

Tesis Doctoral

Estudio bioquímico y estructural de la muerte celular propia del desarrollo y la inducida por un evento hipóxico en el SNC durante el desarrollo

Pozo Devoto, Victorio Martín

2012

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:

Pozo Devoto, Victorio Martín. (2012). Estudio bioquímico y estructural de la muerte celular propia del desarrollo y la inducida por un evento hipóxico en el SNC durante el desarrollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pozo Devoto, Victorio Martín. "Estudio bioquímico y estructural de la muerte celular propia del desarrollo y la inducida por un evento hipóxico en el SNC durante el desarrollo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio bioquímico y estructural de la muerte celular propia
del desarrollo y la inducida por un evento hipóxico
en el SNC durante el desarrollo**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Ciencias Biológicas

Victorio Martín Pozo Devoto

Director de tesis: Dra. Sara Fiszer de Plazas

Consejero de Estudios: Dr. Osvaldo Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De
Robertis", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012.

Estudio bioquímico y estructural de la muerte celular propia del desarrollo y la inducida por un evento hipóxico en el SNC durante el desarrollo

Resumen

Los eventos de hipoxia tienen consecuencias nocivas que se manifiestan de múltiples formas en el SNC durante el desarrollo. El presente estudio analiza los daños generados en el tectum óptico por una hipoxia aguda normobárica sobre embriones de aves. Encontramos que tanto la vulnerabilidad diferencial como el retraso temporal de la muerte celular son dos fenómenos producto del evento hipóxico. Dicho daño se caracteriza por ser independiente de aferencias de la retina y por presentar una muerte celular mediada por la vía apoptótica intrínseca. Esto fue determinado ultraestructuralmente y bioquímicamente mediante la inmunomarcación de proteínas involucradas en la cascada apoptótica. Por otro lado, se determinó que la muerte celular propia del desarrollo presenta un perfil morfológico y bioquímico apoptótico similar al observado en condiciones de hipoxia. Frente a la evidente semejanza entre estos dos procesos de muerte postulamos que la hipoxia en nuestro modelo genera un desequilibrio transitorio en la homeostasis del tectum óptico, incrementando la muerte celular propia del desarrollo.

Además, observamos una disminución transitoria en la actividad de la vía de supervivencia PI3K/Akt durante el evento hipóxico. Los resultados preliminares derivados de la administración de drogas que logran estimular esta vía de supervivencia en cultivos de embriones *ex ovo*, sugieren un rol ejecutor de esta vía en la muerte hipóxica.

Por último, hemos determinado que la administración de estradiol posterior al evento hipóxico presenta efectos neuroprotectores a través de la unión a receptores y posiblemente mediante acciones no genómicas a través de PI3K/Akt.

Palabras clave: hipoxia, apoptosis, desarrollo, SNC, tectum óptico de aves, neuroprotección.

Morphological and biochemical studies on developmental cell death and hypoxia induced cell death in developing CNS

Abstract

Hypoxic insults during CNS development have multiple deleterious outcomes. In the present thesis, we analyze the cell death evolution in the chick optic tectum layers after an acute normobaric hypoxia, showing two important features: differential vulnerability of optic tectum layers and delayed neuronal death. Our results show that hypoxic cell death is independent of retinal inputs and we found that this cell death is mediated by the apoptotic intrinsic pathway. This was determined by ultrastructural analysis and immunofluorescence against apoptotic pathway proteins. With minor differences, developmental cell death itself presents a morphological and biochemical apoptotic profile. The similarity between these two cell death processes lead us to postulate that hypoxia generates a temporary imbalance in the homeostasis of the optic tectum, increasing developmental cell death.

In addition, we observed a transient decrease in the activity of the PI3K/Akt survival pathway during the hypoxic event, suggesting an important role as executor of hypoxic cell death. This is supported by the results obtained from the administration of drugs in a model of cultured *ex ovo* embryos, where the stimulation of pAkt levels reverts the hypoxic cell death.

Finally, we have determined that administration of estradiol after the hypoxic event exerts neuroprotective effects through estrogen-estrogen receptor interaction and possibly through nongenomic actions via PI3K/Akt pathway.

Keywords: hypoxia, apoptosis, development, CNS, avian optic tectum, neuroprotection.

Agradecimientos

- A la Dra. Sara Fiszer, por darme la oportunidad de iniciarme en la ciencia y por enseñarme a confiar en mis propias decisiones y conocimientos.
- A Marina, porque me inició en el laboratorio, y porque realmente la paso muy bien cada vez que nos encontramos.
- A Eugenia, por la ayuda a disposición en todo momento, por compartir durante un tiempo la difícil tarea de que los experimentos den.
- A Antonela, por compartir el laboratorio, los tp's de histo, y la risa.
- A Sebastián, por haber compartido tanto tiempo y trabajos de laboratorio.
- A Diego Rodríguez Gil, por guiarme en mis primeros pasos en la investigación.
- A Alba, por la buena onda y las anécdotas en el almuerzo.
- A Laura, por compartir una infinidad de cosas desde hace un montón de tiempo: congresos, experimentos, clases, fumar en el pasillo...
- A Paula, porque hace que algunas cosas sean más fáciles de lo que parecen.
- A Trini, por la buena onda en los tp's de histo, y por darme una mano invaluable cuando hasta los segundos contaban.
- A Tamara, por las sesiones de reiki, pero más importante por el afecto incondicional.
- A Jimena, por darme una mano en ciertos trabajos.
- A Diego, por mostrarme el camino que conduce a no perder nunca la calma!
- A Sabrina, por la buena onda y la charla de pasillo.
- A Margarita, por haber aguantado mis idas y vueltas en el infinito mundo de la microscopia electrónica.
- A Mariana, también por ayudarme con la microscopia electrónica.
- Al Dr. Vladimir Flores por compartir la pasión por el tectum óptico.
- A la Dra. Alicia Brusco, por darme la oportunidad de seguir dedicándome exclusivamente a la investigación.
- A María Pavón, por el entusiasmo brindado por detrás de escena durante este proceso.
- A Alex, por que un amigo arquitecto también puede aportar al trabajo científico!

a mis viejos.

Abreviaturas	10
INTRODUCCION	13
I. Hipoxia-Isquemia	14
I.1. Hipoxia-Isquemia en humanos	14
I.2. Modelos experimentales	14
I.3. Daños en el SNC	16
I.3.1. Efectores	16
I.3.2. Vulnerabilidad diferencial	17
I.3.3. Retraso temporal del daño	17
I.3.4. Eventos puramente hipóxicos	18
I.3.5. Neuroprotección	18
II. Muerte celular	19
II.1. Tipos y clasificación	19
II.1.1. Según la morfología	19
II.1.2. Regulada o accidental	21
II.1.3. Muerte celular programada	21
II.1.4. Fisiológica o Patológica	22
II.2. Muerte celular propia del desarrollo	22
II.2.1. Fenotipos	22
II.2.2. Mecanismos efectores	22
II.2.2.1. Vía extrínseca	23
II.2.2.2. Vía Intrínseca	23
II.2.2.3. Caspasas	25
II.2.3. Mecanismos Disparadores	26
II.2.3.1. Vía PI3K/Akt	27
II.2.4. Causas	28
II.3. Muerte celular isquémica / hipóxica	29
II.3.1. Fenotipos	29
II.3.2. Mecanismos de daño	30
II.3.2.1. Comunes a la MCPD	30
II.3.2.2. Propios de la HI	30
III. Modelo Experimental: Tectum Óptico de Aves	33
III.1. Anatomía y función de la vía visual	33
III.2. Tectum Optico	34

III.2.1. Estructura y función	34
III.2.2. Citoarquitectura	35
III.2.3. Desarrollo	37
III.2.3.1. Estratificación del TO	37
III.2.3.2. Gliogénesis	38
III.2.3.3. Fibras aferentes	38
III.2.3.4. Barrera hematoencefálica	39
III.2.4. Día embrionario 12	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES & METODOS	43
I. Animales	44
II. Tratamiento hipóxico	44
III. Administración de drogas in ovo	44
IV. Técnica histológica	45
V. Tinción de Nissl	45
VI. Tinción de Hoechst	46
VII. Inmunomarcación	46
VII.1. Inmunofluorescencia	46
VII.2. Coinmunofluorescencia	46
VII.3. Inmunohistoquímica	46
VIII. Técnica de TUNEL	47
IX. Western Blot	47
IX.1. Obtención de fracción total	47
IX.2. Electroforesis y electrotransferencia	48
IX.3. Blotting y revelado	48
X. Microscopia electrónica	48
XI. Cultivo neuronal primario	49
XII. Eucleación	50
XIII. Cultivo ex ovo	51
XIII.1. Administración de drogas	53
XIII.1.1. Intravascular	54
XIII.1.2. Intratectal	54
XIII.2. Tratamiento hipóxico	55
XIV. Cuantificación celular	56
XV. Análisis estadístico	57

XVI. Programas	57
XVII. Anticuerpos e Insumos	57
RESULTADOS	59
I. Efectos de la Hipoxia sobre el TO	60
I.1. Estudios preliminares	60
I.1.1. Caracterización morfológica de núcleos	60
I.1.2. Caracterización de figuras anómalas	62
I.1.3. Cuantificación de figuras anómalas durante el desarrollo y luego de una hipoxia	63
I.2. Vulnerabilidad diferencial de las láminas del TO	65
I.3. Influencia de las aferencias de las CGR en la MCPD y la MCHx	69
II. Análisis de tipos celulares que podrían estar involucrados en la muerte celular	72
II.1. Distribución de GFAP en el DE14	72
III. Análisis morfológico comparativo entre MCPD y MCHx	73
III.1. Comparación morfológica y de marcación	73
III.2. Análisis ultraestructural	76
III.2.1. Estadio temprano de degeneración celular	76
III.2.2. Estadio medio de degeneración celular	78
III.2.3. Estadio avanzado de degeneración celular	80
IV. Vías ejecutoras involucradas en la MCPD y en la MCHx	84
IV.1. Vía intrínseca	84
IV.2. Vía extrínseca	86
V. Vías de supervivencia en la MCHx	87
V.1. PI3K / Akt	87
V.2. Estudio preliminar sobre la modulación de Akt	89
VI. Efectos neuroprotectores del estradiol post-hipoxia	94
DISCUSION	96
I. Daños hipóxicos sobre el TO	97
II. MCPD en el TO	100
III. Tipos celulares involucrados en la muerte celular	101

IV. Análisis morfológicos	102
V. Vías ejecutoras	105
VI. Rol de PI3K/Akt en la MCHx	106
VII. Neuroprotección	109
CONCLUSIONES	111
Bibliografía	115

Abreviaturas

ACV: accidente cerebro vascular

AIF: *apoptosis inducing factor* / factor inductor de apoptosis

Akt: (PKB) *protein kinase B* / proteína kinasa B

Apaf1: *apoptosis protease-activating factor-1* / factor de activación de proteasa apoptótica 1

