, A., LAMANNA, J. C. & RATAN, R. R. (2005). Prosurvival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1 α stabilization in a murine hippocampal cell line. *J Biol Chem* **280**, 3996-4003.
- ARAUJO, I. M., VERDASCA, M. J., AMBROSIO, A. F. & CARVALHO, C. M. (2004). Nitric oxide inhibits complex I following AMPA receptor activation via peroxynitrite. *Neuroreport* **15**, 2007-11.
- AUST, S. D., ROERIG, D. L. & PEDERSON, T. C. (1972). Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **47**, 1133-7.
- BABIOR, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-76.
- BAGETTA, G., CHIAPPETTA, O., AMANTEA, D., IANNONE, M., ROTIROTI, D., COSTA, A., NAPPI, G. & CORASANITI, M. T. (2004). Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci Lett* **368**, 87-91.
- BALDUINI, W., CARLONI, S., MAZZONI, E. & CIMINO, M. (2004). New therapeutic strategies in perinatal stroke. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 315-23.
- BANASIAK, K. J., XIA, Y. & HADDAD, G. G. (2000). Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* **62**, 215-49.
- BARKS, J. D. & SILVERSTEIN, F. S. (1992). Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol* **2**, 235-43.
- BENDER, L. M., MORGAN, M. J., THOMAS, L. R., LIU, Z. G. & THORBURN, A. (2005). The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ* **12**, 473-81.
- BERGERON, M., GIDDAY, J. M., YU, A. Y., SEMENZA, G. L., FERRIERO, D. M. & SHARP, F. R. (2000). Role of hypoxia-inducible factor-1 in

- hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* **48**, 285-96.
- BERGERON, M., YU, A. Y., SOLWAY, K. E., SEMENZA, G. L. & SHARP, F. R. (1999). Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* **11**, 4159-70.
- BERNAUDIN, M., NEDELEC, A. S., DIVOUX, D., MACKENZIE, E. T., PETIT, E. & SCHUMANN-BARD, P. (2002). Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 393-403.
- BERRA, E., BENIZRI, E., GINOUVES, A., VOLMAT, V., ROUX, D. & POUYSSEGUR, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* **22**, 4082-90.
- BIGGS, J. R., ZHANG, Y., PETERSON, L. F., GARCIA, M., ZHANG, D. E. & KRAFT, A. S. (2005). Phosphorylation of AML1/RUNX1 regulates its degradation and nuclear matrix association. *Mol Cancer Res* **3**, 391-401.
- BLOBEL, G. & POTTER, V. R. (1966). Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science* **154**, 1662-5.
- BLOMGREN, K., LEIST, M. & GROG, L. (2007). Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* **12**, 993-1010.
- BOLANOS, J. P., HEALES, S. J., LAND, J. M. & CLARK, J. B. (1995). Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* **64**, 1965-72.
- BORUTAITE, V., BUDRIUNAITE, A. & BROWN, G. C. (2000). Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 405-12.
- BOSCOBOINIK, D., SZEWCZYK, A., HENSEY, C. & AZZI, A. (1991). Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**, 6188-94.
- BOVERIS, A., OSHINO, N. & CHANCE, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **128**, 617-30.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 682-5.
- BRENMAN, J. E., CHAO, D. S., GEE, S. H., MCGEE, A. W., CRAVEN, S. E., SANTILLANO, D. R., WU, Z., HUANG, F., XIA, H., PETERS, M. F., FROEHNER, S. C. & BREDT, D. S. (1996). Interaction of nitric oxide synthase

- with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-67.
- BRENNAN, J. E., CHAO, D. S., XIA, H., ALDAPE, K. & BRETT, D. S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743-52.
- BRENNAN, J. E., XIA, H., CHAO, D. S., BLACK, S. M. & BRETT, D. S. (1997). Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neurosci* **19**, 224-31.
- BROWN, A. W. (1977). Structural abnormalities in neurones. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **11**, 155-69.
- BRUICK, R. K. (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9082-7.
- BRUICK, R. K. & MCKNIGHT, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-40.
- BRUNE, B. & ZHOU, J. (2007). Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc Res* **75**, 275-82.
- BUSH, M. A. & POLLACK, G. M. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 7-nitroindazole, a selective nitric oxide synthase inhibitor, in the rat hippocampus. *Pharm Res* **18**, 1607-12.
- CADENAS, E., BOVERIS, A., RAGAN, C. I. & STOPPANI, A. O. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **180**, 248-57.
- CALKIN, P. A., BAUMGARTNER, B. J. & BARNES, E. M., JR. (1994). Agonist administration in ovo down-regulates cerebellar GABAA receptors in the chick embryo. *Brain Res Mol Brain Res* **26**, 18-25.
- CAPDEVILA, J., CHACOS, N., WERRINGLOER, J., PROUGH, R. A. & ESTABROOK, R. W. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5362-6.
- CARRERAS, M. C., MELANI, M., RIOBO, N., CONVERSO, D. P., GATTO, E. M. & PODEROSO, J. J. (2002). Neuronal nitric oxide synthases in brain and extraneural tissues. *Methods Enzymol* **359**, 413-23.
- CARRERAS, M. C., PERALTA, J. G., CONVERSO, D. P., FINOCCHIETTO, P. V., REBAGLIATI, I., ZANINOVICH, A. A. & PODEROSO, J. J. (2001). Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O(2) uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H2282-8.
- CARROLL, J., FEARNLEY, I. M., SHANNON, R. J., HIRST, J. & WALKER, J. E. (2003). Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **2**, 117-26.