ATP: nucleótido de adenosina trifosfato

BDNF: *brain derived neurotrophic factor* / factor neurotrófico derivado de cerebro

bpv(phen): bisperoxovandio (phen)

C'h-i-j': compartimento transitorio 'h-i-j'

CAD: caspase activated-DNAse / DNAsa activada por caspasa

CCT2/3: compartimento celular transitorio 2/3

CGR: células ganglionares de la retina

DAB: 3'3'-diaminobenzidina

DE: día embrionario

DGA: *developmental gradient axis* / eje del gradiente del desarrollo

EHI: encefalopatía derivada de hipoxia-isquemia

ERK: *extracellular signal-regulated kinases* / kinasa regulada por señalización extracelular

FADD: *Fas associated death domain* / dominio de muerte asociado a Fas

FasL: Fas ligand / ligando de Fas

GFAP: glial fibrillary acidic protein / proteína ácida glio-fibrilar

HI: hipoxia-isquemia

IAPs: *inhibitor of apoptosis proteins* / proteínas inhibidoras de la apoptosis

ICAD: *CAD inhibitor* / inhibidor de CAD

icv: intra cerebro ventricular

IKK: *IkB kinase* / kinasa IκB

IL1: interleuquina 1

ILK: *integrin linked kinase* / kinasa unida a integrina

JNK: *c-jun N terminal kinase* / c-jun kinasa N terminal

LO: lóbulo óptico

LPS: lipopolisacáridos

MAPK: *mitogen activated protein kinase* / proteínas kinasas activadas por mitógenos

MCHx: muerte celular hipóxica

MCPD: muerte celular propia del desarrollo

Mdm2: *Murine doble minute 2*

NF-κB: *nuclear factor kappa B* / factor nuclear kappa B

NGF: *nerve growth factor* / factor de crecimiento nervioso
NO: *nitric oxide* / óxido nítrico
NOCD: *naturally occurring cell death* / muerte celular que ocurre naturalmente
NOS: *nitric oxide synthase* / óxido nítrico sintetasa
NT: neurotrofina
NT-3/4: neurotrofina-3, neurotrofina-4
ONOO: peroxinitrito
PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase-1* / kinasa dependiente de fosfatidilinositol 1
PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase* / kinasa fosfatidilinositol 3
PIP2: *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate* / fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3: *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate* / fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PTEN: *phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10*
RIP: *receptor interacting protein* / proteína que interactúa con receptor
ROS: *reactive oxygen species* – especies reactivas del oxígeno
SAC: *stratum album centrale*
SAPK: *stress activated protein kinases* / proteínas kinasas activadas por estrés
SFP: *stratum fibrosum periventriculare*
SGC: *stratum griseum centrale*
SGFS: *stratum griseum et fibrosum superficiale*
SGP: *stratum griseum periventriculare*
SNC: sistema nervioso central
SO: *stratum opticum*
SOD: superóxido dismutasa
TNF α : *tumoral necrosis factor α* / factor de necrosis tumoral α
TNFR1: *tumoral necrosis factor receptor 1*/receptor de factor de necrosis tumoral 1
TO: tectum óptico
TrkA/B/C: *tyrosine kinase receptor A/B/C* / receptor de tirosina kinasa A/B/C
WB: *western blot*
ZsV: zona subventricular
ZV: zona ventricular

“*Siempre en casa*. Un día alcanzamos nuestra *meta*: y a partir de ese momento señalamos con orgullo qué largos viajes hemos hecho para ello. En realidad no notábamos que estábamos viajando. Pero de esa manera hemos llegado tan lejos que en todos los sitios nos figurábamos estar *en casa*.”

Nietzsche

"when I see a bird that walks like a duck and swims like a duck and quacks like a duck, I call that bird a duck."

James Whitcomb Riley

INTRODUCCION

I. Hipoxia-Isquemia

I.1. Hipoxia-Isquemia en humanos

La hipoxia es una condición en la cual un organismo o un tejido particular presenta una menor disponibilidad de oxígeno. Puede estar dada por eventos de asfixia, anemia, envenenamiento (p.ej. CO) o disminución en la presión parcial de O₂ atmosférico. Por otro lado, la isquemia consiste en una disminución del flujo sanguíneo -total o parcial- en un tejido dado, donde no solo se ven comprometidas las concentraciones de O₂, sino también el aporte de nutrientes y los niveles de CO₂ tisulares. Los fenómenos de hipoxia-isquemia (HI) que afectan al sistema nervioso presentan demográficamente tasas de mortalidad y morbilidad elevadas: según las últimas estadísticas completas disponibles el accidente cerebrovascular (ACV) es la tercer causa de muerte en la población de EE.UU., contando con el 5,6% de las muertes del 2007. En el período neonatal -hasta 28 días posteriores al nacimiento- la hipoxia intrauterina o la anoxia al nacimiento son la décima causa de muerte, con el 1,8% del total de las muertes registradas en ese período (Heron, 2011).

En los períodos pre y perinatal, la hipoxia sobre el feto o el recién nacido puede ocurrir por patologías como disfunción placentaria, anemia materna, o por eventos como trabajo de parto prolongado, nacimiento prematuro y resuscitación cardio-respiratoria (Golan y Huleihel, 2006). En relación a la intensidad y duración del evento, la hipoxia puede derivar en encefalopatía neonatal -llamada encefalopatía producto de episodios de hipoxia-isquemia (EHI)-, la cual es una condición clínica relativamente común con una tasa de incidencia de tres cada mil recién nacidos. Consiste en un funcionamiento cerebral anormal, causal de varias patologías a corto y largo plazo, incluyendo parálisis cerebral, epilepsia y esquizofrenia, como así también problemas cognitivos, de desarrollo y comportamentales, e incluso en algunos casos la muerte (Kurinczuk et al., 2010; Northington et al., 2011).

I.2. Modelos experimentales

Existen varios modelos experimentales utilizados para estudios de los fenómenos de HI. Si intentamos hacer una clasificación, los podemos dividir entre los

que buscan reproducir patologías humanas (p.ej. ACV, EHI) y los que analizan exclusivamente distintas respuestas a nivel molecular, celular o tisular a una disminución en la concentración de oxígeno. El primer grupo logra reproducir de forma más fidedigna las patologías humanas aunque adolece de múltiples variables que dificultan la comprensión de los mecanismos subyacentes, mientras que lo inverso ocurre en el segundo grupo.

En el primer grupo se encuentran en su mayoría modelos *in vivo* con roedores (p.ej. ratas, ratones y jerbos) en los cuales se ocluye uno o más vasos de forma transitoria o permanente. A la luz de estos factores los modelos se denominan isquemia global, isquemia focal e hipoxia/isquemia -este último se utiliza fundamentalmente como modelo neonatal- (Lipton, 1999; Vexler y Ferriero, 2001). En relación a patologías perinatales existe una infinidad de modelos *in vivo* (Rooney et al., 1997), aunque el modelo comúnmente utilizado es en roedores y consiste en extraer los fetos en el último día de gestación, y aún dentro de los cuernos uterinos someterlos a asfixia sumergiéndolos temporalmente en agua (Cirulli et al., 2003; Kitzmueller et al., 2004). En el segundo grupo los modelos tanto *in vivo* como *in vitro* abarcan amplias áreas de interés (Zhang y Semenza, 2008), entre ellas: angiogénesis (Marti y Risau, 1998; Kubota y Suda, 2009), cáncer (Koong et al., 2000; Barsoum et al., 2011), muerte celular (Banasiak y Haddad, 1998; Niquet et al., 2003) e incluidas en todas ellas, respuestas de vías metabólicas (Hochachka, 1986; Brahimi-Horn et al., 2007) y moleculares (Schuster et al., 1989; Semenza y Wang, 1992; Shweiki et al., 1992). Los modelos animales son heterogéneos y si bien la mayoría son en mamíferos, se pueden encontrar estudios tanto en caimanes (Warburton et al., 1995) como en especies resistentes a la anoxia como tortugas acuáticas (Storey y Hochachka, 1974) o peces del género *Carassius* (Nilsson, 2001).

En estudios de hipoxia relacionados con el desarrollo, las aves -y los saurópodos en general- son un modelo ideal debido a la independencia del embrión de la madre. Cualquier variable a ser modificada afecta directa y exclusivamente al embrión, excluyendo factores maternos que pueden llegar a ser difíciles o imposibles de controlar en los mamíferos. A su vez, la manipulación y el acceso al embrión son relativamente sencillos, y en particular el pollo ha sido extensiva-

mente estudiado y utilizado como modelo de desarrollo y experimental (Hamburger y Hamilton, 1951; Levi-Montalcini, 1987; Stern, 2004). Existen varios modelos de hipoxia crónica en embriones de aves, desde hipoxia hipobárica (Giussani et al., 2007) a normobárica, sellando porciones variables de la cáscara con parafilm (Nico et al., 1985; Camm et al., 2001) o incubando los huevos en cámaras gaseosas (Catron et al., 2001; Rodricks et al., 2010). Incluido en este último grupo el modelo utilizado en nuestro laboratorio (cfr. MyM. II) es representativo de una hipoxia global aguda normobárica, en el cual se modifica únicamente la concentración de O₂ ambiental, mientras que la presión, la humedad y la temperatura se mantienen constantes y el libre intercambio gaseoso es asegurado por el flujo continuo del aire en la cámara.

I.3. Daños en el SNC

I.3.1. Efectores

Mas allá de la edad de ocurrencia del evento de HI, los mecanismos de daño se basan en tres procesos efectores: disminución de reservas energéticas, elevada concentración intracelular de calcio y producción de radicales libres (Yager y Thornhill, 1997; Vexler y Ferriero, 2001) (cfr. Intro. II.3.2). La disminución de la disponibilidad de oxígeno en cualquier tipo celular comienza con una inhibición de la cadena respiratoria y una consecuente reducción en los niveles de ATP. En este contexto donde la oferta de ATP se ve disminuida, las neuronas enfrentan una situación de compromiso con los dos procesos más demandantes de energía: la síntesis proteica y el mantenimiento del potencial de membrana (Buck y Pamen-ter, 2006). La disminución de ATP también es responsable de fenómenos nocivos secundarios como entrada masiva de calcio en neuronas postsinápticas que presentan receptores de glutamato, producto de despolarizaciones anóxicas presinápticas (McDonald et al., 1988; Lipton, 1999). El tercer efector más importante del daño HI son los radicales libres, principalmente mediante la generación de especies reactivas del oxígeno (en inglés: ROS) (Ferriero, 2001). Las ROS —relacionadas con el metabolismo del oxígeno— son generadas en cantidad al comienzo del período de reoxigenación y su efecto nocivo a diferencia de los mecanismos anteriores ocurre con posterioridad a la HI (Piantadosi y Zhang, 1996).

1.3.2. Vulnerabilidad diferencial

Las estructuras del SNC presentan una vulnerabilidad diferencial al daño generado por un evento de HI, sensibilidad que correlaciona -como es de esperar- con una elevada tasa metabólica, demanda de oxígeno y presencia de receptores glutamatérgicos.