- CASSINA, A. & RADI, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* **328**, 309-16.
- CLARKSON, A. N., CLARKSON, J., JACKSON, D. M. & SAMMUT, I. A. (2007). Mitochondrial involvement in transhemispheric diaschisis following hypoxia-ischemia: Clomethiazole-mediated amelioration. *Neuroscience* **144**, 547-61.
- CLEETER, M. W., COOPER, J. M., DARLEY-USMAR, V. M., MONCADA, S. & SCHAPIRA, A. H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **345**, 50-4.
- CLEMENTI, E., BROWN, G. C., FEELISCH, M. & MONCADA, S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7631-6.
- COUNTS, D. F., CARDINALE, G. J. & UDENFRIEND, S. (1978). Prolyl hydroxylase half reaction: peptidyl prolyl-independent decarboxylation of alpha-ketoglutarate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2145-9.
- CROSS, C. E., HALLIWELL, B., BORISH, E. T., PRYOR, W. A., AMES, B. N., SAUL, R. L., MCCORD, J. M. & HARMAN, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* **107**, 526-45.
- CURRISTIN, S. M., CAO, A., STEWART, W. B., ZHANG, H., MADRI, J. A., MORROW, J. S. & MENT, L. R. (2002). Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15729-34.
- CHAN, P. H. (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 2-14.
- CHANCE, B., SIES, H. & BOVERIS, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- CHANDEL, N. S., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C. E., SIMON, M. C. & SCHUMACKER, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11715-20.
- CHANDEL, N. S., MCCLINTOCK, D. S., FELICIANO, C. E., WOOD, T. M., MELENDEZ, J. A., RODRIGUEZ, A. M. & SCHUMACKER, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem* **275**, 25130-8.
- CHEN, C., HU, Q., YAN, J., LEI, J., QIN, L., SHI, X., LUAN, L., YANG, L., WANG, K., HAN, J., NANDA, A. & ZHOU, C. (2007). Multiple effects of 2ME2 and D609 on the cortical expression of HIF-1alpha and apoptotic genes in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model. *J Neurochem* **102**, 1831-41.
- CHEN, J., GRAHAM, S. H. & SIMON, R. P. (1995). A comparison of the effects of a sodium channel blocker and an NMDA antagonist upon

- extracellular glutamate in rat focal cerebral ischemia. *Brain Res* **699**, 121-4.
- CHEN, J. & SIMON, R. (1997). Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* **48**, 306-11.
- CHEN, W., OSTROWSKI, R. P., OBENAU, A. & ZHANG, J. H. (2009). Prodeath or prosurvival: two facets of hypoxia inducible factor-1 in perinatal brain injury. *Exp Neurol* **216**, 7-15.
- CHENG, Y., DESHMUKH, M., D'COSTA, A., DEMARO, J. A., GIDDAY, J. M., SHAH, A., SUN, Y., JACQUIN, M. F., JOHNSON, E. M. & HOLTZMAN, D. M. (1998). Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* **101**, 1992-9.
- CHI, O. Z., HUNTER, C., LIU, X. & WEISS, H. R. (2007). Effects of anti-VEGF antibody on blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* **204**, 283-7.
- CHOI, D. W. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* **18**, 58-60.
- CHRISTOPHE, M. & NICOLAS, S. (2006). Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des* **12**, 739-57.
- CHU, G. L., XIN, Y., CHENG, J. & BI, S. Y. (2004). [Expression of neuronal nitric oxide synthase in brain tissue of hypoxic-ischemic neonatal rat and the cerebral protective effect of neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **84**, 156-8.
- DARLEY-USMAR, V., WISEMAN, H. & HALLIWELL, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* **369**, 131-5.
- DAWSON, V. L., KIZUSHI, V. M., HUANG, P. L., SNYDER, S. H. & DAWSON, T. M. (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* **16**, 2479-87.
- DEBY, C. & GOUTIER, R. (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* **39**, 399-405.
- DECHAT, T., GOTZMANN, J., STOCKINGER, A., HARRIS, C. A., TALLE, M. A., SIEKIERKA, J. J. & FOISNER, R. (1998). Detergent-salt resistance of LAP2alpha in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *EMBO J* **17**, 4887-902.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. & MISHRA, O. P. (2000). Mechanisms of perinatal cerebral injury in fetus and newborn. *Ann N Y Acad Sci* **900**, 159-68.

- DEMICHELI, V., QUIJANO, C., ALVAREZ, B. & RADI, R. (2007). Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* **42**, 1359-68.
- DIGICAYLIOGLU, M. & LIPTON, S. A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* **412**, 641-7.
- DIGNAM, J. D., LEBOVITZ, R. M. & ROEDER, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-89.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-7.
- DIRNAGL, U. & MEISEL, A. (2008). Endogenous neuroprotection: Mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology*.
- DRAGUNOW, M., BEILHARZ, E., SIRIMANNE, E., LAWLOR, P., WILLIAMS, C., BRAVO, R. & GLUCKMAN, P. (1994). Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischaemic injury to the young rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **25**, 19-33.
- DROGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.
- DU, C., HU, R., CSERNANSKY, C. A., HSU, C. Y. & CHOI, D. W. (1996). Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 195-201.
- EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 663-9.
- EHRISMANN, D., FLASHMAN, E., GENN, D. N., MATHIOUDAKIS, N., HEWITSON, K. S., RATCLIFFE, P. J. & SCHOFIELD, C. J. (2007). Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. *Biochem J* **401**, 227-34.
- ELFERING, S. L., SARKELA, T. M. & GIULIVI, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **277**, 38079-86.
- ELIASSON, M. J., HUANG, Z., FERRANTE, R. J., SASAMATA, M., MOLLIVER, M. E., SNYDER, S. H. & MOSKOWITZ, M. A. (1999). Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* **19**, 5910-8.
- ENDRES, M., NAMURA, S., SHIMIZU-SASAMATA, M., WAEBER, C., ZHANG, L., GOMEZ-ISLA, T., HYMAN, B. T. & MOSKOWITZ, M. A. (1998). Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 238-47.
- EPSTEIN, A. C., GLEADLE, J. M., MCNEILL, L. A., HEWITSON, K. S., O'ROURKE, J., MOLE, D. R., MUKHERJI, M., METZEN, E., WILSON, M. I., DHANDA, A., TIAN, Y. M., MASSON, N., HAMILTON, D. L., JAAKKOLA, P., BARSTEAD, R., HODGKIN,

- J., MAXWELL, P. H., PUGH, C. W., SCHOFIELD, C. J. & RATCLIFFE, P. J. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43-54.
- ESCOTT, K. J., BEECH, J. S., HAGA, K. K., WILLIAMS, S. C., MELDRUM, B. S. & BATH, P. M. (1998). Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole and 7-nitro indazole, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 281-7.
- FARRELL, J., RE. (1998). Analysis of nuclear RNA. In *A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (ed. J. Farrell, RE), pp. 406-437. Academic Press, San Diego.
- FERNANDEZ-GOMEZ, F. J., HERNANDEZ, F., ARGANDONA, L., GALINDO, M. F., SEGURA, T. & JORDAN, J. (2008). [Pharmacology of neuroprotection in acute ischemic stroke]. *Rev Neurol* **47**, 253-60.
- FERRIERO, D. M. (2004). Neonatal brain injury. *N Engl J Med* **351**, 1985-95.
- FERRIERO, D. M. (2005). Protecting neurons. *Epilepsia* **46 Suppl 7**, 45-51.
- FISZER DE PLAZAS, S., VIAPIANO, M. S. & MITRIDATE DE NOVARA, A. (1995). Pentobarbital modulatory effect on GABA binding sites in developing chick optic lobe. *Int J Dev Neurosci* **13**, 783-9.
- FISZER DE PLAZAS, S. A. M. D. N., A. (1990). Effect of diazepam on the low affinity GABA binding sites at different developmental stages of the chick optic lobe. *Neurochem Int* **17**, 381-387.
- FREEMAN, B. A. & CRAPO, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412-26.
- FREEMAN, B. A., TOPOLOSKY, M. K. & CRAPO, J. D. (1982). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung homogenates. *Arch Biochem Biophys* **216**, 477-84.
- FRIDOVICH, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-80.
- GADELHA, F. R., THOMSON, L., FAGIAN, M. M., COSTA, A. D., RADI, R. & VERCESI, A. E. (1997). Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **345**, 243-50.
- GALKIN, A., HIGGS, A. & MONCADA, S. (2007). Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem* **43**, 29-42.
- GATTO, E. M., RIOBO, N. A., CARRERAS, M. C., SCHOPFER, F. J., PARGAMENT, G. A. & PODEROSO, J. J. (1999). Circulating plasma factors in Parkinson's disease enhance nitric oxide release of normal human neutrophils. *J Neurol Sci* **165**, 66-70.

- GHAFOURIFAR, P. & RICHTER, C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* **418**, 291-6.
- GHAFOURIFAR, P., SCHENK, U., KLEIN, S. D. & RICHTER, C. (1999). Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* **274**, 31185-8.
- GHOSH, D. K., ABU-SOUD, H. M. & STUEHR, D. J. (1995). Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase. *Biochemistry* **34**, 11316-20.
- GILL, M. B. & PEREZ-POLO, J. R. (2008). Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochem Res* **33**, 2379-89.
- GIULIVI, C. (2003). Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med* **34**, 397-408.
- GIULIVI, C., KATO, K. & COOPER, C. E. (2006). Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1225-31.
- GIULIVI, C., PODEROSO, J. J. & BOVERIS, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* **273**, 11038-43.
- GRAVIELLE, M. C., FLORES, V. & FISZER DE PLAZAS, S. (1992). The postnatal development of benzodiazepine receptor sites in the chick optic lobe is modulated by environmental lighting. *Neurochem Int* **20**, 257-62.
- GREEN, D. R. & REED, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.
- GREENBERG, M., BENDER, IP. (1997). Identification of newly transcribed RNA. In *Current protocols in Molecular Biology* (ed. Ausubel). John Wiley and Sons, New York.
- GU, G. J., LI, Y. P., PENG, Z. Y., XU, J. J., KANG, Z. M., XU, W. G., TAO, H. Y., OSTROWSKI, R. P., ZHANG, J. H. & SUN, X. J. (2008). Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol* **104**, 1185-91.
- HAGBERG, H. (2004). Mitochondrial impairment in the developing brain after hypoxia-ischemia. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 369-73.
- HAGEN, T., TAYLOR, C. T., LAM, F. & MONCADA, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* **302**, 1975-8.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**, 1-14.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. & CROSS, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* **119**, 598-620.
- HAMBURGER, V. (1960). *A Manual of Experimental Embryology*. The University of Chicago Press, Chicago.
- HAMRICK, S. E., MCQUILLEN, P. S., JIANG, X., MU, D., MADAN, A. & FERRIERO, D. M. (2005). A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection. *Neurosci Lett* **379**, 96-100.
- HAN, D., WILLIAMS, E. & CADENAS, E. (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* **353**, 411-6.
- HATTORI, I., TAKAGI, Y., NOZAKI, K., KONDO, N., BAI, J., NAKAMURA, H., HASHIMOTO, N. & YODOI, J. (2002). Hypoxia-ischemia induces thioredoxin expression and nitrotyrosine formation in new-born rat brain. *Redox Rep* **7**, 256-9.
- HAYASHI, T., SAKURAI, M., ITOYAMA, Y. & ABE, K. (1999). Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res* **832**, 159-63.
- HAYNES, V., ELFERING, S. L., SQUIRES, R. J., TRAAETH, N., SOLIEN, J., ETTL, A. & GIULIVI, C. (2003). Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology. *IUBMB Life* **55**, 599-603.
- HELENIUS, M., HANNINEN, M., LEHTINEN, S. K. & SALMINEN, A. (1996). Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem J* **318** (Pt 2), 603-8.
- HEWITSON, K. S., LIENARD, B. M., MCDONOUGH, M. A., CLIFTON, I. J., BUTLER, D., SOARES, A. S., OLDHAM, N. J., MCNEILL, L. A. & SCHOFIELD, C. J. (2007). Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J Biol Chem* **282**, 3293-301.
- HIRSILA, M., KOIVUNEN, P., GUNZLER, V., KIVIRIKKO, K. I. & MYLLYHARJU, J. (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* **278**, 30772-80.
- HOSSAIN, M. A. (2008). Hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: involvement of a novel neuronal molecule in neuronal cell death and potential target for neuroprotection. *Int J Dev Neurosci* **26**, 93-101.
- HU, B. R., KURIHARA, J. & WIELOCH, T. (1995). Persistent translocation and inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the crude synaptosomal fraction of the vulnerable hippocampus following hypoglycemia. *J Neurochem* **64**, 1361-9.
- HU, C. J., IYER, S., SATAUR, A., COVELLO, K. L., CHODOSH, L. A. & SIMON, M. C. (2006). Differential regulation of the transcriptional

- activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol* **26**, 3514-26.
- HUBER, G. C., CROSBY, E. C. (1933). A phylogenetic consideration of the optic tectum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **19**, 15-22.
- IGNARRO, L. J. (1989). Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J* **3**, 31-6.
- IKEDA, Y. & LONG, D. M. (1990). The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* **27**, 1-11.
- IKONOMIDOU, C., STEFOVSKA, V. & TURSKI, L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12885-90.
- INOUE, S. & KAWANISHI, S. (1995). Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* **371**, 86-8.
- ISHIDA, A., TRESCHER, W. H., LANGE, M. S. & JOHNSTON, M. V. (2001). Prolonged suppression of brain nitric oxide synthase activity by 7-nitroindazole protects against cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Brain Dev* **23**, 349-54.
- IVAN, M., HABERBERGER, T., GERVASI, D. C., MICHELSON, K. S., GUNZLER, V., KONDO, K., YANG, H., SOROKINA, I., CONAWAY, R. C., CONAWAY, J. W. & KAELIN, W. G., JR. (2002). Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13459-64.
- JACKSON, G. R., MORGAN, B. C., WERRBACH-PEREZ, K. & PEREZ-POLO, J. R. (1991). Antioxidant effect of retinoic acid on PC12 rat pheochromocytoma. *Int J Dev Neurosci* **9**, 161-70.
- JACKSON, G. R., WERRBACH-PEREZ, K. & PEREZ-POLO, J. R. (1990). Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. II. A conditioning lesion paradigm. *J Neurosci Res* **25**, 369-74.
- JACOBSON, M. D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* **21**, 83-6.
- JANOFF, A. (1964). Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) during Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs. *Int Anesthesiol Clin* **2**, 251-69.
- JEWELL, U. R., KVIETIKOVA, I., SCHEID, A., BAUER, C., WENGER, R. H. & GASSMANN, M. (2001). Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* **15**, 1312-4.
- JIANG, B. H., RUE, E., WANG, G. L., ROE, R. & SEMENZA, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 17771-8.

- JIANG, B. H., ZHENG, J. Z., LEUNG, S. W., ROE, R. & SEMENZA, G. L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* **272**, 19253-60.
- JIN, K. L., MAO, X. O. & GREENBERG, D. A. (2000a). Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10242-7.
- JIN, K. L., MAO, X. O., NAGAYAMA, T., GOLDSMITH, P. C. & GREENBERG, D. A. (2000b). Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* **99**, 577-85.
- JOHNSTON, M. V. (1997). Hypoxic and ischemic disorders of infants and children. Lecture for 38th meeting of Japanese Society of Child Neurology, Tokyo, Japan, July 1996. *Brain Dev* **19**, 235-9.
- JOHNSTON, M. V. (2001). Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **7**, 229-34.
- JONES, N. M. & BERGERON, M. (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1105-14.
- JONES, N. M. & BERGERON, M. (2004). Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling. *J Neurochem* **89**, 157-67.
- KAELIN, W. G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* **74**, 115-28.
- KAELIN, W. G., JR. & RATCLIFFE, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393-402.
- KANAI, A. J., PEARCE, L. L., CLEMENS, P. R., BIRDER, L. A., VANBIBBER, M. M., CHOI, S. Y., DE GROAT, W. C. & PETERSON, J. (2001). Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14126-31.
- KASAI, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med* **33**, 450-6.
- KATAOKA, A., KUBOTA, M., WAKAZONO, Y., OKUDA, A., BESSHO, R., LIN, Y. W., USAMI, I., AKIYAMA, Y. & FURUSHO, K. (1995). Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or non-apoptotic cell death induced by calcium ionophore. *FEBS Lett* **364**, 264-7.
- KERMER, P., KLOCKER, N. & BAHR, M. (1999). Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell Tissue Res* **298**, 383-95.

- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- KIETZMANN, T., KNABE, W. & SCHMIDT-KASTNER, R. (2001). Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**, 170-8.
- KIM, J. S. & SHUKLA, S. D. (2006). Acute in vivo effect of ethanol (binge drinking) on histone H3 modifications in rat tissues. *Alcohol Alcohol* **41**, 126-32.
- KIM, T. A., LIM, J., OTA, S., RAJA, S., ROGERS, R., RIVNAY, B., AVRAHAM, H. & AVRAHAM, S. (1998). NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J Cell Biol* **141**, 553-66.
- KIRINO, T. (2002). Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1283-96.
- KIRINO, T., TAMURA, A. & SANO, K. (1984). Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* **64**, 139-47.
- KITAGAWA, K., MATSUMOTO, M., TAGAYA, M., HATA, R., UEDA, H., NIINOBE, M., HANDA, N., FUKUNAGA, R., KIMURA, K., MIKOSHIBA, K. & ET AL. (1990). 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* **528**, 21-4.
- KNOWLES, H. J., MOLE, D. R., RATCLIFFE, P. J. & HARRIS, A. L. (2006). Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1. *Cancer Res* **66**, 2600-7.
- KNOWLES, H. J., RAVAL, R. R., HARRIS, A. L. & RATCLIFFE, P. J. (2003). Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* **63**, 1764-8.
- KNOWLES, R. G. & SALTER, M. (1998). Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation. *Methods Mol Biol* **100**, 67-73.
- KOBZIK, L., STRINGER, B., BALLIGAND, J. L., REID, M. B. & STAMLER, J. S. (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* **211**, 375-81.
- KOECK, T., FU, X., HAZEN, S. L., CRABB, J. W., STUEHR, D. J. & AULAK, K. S. (2004). Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 27257-62.
- KOISTINAHO, J. & HOKFELT, T. (1997). Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* **8**, i-viii.