En el cerebro adulto, las neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo (Petito et al., 1987), las células de Purkinje en el cerebelo, las neuronas piramidales de la neocorteza en las capas 3, 5 y 6, las neuronas reticulares del tálamo y ciertas neuronas del estriado son particularmente vulnerables al daño HI (Pulsinelli et al., 1982; Kawai et al., 1992).

En el cerebro inmaduro las estructuras afectadas varían con respecto al período de desarrollo en que ocurre el daño. Durante el período gestacional la sustancia blanca parece tener una mayor sensibilidad -directamente proporcional a la inmadurez-, observándose alteraciones en el linaje oligodendrocítico y en las neuronas de la subplaca, las cuales conducen a un déficit en la mielinización y lesiones en la corteza visual (Back et al., 2002; McQuillen et al., 2003). Cuando el evento ocurre en el período neonatal, el tálamo y los núcleos basales son estructuras particularmente vulnerables al daño (Ferriero y Miller, 2010). Además de las probables causas del daño como escasas defensas antioxidantes, excitotoxicidad, alta tasa metabólica o demanda de oxígeno, en el cerebro inmaduro se agrega un importante aunque poco estudiado fenómeno, la muerte celular programada. Este proceso en actividad durante determinados períodos del desarrollo e implicado en refinamiento de conexiones sinápticas, puede verse desregulado ante un evento de HI y persistir por un tiempo mayor o afectar a una mayor cantidad de neuronas (Nakajima et al., 2000).

1.3.3. Retraso temporal del daño

Los cambios cerebrales irreversibles generados por un evento de HI pueden ocurrir no solo durante la HI sino también en un período de tiempo variable una vez finalizado el evento, según el modelo animal y las condiciones. Este retraso característico es dependiente de la duración y de la intensidad del evento, pudiendo ocurrir desde horas -normalmente HI largas- hasta días posteriores a la HI -HI cortas- (Du et al., 1996; Liu et al., 2004; Busl y Greer, 2010).

1.3.4. Eventos puramente hipóxicos

En líneas generales los eventos puramente hipóxicos producen un daño menor y presentan una prognosis más favorable que los HI. Sin embargo, varios estudios de hipoxia perinatal en ratas muestran que los efectos no son menores: se han observado alteraciones en la corticogénesis (Ment et al., 1998), disminución en el número de neuronas y células gliales (Schwartz et al., 2004), daños en la sustancia blanca (Baud et al., 2004), desarrollo anómalo de prolongaciones neuronales y conexiones en el hipocampo, cerebelo y corteza visual (Rees et al., 1998), o peso cerebral reducido (Rehn et al., 2004).

1.3.5. Neuroprotección

La neuroprotección consiste en proteger el tejido nervioso evitando o disminuyendo el daño provocado -entre otros- por un evento de HI. El preconditionamiento (Lee et al., 2008), la hipotermia (Wang et al., 2010), los antioxidantes (Pentón-Rol et al., 2011) y el uso de agentes que actúan estimulando vías de supervivencia (Han y Holtzman, 2000) o inhibiendo vías de muerte (Pan et al., 2005) se encuentran dentro de las estrategias más estudiadas. En muchos casos mecanismos comunes subyacen a estas distintas estrategias, por ejemplo: el preconditionamiento produce la estabilización del factor inducible por hipoxia (en inglés: HIF), el cual aumenta la expresión y liberación de eritropoyetina (EPO) estimulando mediante su receptor la vía de supervivencia fosfatidil inositol 3 kinasa (en inglés: PI3K) (Ruscher et al., 2002).

Las observaciones sobre la menor incidencia de ACV en mujeres premenopáusicas comparadas con postmenopáusicas o con hombres condujo a que se postule un rol preventivo de los estrógenos sobre el ACV. Ensayos clínicos posteriores refutaron esta propiedad preventiva (Viscoli et al., 2001), pero la atención sobre los estrógenos -específicamente el estradiol- condujo al descubrimiento de sus propiedades neuroprotectoras.

Si bien en algunos estudios se ha observado neuroprotección por parte del estradiol frente a eventos de HI (Dubal et al., 1998; Jover et al., 2002), la heterogeneidad de los modelos experimentales *in vivo* genera resultados dispares respecto a variables como dosis, vía de administración, ventana temporal efectiva y características del tratamiento: crónico o agudo. Se han descrito tres mecanis-

mos de acción neuroprotectora. Uno es mediante sus propiedades antioxidantes (Behl et al., 1997). El segundo es mediante la unión a receptores intracelulares de estrógenos, translocación al núcleo y modulación de genes blanco (Dubal et al., 2006). En tercer lugar, la unión a receptores podría activar la señalización de la vía de supervivencia PI3K de forma rápida -no genómica- (Mannella y Brinton, 2006).

II. Muerte celular

II.1. Tipos y clasificación

Existen varios criterios sobre los cuales la muerte celular puede ser clasificada. Según su morfología, según si ocurre de forma regulada o accidental, si es programada o no, según la participación de vías moleculares específicas, o si es fisiológica o patológica. En general las formas de muerte que presentan alguna de las siguientes características, a ser: regulada, programada o fisiológica, son asociadas inmediatamente con apoptosis. A su vez, si es accidental, no programada o patológica son asociadas con necrosis. La realidad en materia de clasificación es realmente más compleja.

II.1.1. Según la morfología

Hasta hace pocos años, las descripciones ultraestructurales se consideraron como el criterio último para identificar y diferenciar los tipos de muerte celular. En base a este criterio se distinguen en la actualidad tres tipos principales: necrosis, apoptosis y autofagia (Lossi y Merighi, 2003; Kroemer et al., 2009).

La necrosis¹ se caracteriza no sólo por cambios nucleares sino también por alteraciones en la membrana plasmática u otras organelas. En el núcleo la cromatina se condensa (picnosis) en múltiples agregados de distinta densidad y forma irregular (Kerr et al., 1995). Durante el progreso de la necrosis, la célula suele hincharse (edema) y las organelas presentar daño estructural. Las mitocondrias sufren cambios que incluyen contracción de la membrana interna o edema, formación de agregados y desintegración (Trump et al., 1965). Los ribosomas se se-

¹ Algunos autores sugieren que la necrosis no debe ser considerada un tipo de muerte celular, sino más bien representa los restos cadavéricos de la muerte celular, es decir la célula no muere por necrosis. El argumento que sostienen es que la apoptosis y todos los tipos de muerte celular conocidos en sus estadios finales presentan características necróticas (Majno y Joris, 1995; Martin et al., 1998).

paran del RER y los poliribosomas se desasocian, dando como resultado la presencia de ribosomas libres en el citosol, de forma que la matriz citosólica parece densa y granulada. Las cisternas del RE y del Golgi pueden dilatarse, fragmentarse y formar vesículas, mientras que la membrana plasmática puede perder su integridad o sufrir un proceso denominado *blebbing* (Laiho et al., 1971; Kerr et al., 1995). En inglés *bleb* significa burbuja o vesícula, y a diferencia de *budding* -ver más adelante-, el proceso se caracteriza por formación de proyecciones circulares de membrana plasmática de tamaño pequeño que no contienen organelas, las cuales pueden separarse de la célula o estallar (Majno y Joris, 1995).

La apoptosis presenta un fenotipo morfológico distintivo. En la mayoría de las descripciones clásicas de apoptosis, los cambios tempranos definitivos ocurren dentro del núcleo (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). La cromatina se condensa en masas densas con bordes bien definidos, las cuales pueden estar contra la membrana nuclear, o dispuestas circularmente en el núcleo. La desintegración del nucléolo ocurre temprano, y las alteraciones en el citoplasma acompañan a estos cambios nucleares. El citoplasma se condensa, observado como un oscurecimiento de la célula, y consecuentemente la célula se reduce en tamaño, mientras que la membrana plasmática permanece intacta. La condensación del citoplasma frecuentemente se asocia con la aparición de vacuolas translúcidas (Kerr et al., 1995). El origen de estas vacuolas no se conoce, pero podrían derivar del retículo endoplásmico o del complejo de Golgi (Portera-Cailliau et al., 1997b). Durante el curso de estos eventos, las mitocondrias típicamente se encuentran intactas (Kerr y Harmon, 1991), y son requeridas para la apoptosis (Newmeyer et al., 1994). Luego, las membranas nuclear y plasmática presentan convulsiones y la célula sufre un proceso denominado *budding*. En este proceso el núcleo que contiene masas uniformes de cromatina condensada, se fragmenta junto con porciones de citoplasma, formando residuos celulares (*debris*) o cuerpos apoptóticos, compuestos por porciones de núcleo rodeado de citoplasma con organelas, en algunos casos intactas (Majno y Joris, 1995). Algunos fragmentos nucleares pueden estar contenidos por membranas, mientras que otros no. Estos cuerpos luego son fagocitados por células cercanas o típicamente fagocitos.

La autofagia presenta una formación masiva de vacuolas denominadas autofagosomas. Estos son doble membrana y pueden contener tanto organelas como citosol (Levine y Klionsky, 2004). Típicamente la cromatina no presenta condensación y estas células no son fagocitadas por células cercanas ni fagocitos (Clarke, 1990). Actualmente se considera que la autofagia no es un tipo de muerte, ya que la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma no logra detener el proceso de muerte (Galluzzi et al., 2012).

Estas descripciones corresponden al modelo ideal de cada morfología. Dependiendo del estímulo y la estructura o el contexto *-in vitro* o *in vivo-*, se presentan variaciones que pueden coincidir en mayor o menor medida con estos modelos, formando así un amplio espectro de fenotipos. Dado que los cambios morfológicos son consecuencia de un proceso molecular subyacente, es de esperar que pequeños cambios moleculares alteren el fenotipo de muerte.

II.1.2. Regulada o accidental

El otro criterio clasificador es si la muerte es ejecutada por un mecanismo enzimático interno o por factores externos a la célula (p.ej. osmóticos, termales, tóxicos o traumáticos). En el primer caso la muerte es regulada²: el proceso que conduce a la muerte puede ser inhibido por intervención farmacológica o génica (Galluzzi et al., 2012). En el segundo, la muerte es accidental, y la muerte no puede ser detenida por ninguna intervención. La apoptosis es un mecanismo de muerte regulada -depende de caspasas o de factores liberados por la mitocondria-, mientras que la necrosis se presenta en casos de muerte accidental, aunque existen ciertos casos de muerte con morfología necrótica que son regulados (Vandenabeele et al., 2010).