- KOIVUNEN, P., HIRSILA, M., KIVIRIKKO, K. I. & MYLLYHARJU, J. (2006). The length of peptide substrates has a marked effect on hydroxylation by the hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* **281**, 28712-20.
- KONDO, T., REAUME, A. G., HUANG, T. T., MURAKAMI, K., CARLSON, E., CHEN, S., SCOTT, R. W., EPSTEIN, C. J. & CHAN, P. H. (1997). Edema formation exacerbates neurological and histological outcomes after focal cerebral ischemia in CuZn-superoxide dismutase gene knockout mutant mice. *Acta Neurochir Suppl* **70**, 62-4.
- KONTOS, H. A. (1985). George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* **57**, 508-16.
- KOZUKA, M., SMITH, M. L. & SIESJO, B. K. (1989). Preischemic hyperglycemia enhances postischemic depression of cerebral metabolic rate. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**, 478-90.
- LACZA, Z., PUSKAR, M., FIGUEROA, J. P., ZHANG, J., RAJAPAKSE, N. & BUSIJA, D. W. (2001). Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* **31**, 1609-15.
- LAFUENTE, J. V., BULNES, S., MITRE, B. & RIESE, H. H. (2002). Role of VEGF in an experimental model of cortical micronecrosis. *Amino Acids* **23**, 241-5.
- LAMANNA, J. C. (2007). Hypoxia in the central nervous system. *Essays Biochem* **43**, 139-51.
- LAUGHNER, E., TAGHAVI, P., CHILES, K., MAHON, P. C. & SEMENZA, G. L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* **21**, 3995-4004.
- LAVAIL, J. H. & COWAN, W. M. (1971). The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res* **28**, 391-419.
- LEE, J. M., ZIPFEL, G. J. & CHOI, D. W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**, A7-14.
- LEIST, M. & NICOTERA, P. (1998). Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* **239**, 183-201.
- LI, H., ZHU, H., XU, C. J. & YUAN, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- LI, J. Y., FURUICHI, Y., MATSUOKA, N., MUTOH, S. & YANAGIHARA, T. (2006). Tacrolimus (FK506) attenuates biphasic cytochrome c release and Bad phosphorylation following transient cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* **142**, 789-97.
- LI, Y., ZHOU, C., CALVERT, J. W., COLOHAN, A. R. & ZHANG, J. H. (2005). Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1

- alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol* **191**, 198-210.
- LIPTON, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **79**, 1431-568.
- LIU, C. L., SIESJO, B. K. & HU, B. R. (2004). Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience* **127**, 113-23.
- LIU, J., GINIS, I., SPATZ, M. & HALLENBECK, J. M. (2000). Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C144-53.
- LIU, J., NARASIMHAN, P., YU, F. & CHAN, P. H. (2005). Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke* **36**, 1264-9.
- LIU, Y. V., BAEK, J. H., ZHANG, H., DIEZ, R., COLE, R. N. & SEMENZA, G. L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* **25**, 207-17.
- LOELIGER, M., WATSON, C. S., REYNOLDS, J. D., PENNING, D. H., HARDING, R., BOCKING, A. D. & REES, S. M. (2003). Extracellular glutamate levels and neuropathology in cerebral white matter following repeated umbilical cord occlusion in the near term fetal sheep. *Neuroscience* **116**, 705-14.
- LOPEZ-FIGUEROA, M. O., CAAMANO, C., MORANO, M. I., RONN, L. C., AKIL, H. & WATSON, S. J. (2000). Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 129-33.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- LUCAS, D. R. & NEWHOUSE, J. P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* **58**, 193-201.
- MAKINO, Y., UENISHI, R., OKAMOTO, K., ISOE, T., HOSONO, O., TANAKA, H., KANOPKA, A., POELLINGER, L., HANEDA, M. & MORIMOTO, C. (2007). Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem* **282**, 14073-82.
- MARKESBERY, W. R. & LOVELL, M. A. (2007). Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **64**, 954-6.
- MARTIN, L. J., AL-ABDULLA, N. A., BRAMBRINK, A. M., KIRSCH, J. R., SIEBER, F. E. & PORTERA-CAILLIAU, C. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target

- deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* **46**, 281-309.
- MARTIN, L. J., BRAMBRINK, A., KOEHLER, R. C. & TRAYSTMAN, R. J. (1997). Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J Comp Neurol* **377**, 262-85.
- MARTIN, R. L., LLOYD, H. G. & COWAN, A. I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* **17**, 251-7.
- MARTIN, S. S., PEREZ-POLO, J. R., NOPPENS, K. M. & GRAFE, M. R. (2005). Biphasic changes in the levels of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and caspase 3 in the immature brain following hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci* **23**, 673-86.
- MATTSON, M. P., CULMSEE, C. & YU, Z. F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* **301**, 173-87.
- MAXWELL, P. & SALNIKOW, K. (2004). HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* **3**, 29-35.
- MAXWELL, P. H., PUGH, C. W. & RATCLIFFE, P. J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 293-9.
- MAYER, B., JOHN, M. & BOHME, E. (1990). Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* **277**, 215-9.
- MAYER, B., SCHMIDT, K., HUMBERT, P. & BOHME, E. (1989). Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 678-85.
- MCDONOUGH, M. A., LI, V., FLASHMAN, E., CHOWDHURY, R., MOHR, C., LIENARD, B. M., ZONDLO, J., OLDHAM, N. J., CLIFTON, I. J., LEWIS, J., MCNEILL, L. A., KURZEJA, R. J., HEWITSON, K. S., YANG, E., JORDAN, S., SYED, R. S. & SCHOFIELD, C. J. (2006). Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9814-9.
- MCGEE-RUSSELL, S. M., BROWN, A. W. & BRIERLEY, J. B. (1970). A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res* **20**, 193-200.
- MCMILLAN, K. & MASTERS, B. S. (1995). Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* **34**, 3686-93.
- MCNEILL, L. A., HEWITSON, K. S., GLEADLE, J. M., HORSFALL, L. E., OLDHAM, N. J., MAXWELL, P. H., PUGH, C. W., RATCLIFFE, P. J. & SCHOFIELD, C. J.

- (2002). The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 1547-50.
- METZEN, E., BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U., STENGEL, P., MARXSEN, J. H., STOLZE, I., KLINGER, M., HUANG, W. Q., WOTZLAW, C., HELLWIG-BURGEL, T., JELKMANN, W., ACKER, H. & FANDREY, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* **116**, 1319-26.
- MEY, J. & THANOS, S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 343-79.
- MIES, G., PASCHEN, W. & HOSSMANN, K. A. (1990). Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**, 638-45.
- MILKIEWICZ, M., PUGH, C. W. & EGGINTON, S. (2004). Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *J Physiol* **560**, 21-6.
- MISHRA, O. P. & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. (2006). Effect of neuronal nitric oxide synthase inhibition on caspase-9 activity during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurosci Lett* **401**, 81-5.
- MURAKAMI, K., KONDO, T., KAWASE, M., LI, Y., SATO, S., CHEN, S. F. & CHAN, P. H. (1998). Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* **18**, 205-13.
- MURRAY, J., TAYLOR, S. W., ZHANG, B., GHOSH, S. S. & CAPALDI, R. A. (2003). Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* **278**, 37223-30.
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B. & REIMER, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-36.
- MUZIO, M., CHINNAIYAN, A. M., KISCHKEL, F. C., O'ROURKE, K., SHEVCHENKO, A., NI, J., SCAFFIDI, C., BRETZ, J. D., ZHANG, M., GENTZ, R., MANN, M., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. & DIXIT, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-27.
- NAKAJIMA, W., ISHIDA, A., LANGE, M. S., GABRIELSON, K. L., WILSON, M. A., MARTIN, L. J., BLUE, M. E. & JOHNSTON, M. V. (2000). Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* **20**, 7994-8004.
- NATHAN, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* **6**, 3051-64.

- NEWTON, A. C. (2003). Measuring the interaction of protein kinase C with membranes: an introduction. *Methods Mol Biol* **233**, 89-92.
- NICOTERA, P., BONFOCO, E. & BRUNE, B. (1995). Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol* **5**, 411-20.
- NIETFELD, J. J. & KEMP, A. (1981). The function of ascorbate with respect to prolyl 4-hydroxylase activity. *Biochim Biophys Acta* **657**, 159-67.
- NISHIMURA, M., SUGINO, T., NOZAKI, K., TAKAGI, Y., HATTORI, I., HAYASHI, J., HASHIMOTO, N., MORIGUCHI, T. & NISHIDA, E. (2003). Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1052-9.
- NOBLE, R. (1943). The development of resistance by rats and guinea pigs to amount of trauma usually fatal. *American Journal of Physiology* **138**, 346-356.
- NORTHINGTON, F. J., FERRIERO, D. M., FLOCK, D. L. & MARTIN, L. J. (2001a). Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* **21**, 1931-8.
- NORTHINGTON, F. J., FERRIERO, D. M., GRAHAM, E. M., TRAYSTMAN, R. J. & MARTIN, L. J. (2001b). Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol Dis* **8**, 207-19.
- NUMAGAMI, Y., ZUBROW, A. B., MISHRA, O. P. & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. (1997). Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *J Neurochem* **69**, 1542-7.
- OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-8.
- OHTAKI, H., TAKEDA, T., DOHI, K., YOFU, S., NAKAMACHI, T., SATOH, K., HIRAZUMI, Y., MIYAOKA, H., MATSUNAGA, M. & SHIODA, S. (2007). Increased mitochondrial DNA oxidative damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Res* **58**, 349-55.
- OLNEY, J. W. (1971). Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* **30**, 75-90.
- ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. & NICOTERA, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 552-65.
- PAN, Z. & PEREZ-POLO, R. (1993). Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J Neurochem* **61**, 1713-21.
- PEARCE, L. L., KANAI, A. J., EPPERLY, M. W. & PETERSON, J. (2005). Nitrosative stress results in irreversible inhibition of

- purified mitochondrial complexes I and III without modification of cofactors. *Nitric Oxide* **13**, 254-63.
- PENG, Z., REN, P., KANG, Z., DU, J., LIAN, Q., LIU, Y., ZHANG, J. H. & SUN, X. (2008). Up-regulated HIF-1 α is involved in the hypoxic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Res* **1212**, 71-8.
- PERALTA, J. G., FINOCCHIETTO, P. V., CONVERSO, D., SCHOPFER, F., CARRERAS, M. C. & PODEROSO, J. J. (2003). Modulation of mitochondrial nitric oxide synthase and energy expenditure in rats during cold acclimation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H2375-83.
- PETITO, C. K. & PULSINELLI, W. A. (1984). Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**, 141-53.
- PETITO, C. K., TORRES-MUNOZ, J., ROBERTS, B., OLARTE, J. P., NOWAK, T. S., JR. & PULSINELLI, W. A. (1997). DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 967-76.
- PETTMANN, B. & HENDERSON, C. E. (1998). Neuronal cell death. *Neuron* **20**, 633-47.
- PHILLIS, J. W., SMITH-BARBOUR, M. & O'REGAN, M. H. (1996). Changes in extracellular amino acid neurotransmitters and purines during and following ischemias of different durations in the rat cerebral cortex. *Neurochem Int* **29**, 115-20.
- PODEROSO, J. J., BOVERIS, A. & CADENAS, E. (2000). Mitochondrial oxidative stress: a self-propagating process with implications for signaling cascades. *Biofactors* **11**, 43-5.
- POZO DEVOTO, V. M., CHAVEZ, J. C. & FISZER DE PLAZAS, S. (2006). Acute hypoxia and programmed cell death in developing CNS: Differential vulnerability of chick optic tectum layers. *Neuroscience* **142**, 645-53.
- PUGH, C. W., O'ROURKE, J. F., NAGAO, M., GLEADLE, J. M. & RATCLIFFE, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **272**, 11205-14.
- PUKA-SUNDEVALL, M., GAJKOWSKA, B., CHOLEWINSKI, M., BLOMGREN, K., LAZAREWICZ, J. W. & HAGBERG, H. (2000a). Subcellular distribution of calcium and ultrastructural changes after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats. *Brain Res Dev Brain Res* **125**, 31-41.
- PUKA-SUNDEVALL, M., WALLIN, C., GILLAND, E., HALLIN, U., WANG, X., SANDBERG, M., KARLSSON, J., BLOMGREN, K. & HAGBERG, H. (2000b). Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res Dev Brain Res* **125**, 43-50.
- RADI, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4003-8.