II.1.3. Muerte celular programada

Otro criterio que ha traído confusión es el de muerte celular programada, término que se utiliza como sinónimo de apoptosis. Apoptosis se refiere a un mecanismo de muerte celular, mientras que muerte celular programada se refiere al proceso de muerte que ocurre en un momento dado del desarrollo o durante la

² La noción de que existe un mecanismo regulado de muerte celular opuesto a la mitosis que participa en la homeostasis tisular y de los órganos no es nueva. El concepto se comenzó a gestar desde fines del s.XIX a partir de observaciones en distintos modelos experimentales, especialmente en embriones (Flemming, 1885; Gräper, 1914; Glücksmann, 1951).

homeostasis tisular (Alles et al., 1991; Majno y Joris, 1995; Lossi y Merighi, 2003). Es cierto que la mayoría de la muerte celular programada ocurre por mecanismos apoptóticos, aunque no en todos los casos (Schwartz et al., 1993). Para evitar estos malentendidos surgieron términos alternativos a muerte celular programada, como muerte celular que ocurre naturalmente (en inglés: NOCD) (Lossi y Merighi, 2003) o muerte celular propia del desarrollo (MCPD), el cual será utilizado en la presente tesis.

II.1.4. Fisiológica o Patológica

Por último, la relación patológica-necrosis y fisiológica-apoptosis esta muy lejos de ser cierta. En isquemia es común observar ambos fenotipos o una mezcla de ambos (Lipton, 1999; Northington et al., 2001b; Sugawara et al., 2004), lo mismo ocurre en tumores y otras patologías (Leist y Jäättelä, 2001; Benn y Woolf, 2004); mientras que fisiológicamente la necrosis podría tener un rol importante en el mantenimiento de tejidos (Zong y Thompson, 2006; Han et al., 2008).

II.2. Muerte celular propia del desarrollo

II.2.1. Fenotipos

Durante el desarrollo del SNC ocurre un fenómeno conocido como MCPD en el cual alrededor del 50% de las neuronas generadas se mueren (Blaschke et al., 1996). La MCPD ocurre en todas las estructuras del SNC y es un proceso muy conservado filogenéticamente (Glücksman, 1951). La muerte neuronal durante el desarrollo tiene características apoptóticas en la gran mayoría de los casos, aunque se ha observado que tanto la autofagocitosis -en mayor medida- como la necrosis pueden también estar presentes (Schweichel y Merker, 1973).

II.2.2. Mecanismos efectores

Como mecanismo de muerte la apoptosis se ejecuta por medio de una serie de proteínas y moléculas presentes constitutivamente en la célula. Actualmente se reconocen dos vías moleculares independientes involucradas en el proceso apoptótico. Una se activa mediante receptores de muerte y se ejecuta por caspasas -vía extrínseca-. La otra comienza con la liberación de citocromo c -entre otras moléculas- de la mitocondria y puede o no ejecutarse vía caspasas -vía intrínseca- (fig.1) (Benn y Woolf, 2004; Galluzzi et al., 2012).

II.2.2.1. Vía extrínseca

Esta vía se inicia con la unión de ligandos como el ligando de Fas (FasL), factor de necrosis tumoral α (en inglés: TNF α), y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (en inglés: TRAIL) a sus respectivos receptores de muerte: Fas, TNFR1 y TRAILR1/2 (Nagata, 1997; Wajant, 2002). Tomando como ejemplo a Fas, la unión de FasL produce la trimerización de los receptores y los dominios de muerte presentes en Fas reclutan FADD (del inglés Fas associated death domain), RIP (del inglés receptor-interacting protein) o Daxx formando un complejo proteico (Leist y Jäättelä, 2001). Caspasa-8 se activa luego de ser reclutada por FADD a través de la interacción entre los dominios efectoros de muerte presentes en ambas proteínas (Ashkenazi y Dixit, 1998), pudiendo actuar sobre caspasas efectoras -caspasa-3 principalmente- (Cohen, 1997) directamente o mediante Bid sobre la vía mitocondrial -vía intrínseca- (Luo et al., 1998). Esta señalización cruzada entre la vía extrínseca y la intrínseca es bidireccional como se verá más adelante. RIP por otro lado inicia una cascada independiente de caspasas que culmina en necrosis (Holler et al., 2000), mientras que Daxx activa la vía ASK1/JNK que puede conducir a una apoptosis independiente de caspasas (Chang et al., 1998).

II.2.2.2. Vía Intrínseca

El inicio de la cascada apoptótica en esta vía tiene su origen en la mitocondria, pero no es tan relevante para la apoptosis la pérdida de su funcionalidad como lo es la liberación al citosol de determinadas moléculas de señalización. Dentro de estas moléculas, la más estudiada es citocromo c, proteína que presenta un grupo hemo asociado, con un rol fundamental en la cadena de transporte de electrones. Su liberación induce la formación del apoptosoma: un complejo multiproteico compuesto por Apaf1, caspasa-9, ATP y citocromo c (fig. 1) (Cain et al., 2000). La formación del apoptosoma favorece la activación de caspasa-9, la cual tiene como sustrato principal a caspasa-3 (Kuida, 2000). Smac/DIABLO es otra proteína liberada que inhibe a las IAPs -proteínas que inhiben el clivaje de caspasas- (Chai et al., 2000), y de forma conjunta con citocromo c permite la activación de caspasas. Por otro lado, se ha observado que cuando el factor inductor de apoptosis (AIF) también liberado de la mitocondria, transloca al núcleo produce fragmentación del DNA en segmentos de 50 kpb de forma independiente de

caspasas (Ye et al., 2002). Así, la vía intrínseca se puede ejecutar de forma caspa-dependiente o independiente.

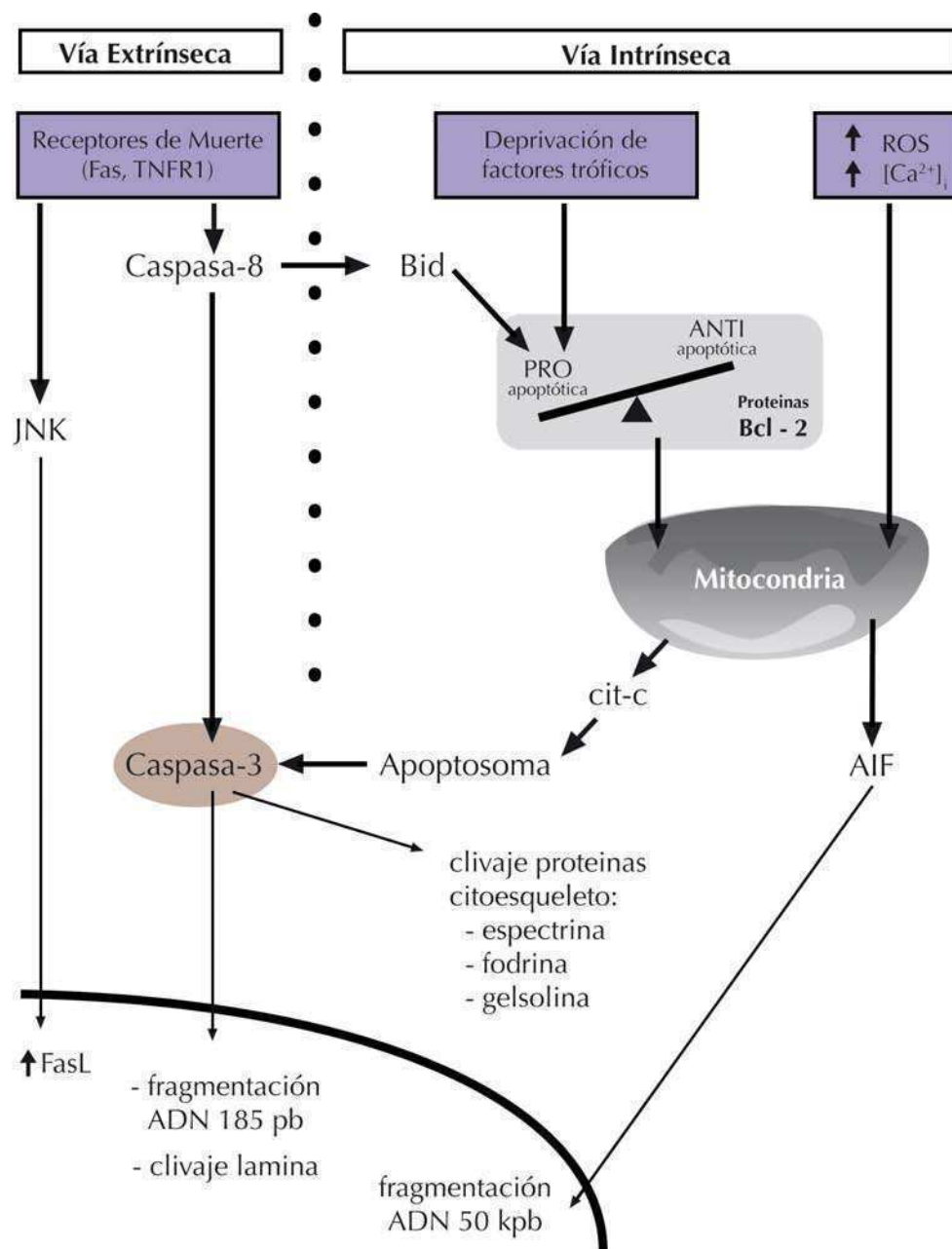


Figura 1. Las dos vías ejecutoras clásicas de apoptosis.

La vía extrínseca se inicia a partir de la activación de Fas o TNFR, los cuales a través de adaptadores pueden activar a JNK o caspasa-8. JNK por medio de c-jun regula la transcripción de genes pro-apoptóticos como FasL. Caspasa-8 tiene como sustrato a caspasa-3, la cual dispara la demolición celular a través del clivaje de proteínas del citoesqueleto, fragmentación internucleosomal del ADN y desarmado de la envoltura nuclear (lamina). Estos pasos independientes de la mitocondria son propios de la vía extrínseca. La vía intrínseca puede ser disparada por deprivación de factores tróficos o por eventos propios de la HI: aumento en los niveles de ROS o calcio intracelular. La deprivación de factores tróficos a través de la homodimerización de las proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas y el aumento de ROS y de Ca^{2+} conducen a la liberación de citocromo c y AIF entre otros. El citocromo c en conjunto con Apaf-1, caspasa-9 y ATP forman el apoptosoma, el cual activa caspasa-3. Por otro lado, AIF produce una fragmentación de ADN en fragmentos de gran tamaño. Ambas vías se cruzan a través de el clivaje de Bid la cual inclina la balanza hacia las pro-apoptóticas, o a través de la capacidad de caspasa-3 de clivar caspasa-8.