- RADI, R., RODRIGUEZ, M., CASTRO, L. & TELLERI, R. (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **308**, 89-95.
- RAHN, H., PAGANELLI, C. V. & AR, A. (1987). Pores and gas exchange of avian eggs: a review. *J Exp Zool Suppl* **1**, 165-72.
- RAMI, A., JANSEN, S., GIESSER, I. & WINCKLER, J. (2003). Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localisation. *Neurochem Int* **43**, 211-23.
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1911). Le lobe optique des vertebres inferieurs, toit optique des oiseaux. In *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des Vertebres* (ed. S. Ramón y Cajal), pp. 196-212, Madrid.
- RAN, R., XU, H., LU, A., BERNAUDIN, M. & SHARP, F. R. (2005). Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev Neurosci* **27**, 87-92.
- RAO, R. V., CASTRO-OBREGON, S., FRANKOWSKI, H., SCHULER, M., STOKA, V., DEL RIO, G., BREDESEN, D. E. & ELLERBY, H. M. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* **277**, 21836-42.
- RATAN, R. R., MURPHY, T. H. & BARABAN, J. M. (1994). Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *J Neurosci* **14**, 4385-92.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-12.
- RHEE, S. G. (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**, 1882-3.
- RIBATTI, D., NICO, B. & BERTOSSI, M. (1993). The development of the blood-brain barrier in the chick. Studies with evans blue and horseradish peroxidase. *Ann Anat* **175**, 85-8.
- RICHARDS, M. K. & MARLETTA, M. A. (1994). Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry* **33**, 14723-32.
- RIOBO, N. A., CLEMENTI, E., MELANI, M., BOVERIS, A., CADENAS, E., MONCADA, S. & PODEROSO, J. J. (2001). Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* **359**, 139-45.
- RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G. & DE ROBERTIS, E. D. (1962). Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in the rat brain. II. Subcellular localization of monoamine oxidase and succinate dehydrogenase. *J Neurochem* **9**, 503-8.
- RODRIGUEZ GIL, D. J., VIAPIANO, M. S. & FISZER DE PLAZAS, S. (2000). Acute hypoxic hypoxia transiently reduces GABA(A) binding site number in developing chick optic lobe. *Brain Res Dev Brain Res* **124**, 67-72.

- RUSCHER, K., FREYER, D., KARSCH, M., ISAEV, N., MEGOW, D., SAWITZKI, B., PRILLER, J., DIRNAGL, U. & MEISEL, A. (2002). Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* **22**, 10291-301.
- RUSCHER, K., ISAEV, N., TRENDELENBURG, G., WEIH, M., IURATO, L., MEISEL, A. & DIRNAGL, U. (1998). Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* **254**, 117-20.
- RUSSELL, J. C., SZUFLITA, N., KHATRI, R., LATERRA, J. & HOSSAIN, M. A. (2006). Transgenic expression of human FGF-1 protects against hypoxic-ischemic injury in perinatal brain by intervening at caspase-XIAP signaling cascades. *Neurobiol Dis* **22**, 677-90.
- SAITO, A., HAYASHI, T., OKUNO, S., NISHI, T. & CHAN, P. H. (2004). Oxidative stress affects the integrin-linked kinase signaling pathway after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 2560-5.
- SAKANAKA, M., WEN, T. C., MATSUDA, S., MASUDA, S., MORISHITA, E., NAGAO, M. & SASAKI, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4635-40.
- SAMPATH, D., JACKSON, G. R., WERRBACH-PEREZ, K. & PEREZ-POLO, J. R. (1994). Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J Neurochem* **62**, 2476-9.
- SCHILD, L., REINHECKEL, T., REISER, M., HORN, T. F., WOLF, G. & AUGUSTIN, W. (2003). Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *Faseb J* **17**, 2194-201.
- SCHMID, T., ZHOU, J. & BRUNE, B. (2004). HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* **8**, 423-31.
- SCHOFIELD, C. J. & RATCLIFFE, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 343-54.
- SCHULZ, J. B., WELLER, M. & KLOCKGETHER, T. (1996). Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci* **16**, 4696-706.
- SCHURR, A., REID, K. H., TSENG, M. T., WEST, C. & RIGOR, B. M. (1986). Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res* **374**, 244-8.
- SEGAL, A. W. & SHATWELL, K. P. (1997). The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci* **832**, 215-22.
- SEMENZA, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 588-94.

- SEMENZA, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* **59**, 47-53.
- SEMENZA, G. L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* **405**, 1-9.
- SEMENZA, G. L. & WANG, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-54.
- SHARP, F. R., LU, A., TANG, Y. & MILLHORN, D. E. (2000). Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1011-32.
- SHARP, F. R., RAN, R., LU, A., TANG, Y., STRAUSS, K. I., GLASS, T., ARDIZZONE, T. & BERNAUDIN, M. (2004). Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx* **1**, 26-35.
- SHPARGEL, K. B., JALABI, W., JIN, Y., DADABAYEV, A., PENN, M. S. & TRAPP, B. D. (2008). Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleve Clin J Med* **75 Suppl 2**, S77-82.
- SIDDIQ, A., AYOUB, I. A., CHAVEZ, J. C., AMINOVA, L., SHAH, S., LAMANNA, J. C., PATTON, S. M., CONNOR, J. R., CHERNY, R. A., VOLITAKIS, I., BUSH, A. I., LANGSETMO, I., SEELEY, T., GUNZLER, V. & RATAN, R. R. (2005). Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system. *J Biol Chem* **280**, 41732-43.
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**, 213-9.
- SIESJO, B. K. (1978). Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J Neural Transm Suppl*, 17-22.
- SIESJO, B. K. (1981). Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**, 155-85.
- SILVER, I. A., DEAS, J. & ERECINSKA, M. (1997). Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience* **78**, 589-601.
- SLIVKA, A. C., G. (1985). Hydroxyl Radical Attack on Dopamine. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 15466-15472.
- SOLIEN, J., HAYNES, V. & GIULIVI, C. (2005). Differential requirements of calcium for oxoglutarate dehydrogenase and mitochondrial nitric-oxide synthase under hypoxia: impact on the regulation of mitochondrial oxygen consumption. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **142**, 111-7.
- SOWTER, H. M., RATCLIFFE, P. J., WATSON, P., GREENBERG, A. H. & HARRIS, A. L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the

- cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* **61**, 6669-73.
- SQUIER, M. K., MILLER, A. C., MALKINSON, A. M. & COHEN, J. J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* **159**, 229-37.
- ST-PIERRE, J., BUCKINGHAM, J. A., ROEBUCK, S. J. & BRAND, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**, 44784-90.
- STEEN, P. A., MILDE, J. H. & MICHENFELDER, J. D. (1978). Cerebral metabolic and vascular effects of barbiturate therapy following complete global ischemia. *J Neurochem* **31**, 1317-24.
- STEFANIS, L. (2005). Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* **11**, 50-62.
- STEIGER, H. J. & HANGGI, D. (2007). Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. *Acta Neurochir (Wien)* **149**, 1-10.
- SUGAWARA, T., FUJIMURA, M., NOSHITA, N., KIM, G. W., SAITO, A., HAYASHI, T., NARASIMHAN, P., MAIER, C. M. & CHAN, P. H. (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* **1**, 17-25.
- SUN, F. Y. & GUO, X. (2005). Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res* **79**, 180-4.
- SZABO, C. (1996). DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **21**, 855-69.
- SZABO, C. & SALZMAN, A. L. (1995). Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immunostimulated J774.2 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 739-43.
- TAGAMI, M., IKEDA, K., YAMAGATA, K., NARA, Y., FUJINO, H., KUBOTA, A., NUMANO, F. & YAMORI, Y. (1999). Vitamin E prevents apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* **79**, 609-15.
- TAIE, S., ONO, J., IWANAGA, Y., TOMITA, S., ASAGA, T., CHUJO, K. & UEKI, M. (2009). Hypoxia-inducible factor-1alpha has a key role in hypoxic preconditioning. *J Clin Neurosci* **16**, 1056-60.
- TAOUFIK, E. & PROBERT, L. (2008). Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des* **14**, 3565-73.
- TAZAWA, H. (1980). Adverse effect of failure to turn the avian egg on the embryo oxygen exchange. *Respir Physiol* **41**, 137-42.

- THIERSCH, M., LANGE, C., JOLY, S., HEYNEN, S., LE, Y. Z., SAMARDZIJA, M. & GRIMM, C. (2009). Retinal neuroprotection by hypoxic preconditioning is independent of hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in photoreceptors. *Eur J Neurosci* **29**, 2291-302.
- TROSTCHANSKY, A. & RUBBO, H. (2007). Lipid nitration and formation of lipid-protein adducts: biological insights. *Amino Acids* **32**, 517-22.
- TURRENS, J. F. & BOVERIS, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **191**, 421-7.
- VACOTTO, M., PAZ, D. & DE PLAZAS, S. F. (2006). Hypoxia-induced cell death and activation of pro- and anti-apoptotic proteins in developing chick optic lobe. *Neurochem Res* **31**, 1003-9.
- WAGNER-AMOS, K. & SEYMOUR, R. S. (2002). Effect of regional changes to shell conductance on oxygen consumption and growth of chicken embryos. *Respir Physiol* **129**, 385-95.
- WAGNER, K. R., KLEINHOLZ, M. & MYERS, R. E. (1989). Delayed neurologic deterioration following anoxia: brain mitochondrial and metabolic correlates. *J Neurochem* **52**, 1407-17.
- WANG, G. L., JIANG, B. H., RUE, E. A. & SEMENZA, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-4.
- WANG, Y., GALVAN, V., GOROSTIZA, O., ATAIE, M., JIN, K. & GREENBERG, D. A. (2006). Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorimotor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* **1115**, 186-93.
- WARNECKE, C., GRIETHE, W., WEIDEMANN, A., JURGENSEN, J. S., WILLAM, C., BACHMANN, S., IVASHCHENKO, Y., WAGNER, I., FREI, U., WIESENER, M. & ECKARDT, K. U. (2003). Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J* **17**, 1186-8.
- WEIDEMANN, A. & JOHNSON, R. S. (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* **15**, 621-7.
- WEISBROT-LEFKOWITZ, M., REUHL, K., PERRY, B., CHAN, P. H., INOUE, M. & MIROCHNITCHENKO, O. (1998). Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain Res Mol Brain Res* **53**, 333-8.
- WHEELER, T. T., BROADHURST, M. K., RAJAN, G. H. & WILKINS, R. J. (1997). Differences in the abundance of nuclear proteins in the bovine mammary gland throughout the lactation and gestation cycles. *J Dairy Sci* **80**, 2011-9.
- WIENER, C. M., BOOTH, G. & SEMENZA, G. L. (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 485-8.

- WOLVETANG, E. J., JOHNSON, K. L., KRAUER, K., RALPH, S. J. & LINNANE, A. W. (1994). Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett* **339**, 40-4.
- XIA, Y., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., SNYDER, S. H. & ZWEIER, J. L. (1996). Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6770-4.
- YAMAMOTO, K., HAYAKAWA, T., MOGAMI, H., AKAI, F. & YANAGIHARA, T. (1990). Ultrastructural investigation of the CA1 region of the hippocampus after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* **80**, 487-92.
- YAMAMOTO, T., MARUYAMA, W., KATO, Y., YI, H., SHAMOTO-NAGAI, M., TANAKA, M., SATO, Y. & NAOI, M. (2002). Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm* **109**, 1-13.
- YOUNG, D., LAWLOR, P. A., LEONE, P., DRAGUNOW, M. & DURING, M. J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* **5**, 448-53.
- YU, Z. F., BRUCE-KELLER, A. J., GOODMAN, Y. & MATTSON, M. P. (1998). Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res* **53**, 613-25.
- YUASA, I., MA, N., MATSUBARA, H., FUKUI, Y. & UJI, Y. (2008). Inducible nitric oxide synthase mediates retinal DNA damage in Goto-Kakizaki rat retina. *Jpn J Ophthalmol* **52**, 314-22.
- ZAMAN, K., RYU, H., HALL, D., O'DONOVAN, K., LIN, K. I., MILLER, M. P., MARQUIS, J. C., BARABAN, J. M., SEMENZA, G. L. & RATAN, R. R. (1999). Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* **19**, 9821-30.
- ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A., MARCHETTI, P., HIRSCH, T., GOMEZ-MONTERREY, I., CASTEDO, M. & KROEMER, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* **183**, 1533-44.
- ZAOBORNÝJ, T., VALDEZ, L. B., LA PADULA, P., COSTA, L. E. & BOVERIS, A. (2005). Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol* **98**, 2370-5.
- ZHANG, H., GAO, P., FUKUDA, R., KUMAR, G., KRISHNAMACHARY, B., ZELLER, K. I., DANG, C. V. & SEMENZA, G. L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* **11**, 407-20.

- ZHU, C., WANG, X., HUANG, Z., QIU, L., XU, F., VAHSEN, N., NILSSON, M., ERIKSSON, P. S., HAGBERG, H., CULMSEE, C., PLESNILA, N., KROEMER, G. & BLOMGREN, K. (2007). Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* **14**, 775-84.
- ZHU, C., WANG, X., QIU, L., PEETERS-SCHOLTE, C., HAGBERG, H. & BLOMGREN, K. (2004). Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem* **90**, 462-71.
- ZORATTI, M. & SZABO, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 139-76.
- ZOU, H., HENZEL, W. J., LIU, X., LUTSCHG, A. & WANG, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-13.