La liberación de estas moléculas puede estar mediada por el poro de transición, complejo proteico ubicado en la unión entre las membranas mitocondriales externa e interna (Brenner y Grimm, 2006). Se han encontrado varias causas que influyen en la apertura “anómala” del poro, desde moléculas desacoplantes de la cadena respiratoria, ROS, incremento en la concentración de calcio en la matriz mitocondrial, y la regulación mediada por proteínas de la familia Bcl-2 (Zoratti y Szabò, 1995; Kroemer et al., 1997). Esta familia de proteínas presenta dos grupos que funcionalmente se los puede dividir en anti-apoptótico (Bcl-2 y Bcl-xl) y pro-apoptótico (Bax, Bak, Bad, Bid y Bik entre otros) (Strasser et al., 2000). La regulación de estas proteínas si bien es muy compleja depende en última instancia de un balance en las cantidades de pro-apoptóticas y anti-apoptóticas en la membrana mitocondrial externa. Dos características son fundamentales para entender su acción: tienen capacidad de formar homodímeros o heterodímeros (Korsmeyer, 1999); y la formación de homodímeros de pro-apoptóticas puede favorecer la apertura del poro de transición (Marzo et al., 1998) o pueden formar un canal en la membrana mitocondrial externa (Shimizu y Tsujimoto, 2000), conduciendo en ambos casos a la liberación de citocromo c, AIF, etc. Así, a cantidades suficientes de anti-apoptóticas el grupo de pro-apoptóticas se encuentra en su mayoría formando heterodímeros. Si las cantidades de la primera disminuyen, más pro-apoptóticas se encuentran libres para homodimerizar y ejecutar su acción. Este mecanismo regulatorio por cantidades depende exclusivamente de la síntesis *de novo* de ambos grupos, sin embargo existen formas de regulación alternativas que no dependen de transcripción. Como ejemplo daremos el de Bad (pro-apoptótica de localización citosólica), la cual es susceptible de ser fosforilada por Akt. Bad en su estado fosforilado permanece secuestrado en el citosol, mientras que en su conformación no fosforilada dimeriza con las proteínas anti-apoptóticas, fundamentalmente Bcl-xl, inclinando la balanza hacia la homodimerización de las pro-apoptóticas (Datta et al., 2000).

II.2.2.3. Caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas de expresión constitutiva y ubicua, con 14 miembros encontrados. Se sintetizan como proenzima y el clivaje en 2 sitios distintos genera la proteína activa (Green, 2000). Las caspasas presentan

dos características que les confieren un gran poder de amplificación de señal: tienen como sustratos otras caspasas y presentan actividad autocatalítica. A grandes rasgos las caspasas se dividen en un grupo que comienza con la propagación de la señal (iniciadoras: 8, 9 y 10) y otro grupo que actúa sobre sustratos celulares específicos (efectoras: 3, 6 y 7). La caspasa-3 presenta una gran cantidad de sustratos que le confieren a la apoptosis su morfología distintiva. Entre ellos inactiva PARP -reparación de DNA-, ICAD -clivando este inhibidor, activa la endonucleasa CAD que da el patrón distintivo de fragmentación internucleosomal- (Liu et al., 1997), inactiva Bcl-2 y Bcl-xl (Fujita et al., 1998), cliva lamina -proteína que forma una malla manteniendo la estructura de la membrana nuclear- y proteínas que forman parte del citoesqueleto como gelsolina, fodrina y espectrina (Slee et al., 2001).

El conocimiento actual sobre los procesos bioquímicos que subyacen a la muerte por apoptosis es extremadamente complejo y lleno de excepciones y particularidades dependiendo del sistema que se analice. Por ejemplo caspasa-8 es uno de los sustratos de caspasa-3, y en ciertos modelos se ha observado que la activación de la vía intrínseca conduce a una activación de la extrínseca. La patente redundancia de mecanismos en todos los niveles de la cascada de eventos apoptóticos, hace extremadamente difícil disecar vías de ejecución como compartimentos funcionalmente independientes.

II.2.3. Mecanismos Disparadores

La maquinaria apoptótica se encuentra constitutivamente a disposición de ser disparada, pero ¿quien da la orden?. La supervivencia de las neuronas se encuentra regulada por señales exógenas de supervivencia/muerte con mecanismos intracelulares de señalización específicos. Dos grupos de señalización actúan durante el desarrollo del sistema nervioso: FasL y las neurotrofinas (Lossi y Merighi, 2003). En el primer caso la señalización ocurre por la vía extrínseca como se vio antes y la activación de esta vía conduce a la muerte celular. Las neurotrofinas (NT) son un grupo de factores de crecimiento sintetizado por células del tejido nervioso. Este grupo se compone de NGF, BDNF, NT-3 y NT-4, y la señal se traduce al interior de la célula por medio de la unión a receptores del tipo tirosina kinasa TrkA/B/C como así también a receptores de Sortilina y p75 (Reichardt,

2006). Una gran cantidad de variables influyen en la señalización última que puede ser de supervivencia o muerte: las NT pueden presentar una forma madura o inmadura; existen distintas afinidades de cada NT con los receptores; los receptores según su nivel de expresión o interacciones modulan distintas respuestas. Entre esta complejidad, se encuentra establecido que la activación de los receptores del tipo Trk regula dos vías de supervivencia: PI3K/Akt y MAPKs (ERK) (Kaplan y Miller, 2000; Putcha y Johnson, 2004), de las cuales PI3K/Akt tiene un rol preponderante en la supervivencia neuronal fisiológica (Hetman et al., 1999). Por otro lado, se ha sugerido que el receptor p75 (que tiene afinidad por todas las neurotrofinas) podría ser el ejecutor de la MCPD en neuronas, mediante la activación de la cascada de ASK1/JNK favorecería la muerte celular en condiciones de baja o nula concentración de neurotrofinas. Solo una mayor concentración de neurotrofinas y/o una mayor expresión de receptores Trk que fortalezca la activación de Akt puede inhibir la señalización de p75 y de esta forma mantener la supervivencia neuronal (Nykjaer et al., 2005).

II.2.3.1. Vía PI3K/Akt

Con la activación del receptor Trk, es reclutado un complejo de proteínas adaptadoras (fig.2). Este complejo media la activación de PI3K la cual fosforila al fosfolípido PIP2 a PIP3, ambos ubicados en la membrana interna (Rodgers y Theibert, 2002). PIP3 sirve como anclaje de las kinasas PDK1, ILK y Akt, de las cuales las dos primeras fosforilan (la fosforilación vía ILK no se encuentra del todo establecida) a Akt en dos sitios: Treo308 y Ser473 (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000). Akt es una Ser/Treo kinasa que actúa sobre una gran variedad de sustratos favoreciendo la supervivencia neuronal por tres mecanismos: a) control directo de la apoptosis mediante la fosforilación de Bad (del Peso et al., 1997), Caspasa 9 (Cardone et al., 1998), y kinasas río arriba de las SAPKs (JNK y p38) entre ellas ASK1 (Kim et al., 2001); b) control transcripcional de la apoptosis vía fosforilación de factores de transcripción de la familia ForkHead (FoxO) -de esta forma inhibiendo la síntesis de FasL y TRAIL-(Brunet et al., 1999), regulación de NF- κ B a través de IKK (Kane et al., 1999), fosforilación de Mdm2 -favoreciendo su translocación nuclear- (Mayo y Donner, 2001) y regulación de CREB (Du y Montminy, 1998); c) control metabólico de la apoptosis fosforilando e inhibiendo GSK3 -este rol como

mecanismo promotor de supervivencia no está del todo esclarecido- (Cross et al., 1995).

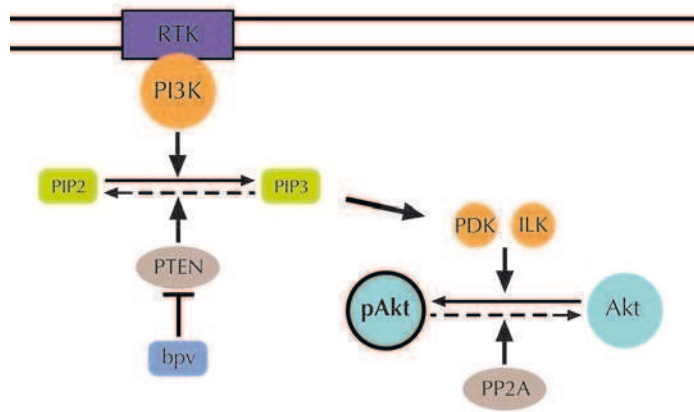


Figura 2. Regulación de Akt.

La unión de factores tróficos a receptores del tipo tirosina quinasa, conducen a través de proteínas adaptadoras a la activación de PI3K. Esta a partir de PIP2 genera PIP3, fosfolípido ubicado en la membrana interna, el cual recluta a PDK, ILK y Akt. Las dos primeras fosforilan a Akt, y esta en su forma activa participa en múltiples vías de señalización que favorecen la supervivencia celular. Los niveles de pAkt son controlados en dos puntos principales: uno, la fosfatasa PP2A defosforila a pAkt; dos, PTEN cumple un rol antagónico a PI3K, defosforila PIP3 y genera PIP2. La molécula bpv(phen) tiene la propiedad de inhibir específicamente a PTEN y de forma indirecta incrementar los niveles de pAkt.

Además de PI3K existen otras enzimas involucradas en la regulación de la fosforilación de Akt, como por ejemplo la ser/treo fosfatasa 2A. Esta fosfatasa tiene un amplio espectro de sustratos, muchos de los cuales cumplen funciones en vías de supervivencia/muerte (p. ej. p38, JNK, ERK) (Millward et al., 1999). Otro punto de control se ejecuta regulando los niveles de PIP3. PTEN es una fosfatasa de lípidos que defosforila PIP3 generando PIP2, camino inverso a PI3K (Zhao, 2007). Así, el balance entre las actividades de PI3K y PTEN regulan la activación de Akt. Fue descubierta por su rol como supresora de tumores y se encuentra mutada en varios cánceres (Simpson y Parsons, 2001). El uso de los compuestos de bisperoxovanadio para inhibir la actividad de PTEN es relativamente reciente. Estos compuestos actúan como inhibidores de fosfatasas de tirosinas y mostraron capacidad de inhibir específicamente a PTEN a concentraciones 100 veces más bajas (Schmid et al., 2004). Se ha encontrado que su acción específica incrementa los niveles de pAkt, sin embargo la mayoría de los estudios fueron realizados en cultivos celulares (Schmid et al., 2004) o tejidos (Lai et al., 2007).

II.2.4. Causas

La MCPD en el SNC ocurre en dos períodos temporalmente y ontogenicamente distintos. El primero ocurre en las zonas ventriculares y subventriculares del sistema nervioso en desarrollo, donde los precursores neurales proliferan para

luego iniciar el proceso de migración (Miller y Kaplan, 2001). A pesar de ser un fenómeno que aporta la mitad de la muerte neuronal durante la MCPD, las causas que subyacen a la muerte de estos neuroblastos premigratorios se encuentran muy poco estudiadas. Una hipótesis interesante sostiene que dada la limitada capacidad de transporte de las células de la glia radial, sólo la población de neuroblastos que logra hacer contacto con estas células en una determinada ventana temporal sobrevive (Zhang y Galileo, 1998). Otra hipótesis sostiene que existe un reloj celular que regula esta muerte, involucrando ciclinas, kinasas dependientes de ciclinas y proteína de retinoblastoma (Lossi y Merighi, 2003).

El segundo período ocurre sobre neuronas postmigratorias diferenciadas durante el establecimiento de conexiones sinápticas (Oppenheim, 1991). La regulación de la supervivencia está dada por factores tróficos sintetizados principalmente por sus blancos o sus aferencias, aunque también influyen señales provenientes tanto de neuronas vecinas como de células gliales. En este contexto las neuronas compiten por una oferta limitada de factores tróficos, y sólo las que logran una activación robusta de receptores Trk sobreviven.

II.3. Muerte celular isquémica / hipóxica

II.3.1. Fenotipos

Las características fenotípicas de la muerte celular causada por un evento de HI pueden corresponder a apoptosis, necrosis o fenotipos intermedios. Si bien el fenotipo necrótico es característico (Martin et al., 1998), la presencia de apoptosis puede ocurrir en contextos donde alguna vía de señalización de supervivencia/muerte se encuentre desregulada.

La magnitud de daño permanente en una HI depende de dos factores: el grado y la duración de la isquemia. Las regiones en las cuales el flujo sanguíneo se encuentra drásticamente reducido (conocido como el núcleo isquémico) se dañan rápida e irreversiblemente (Astrup et al., 1981). Entre el núcleo isquémico y el cerebro normal existe una región que se encuentra con flujo parcial, esta región es conocida como la penumbra (Markus et al., 2004) y es el blanco de todas las terapias contra el ACV. La presencia de muerte necrótica es común en el núcleo isquémico y en la región infartada, aumentando en magnitud cuanto más prolongada es la isquemia (García et al., 1993). A mediados de los años 90 se

comenzó a observar que con la necrosis coexistía la muerte apoptótica (Li et al., 1995b). Sin embargo, la apoptosis se favorece de forma inversa a la necrosis: la presencia de células apoptóticas se incrementa en isquemias transitorias de corta duración, su aparición es tardía luego del evento isquémico y se desarrolla principalmente en la penumbra (Li et al., 1995a).

II.3.2. Mecanismos de daño

II.3.2.1. Comunes a la MCPD

Tanto la liberación de citocromo c, AIF y Smac/DIABLO luego de una HI (Fujimura et al., 1998; Yin et al., 2002; Gao et al., 2005) como la subsecuente activación de caspasas han sido reportada en numerosos estudios (Namura et al., 1998; Shibata et al., 2002), avalando el rol de la vía intrínseca y extrínseca como medio para la ejecución de la apoptosis derivada de HI. Estas vías pueden ser disparadas por modulaciones o desregulaciones de mecanismos comunes con la MCPD. Entre estos:

- Incremento en la expresión de Fas: se ha observado un incremento en la expresión de Fas y FasL en la región isquémica luego de una isquemia focal, y disminución en el tamaño del infarto en mutantes con pérdida de función para Fas (Rosenbaum et al., 2000).
- Disminución en los niveles de receptores Trk: en neuronas de CA1 del hipocampo de ratas inmaduras se ha detectado una disminución en los niveles de TrkB y de su ligando BDNF luego de una HI. La mayoría de las neuronas con marca positiva para BDNF no ejecuta apoptosis (Walton et al., 1999).
- Disminución en los niveles de factores de crecimiento: fundamentalmente durante el desarrollo la pérdida o disminución de factores tróficos aportados por neuronas blanco o aferentes puede derivar en muerte apoptótica (Young et al., 2004; Northington et al., 2005).

II.3.2.2. Propios de la HI

Como vías de señalización las proteínas kinasas activadas por stress (JNK y p38) parecen tener un rol activo en la HI. Estas kinasas responden a señalizaciones extracelulares normalmente relacionadas a situaciones de stress: LPS, IL1 y TNF (Freshney et al., 1994; Rouse et al., 1994; Raingeaud et al., 1995). Se ha observado que tanto JNK como p38 se encuentran activadas durante la HI, y que su

inhibición promueve la supervivencia neuronal (Shioda et al., 1998). JNK promueve la activación del factor de transcripción c-jun, el cual regula entre otros la expresión de FasL e inhibe Bcl-2 -anti-apoptótica- (Pan et al., 2005). Sin embargo esta discutido si el rol de estas SAPKs es causal o es un epifenómeno de la HI.

Por otro lado, existen disparadores exclusivos de la HI que pueden derivar tanto en apoptosis como en necrosis:

- Elevación en concentración de calcio intracelular: Tanto las despolarizaciones anóxicas como la necrosis celular incrementan los niveles de glutamato extracelulares. La sobreactivación de los receptores del tipo NMDA Y AMPA elevan las concentraciones de calcio intracelular promoviendo una serie de eventos nocivos para la célula, este fenómeno es conocido como excitotoxicidad (Mergenthaler et al., 2004) y comúnmente lleva asociado un fenotipo necrótico. Entre las consecuencias de un incremento del calcio intracelular se encuentran:

- Daño mitocondrial por la sobrecarga de la capacidad buffer de esta organela (Dugan et al., 1995).

- Activación de la proteasa calpaina (Broughton et al., 2009). Esta proteasa tiene un amplio espectro de sustratos, entre los más importantes: cliva proteínas del citoesqueleto (Lee et al., 1991); cliva Bid (Broughton et al., 2009), la cual en su forma truncada activa la vía intrínseca; inhibe la síntesis proteica inactivando el factor de iniciación eIF-4 (Bodsch et al., 1985).

- Activación de NOS mediante calmodulina y calcineurina (Dawson et al., 1993), generando la especie radicalaria óxido nítrico la cual produce peroxinitrito cuando se conjuga con el anión superóxido.

- Radicales libres: El incremento en las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno es una de los mayores causales de daño en la HI. Entre estas se encuentran el anión superóxido, el radical hidroxilo, el radical óxido nítrico y el peroxinitrito. Los daños ejercidos por estos radicales libres son muy amplios: inactivación de enzimas, liberación de calcio de depósitos intracelulares, desnaturalización proteica (Freeman y Crapo, 1982), peroxidación lipídica (Ikeda y Long, 1990) y daños a ácidos nucleicos (Szabó, 1996). Además del efecto del calcio sobre la NOS visto en el párrafo anterior, el incremento del anión superóxido ocurre principalmente durante la reperfusión debido a fallas en la cade-

na respiratoria y la saturación de la SOD (Morita-Fujimura et al., 2001). Si bien los radicales superóxido, hidroxilo y óxido nítrico tienen una elevada reactividad, su vida media es muy corta. El peroxinitrito por otro lado es una especie reactiva con gran poder de difusión y tiene capacidad de descomponerse en radical hidroxilo. En condiciones de stress oxidativo severo normalmente se desarrolla necrosis, mientras que en condiciones moderadas se ha observado apoptosis (Lennon et al., 1991).

III. Modelo Experimental: Tectum Óptico de Aves

III.1. Anatomía y función de la vía visual

Las aves posiblemente sea la clase de todo el grupo de vertebrados que más dependa de la visión. Muchos aspectos de su adaptación al medio ambiente y de su supervivencia, como ser la búsqueda de comida, elección de pareja, orientación y navegación, requieren de una precisa discriminación visual (Hodos, 1993). Anatómicamente, uno de los aspectos más notorios del cerebro de las aves es el gran desarrollo de su sistema visual. Ya en un embrión de estadio de 10 somitas -poco más de un día de incubación- se pueden discernir dos estructuras del tubo neural que posteriormente desarrollaran en el ojo y el tectum óptico (Mey y Thanos, 2000).

En todos los amniotas (i.e. aves, reptiles y mamíferos) la información proveniente de la retina llega al telencéfalo por dos vías distintas. Una, viaja de la retina directamente a un grupo celular en el tálamo, y de ahí al telencéfalo. Esta ruta se la denomina vía talamofugal en los saurópsidos (i.e. aves y reptiles) y presumiblemente corresponde a la vía geniculoestriada en mamíferos. La otra vía, se dirige de la retina al mesencéfalo -tectum óptico / colículo superior- y de ahí al telencéfalo haciendo previamente relevo en un grupo celular del tálamo. Esta vía se la designa como la vía tectofugal en aves, correspondiendo posiblemente a la vía coliculotalamocortical en mamíferos (Shimizu y Karten, 1993)³.

Mas allá de que en las aves las vías tectofugales y talamofugales se encuentren anatómicamente interconectadas, éstas presentan funciones y relevancias diferentes. En aves, la vía tectofugal recibe ampliamente la mayor parte de las fibras provenientes de la retina y está involucrada en casi todos los tipos de procesamiento de información visual. Desempeña un rol significativo en una variedad de tareas visuales incluyendo discriminación de colores, brillo, tamaño y patrones, como así también agudeza visual y transferencia intraocular de aprendizaje de discriminación visual (Karten, 1979; Engelage y Bischof, 1993). Por otro lado, la vía talamofugal con menor cantidad de aferencias retinianas, esta involucrada en

³ Si bien entre los amniotas estas dos vías presentan características de conectividad y neurotransmisores similares, existe una diferencia importante que distingue a los mamíferos de los saurópsidos: en los primeros las proyecciones terminan en estructuras telencefálicas organizadas en láminas, mientras que en los segundos están organizadas en núcleos (Güntürkün, 1993).

tareas relacionadas con la resolución espacial, cumpliendo un rol importante en la superposición binocular. Esta vía se encuentra especialmente desarrollada en aves que poseen los ojos dispuestos frontalmente (Bravo y Pettigrew, 1981; Henke, 1983).

III.2. Tectum Óptico

III.2.1. Estructura y función

A diferencia de los mamíferos, los nervios ópticos de las aves están completamente cruzados y en su gran mayoría las fibras provenientes de la retina proyectan topográficamente al tectum óptico (TO) contralateral -vía tectofugal- (Engelage y Bischof, 1993; Mey y Thanos, 2000). El tectum óptico es una estructura me-

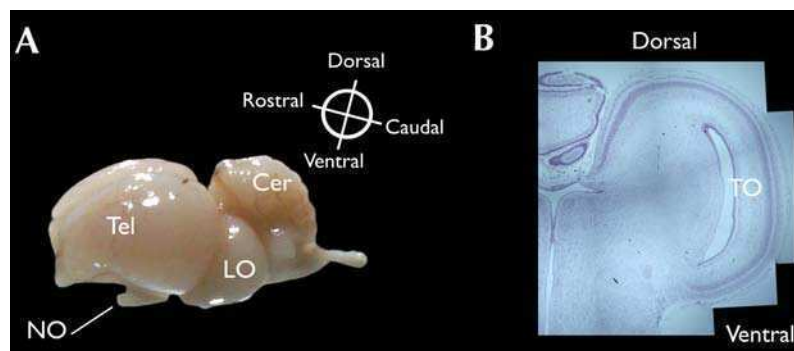


Figura 3. A. Vista lateral del encéfalo de pollo de día postnatal 6. Se grafica la disposición de los ejes Dorso-Ventral y Rostro-Caudal del LO. Tel: telencéfalo; Cer: cerebelo; NO: nervios ópticos; LO: lóbulos ópticos. B. Corte coronal a la altura del LO de un embrión de DE 12, teñido con Nissl donde se observa en el LO derecho la estructura laminada que corresponde al Tectum Óptico (TO).

sencefálica bilateral (fig.3), que consiste en una serie alternante de láminas fibrosas y celulares con una compartimentalización clara de aferencias en las láminas más superficiales y eferencias en las más profundas (Huber y

Crosby, 1933; LaVail y Cowan, 1971). Junto con el tegmentum y el pretectum forman el lóbulo óptico. Dada su ubicación como primer estación de relevo en la vía tectofugal tiene un rol fundamental en el procesamiento de la información visual (Güntürkün, 1991). Estudios de respuesta a estímulos visuales muestran que alrededor del 70% de las neuronas tectales son sensibles a un estímulo móvil y el 30% de éstas muestran especificidad direccional, mientras que 30% de las células tectales muestran respuestas cromáticas (Bilge, 1971; Jassik-Gerschenfeld y Guichard, 1972).

Como modelo experimental el TO no sólo es utilizado en disciplinas de neurociencias relacionadas con la estructura y función de vías visuales, sino tam-

bién en biología del desarrollo (De Long y Coulombre, 1965; Puellas y Bendala, 1978; Itasaki y Nakamura, 1996).

III.2.2. Citoarquitectura

Dada la presencia en el TO de diferentes patrones de laminación en varios ordenes de vertebrados⁴, Huber y Crosby introdujeron una terminología basada no sólo en morfología sino en morfología y función, determinando seis estratos fundamentales, desde potencialmente presentes a completamente evidentes en todos los tectums de vertebrados (Huber y Crosby, 1933). Así, con ligeras modificaciones se establece la terminología utilizada para designar la laminación del TO de aves (Cowan et al., 1961), donde se distinguen seis estratos principales, de uno de los cuales se derivan diez láminas celulares y plexiformes alternantes (fig.4) (LaVail y Cowan, 1971).

- **Stratum opticum (SO):** este estrato superficial consiste en fibras mielínicas provenientes de las CGR de la retina contralateral, representando la principal aferencia al tectum.
- **Stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS):** contiene cinco láminas celulares (a,c,e,g,i) y cinco láminas plexiformes (b,d,f,h,j) alternantes. Las últimas contienen prolongaciones dendríticas provenientes de las neuronas en las láminas celulares y de neuronas en estratos más profundos. Las fibras provenientes de la retina abandonan el SO y terminan con diversos patrones de ramificación en las láminas externas del SGFS hasta la lámina f.
- **Stratum griseum centrale (SGC):** este estrato celular contiene grandes neuronas multipolares (40 µm) las cuales representan las principales eferencias del

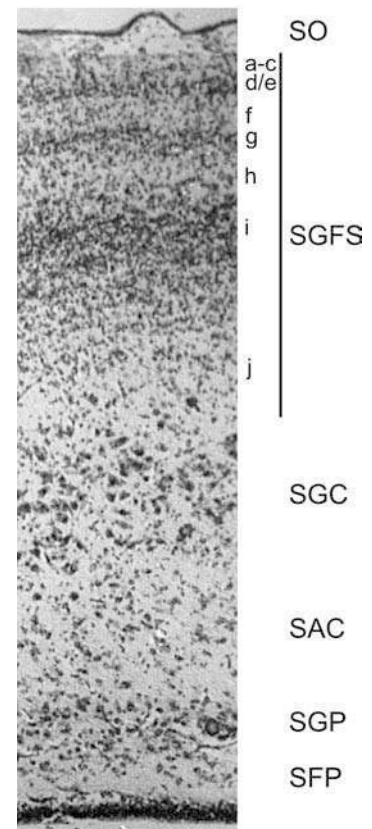


Figura 4. TO de DE18.

Corte de TO con Tinción de Nissl donde se observa el desarrollo citoarquitectónico completamente establecido. stratum opticum (SO), stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS), stratum griseum centrale (SGC), stratum album centrale (SAC), stratum griseum periventriculare (SGP) y stratum fibrosum periventriculare (SFP). Láminas del SGFS: a-j.

⁴ El tectum óptico ha sido objeto de investigación desde el siglo XIX (Stieda, 1869). Ramón y Cajal realizó estudios de textura en varias estructuras del sistema nervioso, entre ellas el TO de aves con los métodos de Golgi y Weigert (Ramón y Cajal, 1889). En este estudio describió en detalle las 15 capas del TO.

tectum y se conocen como células ganglionares. Las dendritas de las células ganglionares pueden extenderse oblicuamente por más de 1000 μm , y alcanzan hasta la lámina c del SGFS. Entre estas se encuentran numerosas células pequeñas de forma estrellada, que presentan dendritas de extensión local.

- **Stratum album centrale (SAC):** gran estrato plexiforme donde se encuentra la mayor parte de las fibras eferentes del tectum, compuestas principalmente por axones de las neuronas ganglionares del SGC.
- **Stratum griseum periventriculare (SGP):** Ocasionalmente se encuentran células que emiten dendritas tanto hacia el SAC como al SFP, como también axones que ascienden al SAC. El SGP contiene vasos de transcurso circunferencial.
- **Stratum fibrosum periventriculare (SFP):** estrato adyacente al epéndimo que recubre el ventrículo, contiene dendritas de las neuronas de SGP; en algunos ordenes presenta fibras amielínicas aferentes.

A grandes rasgos las neuronas presentes en el tectum se pueden dividir en tres grupos (Mey y Thanos, 2000): (1) las células ganglionares del SGC presentan un gran árbol dendrítico que les permite hacer contacto con aferencias retinales como así también con otras neuronas del tectum. Sus proyecciones alcanzan varios núcleos talámicos y del tronco encefálico (Karten et al., 1997). Debido a su gran campo dendrítico y a su respuesta a estímulos visuales de movimiento rápido, se ha sugerido que son componentes esenciales de la detección de movimiento (Luksch et al., 1998). (2) Células piriformes, se encuentran orientadas radialmente y se sitúan en las láminas más profundas del SGFS. Representan las células más abundantes del TO. Sus dendritas se extienden verticalmente a través del SGFS y establecen conexiones con las fibras de la retina. Teniendo en cuenta la limitada extensión lateral de sus dendritas y su gran ramificación en las distintas láminas, estas neuronas posiblemente representen la topografía retinal en el tectum. A su vez podrían integrar información de células que procesan información en dirección horizontal. (3) Células orientadas horizontalmente, abundantes en las láminas superiores del SGFS (a-f). Se caracterizan por presentar dendritas y axones orientados circunferencialmente (LaVail y Cowan, 1971).

III.2.3. Desarrollo

Una vez puesto el huevo, el tiempo de incubación hasta la eclosión ronda los 20-21 días. En líneas generales las aves no voladoras y especialmente los pollos a diferencia de los mamíferos, eclosionan con una maduración que les permite casi valerse por sí mismos. La vía visual es perfectamente funcional, los movimientos son coordinados, y mas allá de un breve aprendizaje inicial su alimentación es independiente de la madre.

III.2.3.1. Estratificación del TO

Como ocurre en la gran mayoría de las estructuras del SNC, el desarrollo del TO puede ser representado por la sucesión de cuatro fases superpuestas: proliferación; migración y diferenciación de los neuroblastos; crecimiento de prolongaciones y sinaptogénesis; muerte celular y refinamiento de conexiones. Particularmente, entre el día tres y el día seis el tectum consiste en neuroepitelio y las primeras células diferenciadas adyacentes a esta lámina. En este período se encuentra la mayor proliferación celular y como resultado el tectum crece considerablemente en superficie aunque muy poco en espesor. A partir del día seis se desarrolla la estratificación, producida por la migración de un gran número de células diferenciadas desde el epitelio neural. Para el final del día doce los seis estratos pueden ser identificados y varias láminas de estos estratos son diferenciables. En esta fase el tectum incrementa su espesor en 4 veces. Entre el día doce y el dieciocho se completa la diferenciación citoarquitectónica en todo el tectum, debido al crecimiento y extensión de prolongaciones de las neuronas en cada lámina (LaVail y Cowan, 1971).

Existen diferencias significativas en la tasa de desarrollo entre, por un lado la porción ventral y dorsal del tectum, y por otro las regiones rostrales y caudales (Cowan et al., 1968). Hasta el momento de la eclosión, en cada estadio se observa que la región ventral a la altura rostral o media del TO se encuentra más avanzada en el desarrollo -a juzgar por su grosor y el número de láminas que contiene- que la región dorsal a la altura caudal. Entre el sexto y decimotavo día de embrionamiento la región rostral se encuentra avanzada en el desarrollo con una distancia aproximada de dos días con respecto a la región caudal (LaVail y

Cowan, 1971). La integración de estos dos ejes independientes de desarrollo resulta en un eje denominado eje del gradiente de desarrollo (en inglés: DGA).

III.2.3.2. Gliogénesis

Son escasos los trabajos que analizan la presencia y distribución de la glía en el TO durante el desarrollo. En animales posnatales se ha observado que los astrocitos del tipo protoplasmático (glutamina sintetasa+ / anhidrasa carbónica C+) presentan una distribución homogénea por todo el TO. Tanto la astrogliá fibrosa (glutamina sintetasa+ / proteína gliofibrilar ácida+) como los oligodendrocitos (glicoproteína asociada a mielina+) se ubican en los dos estratos plexiformes más importantes, el SO y el SAC (Linser, 1985; Galileo, 2003).

Estudios de transferencia génica mediada por retrovirus e inmunomarcación específica han mostrado que en el TO tanto las neuronas como los distintos tipos de glía surgen de un mismo progenitor presente en el neuroepitelio al DE3 (Gray et al., 1988; Galileo et al., 1990; Gray y Sanes, 1992). La diferenciación de la oligodendroglía ocurre a partir del DE12 y comienza en la región ventral del TO, mientras que la glía radial se genera como mínimo hasta el DE8, pudiendo diferenciarse a astrocitos a partir del DE15.

III.2.3.3. Fibras aferentes

La principal vía aferente del TO la constituyen los axones de las CGR (Mey y Thanos, 2000), formando la lámina más superficial del tectum, el SO. Estos ingresan al tectum en el DE6 por la región rostroventral, extendiéndose por todo el polo rostral para el DE9. Desde el DE9 al 12 las proyecciones se expanden caudalmente hasta cubrir toda la superficie tectal (McLoon, 1985). Una vez alcanzada su localización específica, estas fibras modifican su trayectoria y perpendicularmente penetran en las láminas más profundas, donde comienza el proceso de arborización (Crossland et al., 1975; Thanos y Bonhoeffer, 1987; Yamagata y Sanes, 1995). Este proceso ocurre siguiendo el gradiente de desarrollo de manera que se encuentra más avanzado en la región rostroventral con respecto a la caudodorsal.

Algunos axones que ingresan al tectum inmaduro forman contactos del tipo sináptico. En estadios tempranos como DE7 se han encontrado en el tectum rostral axones con vesículas y marca de HRP (McGraw y McLaughlin, 1980; McLoon, 1985). La presencia de sinápsis en este día embrionario ha sido confirmada

por estudios que muestran que la actividad espontánea de las CGR puede ser detectada en el TO a partir del DE7 (Catsicas et al., 1998; Wong et al., 1998; Miyakawa et al., 2004). La actividad espontánea es especialmente alta y sincronizada en el período que va desde el DE13 al 18, período en el que las conexiones en el sistema visual son reorganizadas (Wong et al., 1998). Por otro lado, las primeras respuestas evocadas por estímulos lumínicos ocurren en el DE17 (Rogers, 1995).

III.2.3.4. Barrera hematoencefálica

En el SNC del pollo la barrera hematoencefálica comienza a formarse aproximadamente a partir del DE12 (Wakai y Hirokawa, 1978). Si bien en el TO se han observado marcadores específicos de endotelio que forma barrera hematoencefálica a partir del DE10 (Bertossi et al., 2002), estudios de permeabilidad muestran que ésta comienza a disminuir entre los DE12 y 14, y alcanza una impermeabilidad completa para el DE18 (Roncali et al., 1986).

III.2.4. Día embrionario 12

El DE12 es particularmente interesante para el estudio en embriones debido a las siguientes características: primero, para el DE12 (estadio 38 de HyH⁵) la proliferación disminuye significativamente en el epitelio neuronal a partir del cual se derivan todas las láminas celulares (Cowan et al., 1968); segundo, a pesar de que la estructura citoarquitectónica esté lejos de ser definitiva, los seis estratos mayores reconocidos por Huber y Crosby (Huber y Crosby, 1933) son claramente identificables en este DE; tercero, para este estadio las fibras provenientes de la retina han invadido todas las partes del tectum (De Long y Coulombre, 1965); cuarto, ha sido demostrado que hasta el DE12 el desarrollo de la estratificación del tectum es independiente de influencias tróficas provenientes del ojo (Kelly y Cowan, 1972).

Para describir la citoarquitectura del DE12 adoptamos la nomenclatura propuesta por Scicolone (Scicolone et al., 1995), donde las láminas pueden estar designadas como compartimentos transitorios -contienen células migrando desde sitios donde son generadas a sitios donde finalmente se establecerán- o con su

⁵ En el año 1951 Viktor Hamburger y Howard Hamilton realizaron una caracterización del embrionamiento del pollo, que divide los 20-21 días hasta la eclosión en 46 estadios basados en caracteres diagnósticos prominentes propios de las diferentes etapas de desarrollo (Hamburger, 1951).

denominación de estado maduro -contienen esencialmente la población celular definitiva-.

En la región media del eje del DGA estas láminas son designadas de la siguiente manera desde la superficie hacia el ventrículo (fig.5):

- Stratum Óptico (SO): lámina superficial y de carácter plexiforme.
- Compartimento Celular Transitorio 3 (CCT3): lámina celular transitoria que posteriormente dará lugar a las 7 láminas más superficiales del SGFS (a-g) en el TO maduro.
- Compartimento "h-i-j" (C" h-i-j"): dará lugar a las láminas h, i y j del SGFS en el TO maduro. Proviene del mismo compartimento transitorio (CCT2) que origina a la lámina superficialmente contigua CCT3.
- Stratum Griseum Centrale (SGC): lámina celular que mantiene al igual que SAC el nombre de la lámina madura, aunque en el DE12 es llamada compartimento SGC.
- Stratum Album Centrale (SAC): esta lámina plexiforme se delinea a partir del DE7 luego de la primer ola migratoria.
- Zona subVentricular (ZsV): las células de esta zona son migrantes desde la ZV. Posteriormente esta lámina dará lugar al SGP en el TO maduro. Entre la ZsV y la ZV, ambas láminas celulares, se encuentra una angosta lámina plexiforme que originará el SFP.

- Zona Ventricular (ZV): las células de esta zona provienen de la zona germinal luego de la finalización de la proliferación para el DE9. A partir del DE14 las células que permanecen en esta lámina se diferenciarán a células endimarias.

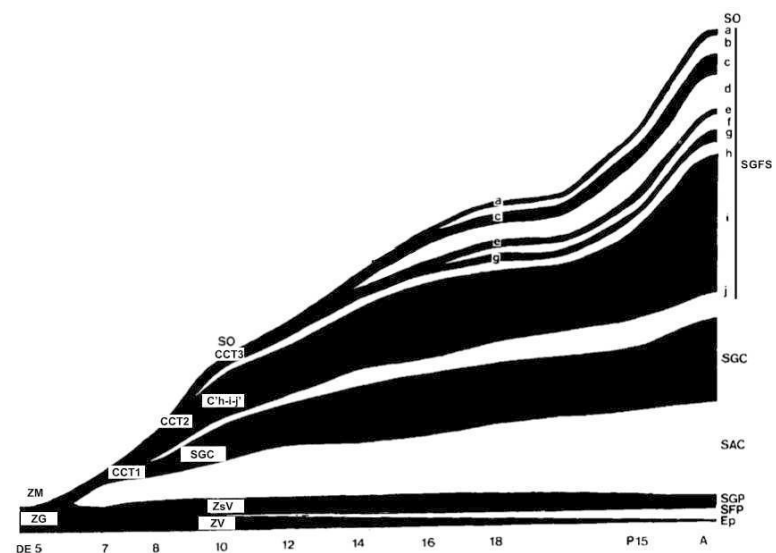


Figura 5. Evolución citoarquitectónica del TO durante el desarrollo. Se detallan: zona marginal (ZM), zona generativa (ZG), epéndimo (Ep), post-natal 15 (P15), adulto (A). Adaptado de Scicolone et al., 1995.

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis fue analizar el daño estructural producto de una hipoxia -en embriones de aves- y comparar las características morfológicas y bioquímicas entre la muerte celular inducida por un evento de hipoxia y la muerte celular propia del desarrollo.

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar la citoarquitectura del tectum óptico en el día embrionario 12, mediante el análisis de los tipos celulares presentes en cada lámina, sus densidades y la cuantificación de la muerte celular propia del desarrollo.
- Analizar el efecto de la hipoxia sobre el tectum óptico, mediante la cuantificación de la muerte celular en cada lámina a través del tiempo.
- Estudiar la influencia de las aferencias provenientes de la retina sobre la muerte celular propia del desarrollo y sobre la muerte celular producto de una hipoxia.
- Caracterizar morfológicamente la evolución de ambos procesos de muerte, mediante la búsqueda de diferencias que los permitan identificar.
- Evaluar la participación de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca como ejecutoras de la muerte celular propia del desarrollo y la muerte producto de una hipoxia.
- Analizar el rol de la vía de supervivencia PI3K/Akt en el daño hipóxico.
- Desarrollar un modelo de hipoxia y administración de drogas en embriones *ex ovo*.
- Evaluar los efectos neuroprotectores y la vía de acción del estradiol administrado luego de un evento hipóxico.

MATERIALES & METODOS

I. Animales

Se utilizaron embriones de pollos libres de todo patógeno, de la especie *Gallus gallus domesticus*, pertenecientes a la raza White Leghorn. Dentro del período de una semana de la puesta y mantenidos a una temperatura aproximada de 18 °C, los huevos fértiles fueron colocados en una incubadora de aire forzado (Franken), a una temperatura constante de 38,5 °C y una humedad ambiente de aproximadamente 60%. El volteo automático de los huevos se realizó cada hora, a fin de impedir la alteración en el intercambio normal de O₂ (Tazawa, 1980).

II. Tratamiento hipóxico

Los huevos fértiles de DE12 fueron colocados en una cámara plástica con una capacidad aproximada de 10 litros, 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 8% O₂ y 92% N₂, con la válvula de escape de gases abierta, para permitir el lavado del aire normóxico existente en la cámara. A continuación se redujo el flujo a 4 l/min, se cerró la válvula de escape y se mantuvo el flujo durante una hora. El escape de gas en exceso se produjo mediante una válvula de retención que permitió la salida del mismo sin la entrada del aire atmosférico y sin aumento de la presión interna de la cámara hipóxica. Un depósito de agua destilada en la base de la cámara se utilizó para mantener la humedad relativa en 60%. También se colocó un reservorio con CaO₂H₂ dentro de la cámara para absorber el CO₂ formado durante el tratamiento y así impedir su acumulación. Este modelo fue puesto a punto y validado en nuestro laboratorio (Rodríguez Gil et al., 2000).

Luego del tratamiento hipóxico los animales fueron devueltos a la incubadora y/o procesados según el estudio realizado. Los embriones que sirvieron como controles fueron aquellos que no fueron sometidos al tratamiento hipóxico.

III. Administración de drogas *in ovo*

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.

El estradiol (0,5 mg/huevo) fue diluido en aceite de maíz filtrado (vehículo). El antagonista ICI 182,780 (5mg/huevo) fue administrado junto al estradiol o en vehículo.

Tres cantidades distintas de bpv(phen) fueron administradas (0,2 , 2 y 20 ug/huevo) diluidas en solución fisiológica. En todos los casos el volumen final inyectado fue de 100 ul.

Con el fin de hacer una extrapolación con otros modelos el volumen del huevo se estandariza en 50 ml.

IV. Técnica histológica

Los embriones fueron decapitados, e inmediatamente se procedió a disecar el encéfalo. Estos fueron fijados mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS durante 12 horas a 4 °C. A continuación separamos los LO del prosencéfalo, se lavaron 3 veces en PBS y se procedió a deshidratarlos con pasajes sucesivos por una serie de alcoholes de concentración creciente, seguido de inmersión en xilol. Luego los LO inmersos en una solución 50% xilol - 50% parafina se colocaron en estufa a 58 °C durante 1 hora, seguido de 3 pasajes por 100% parafina de 40 min cada uno. Se armaron los tacos a temperatura ambiente, donde los LO se colocaron de forma que las secciones del TO fueran paralelas al DGA. Finalmente se cortaron en un micrótopo secciones de 5 µm, y se montaron en portaobjetos xilenizados. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta su utilización. Pevio a cualquier ensayo se procedió a desparafinizar los cortes, realizando tres pasajes por xilol durante 10 min cada uno; luego se rehidrataron con pasajes sucesivos por una serie de alcoholes de concentración decreciente, para quedar finalmente en PBS.

V. Tinción de Nissl

Los cortes fueron teñidos con una solución de violeta de cresilo (0,1% en H₂O destilada) durante 5 minutos. Luego fueron lavados en H₂O destilada y diferenciados en etanol al 95% por 10 min. Posteriormente se deshidrataron y montaron con bálsamo de Canada.

VI. Tinción de Hoechst

Los cortes fueron incubados en oscuridad con una solución de Hoechst (2 µg/ml) en PBS durante 10 min. Se lavó con PBS y se montó con medio de montaje para fluorescencia de Dako. En los casos en los que se usó como tinción de contraste se realizó el mismo procedimiento luego de la inmunofluorescencia o del ensayo de TUNEL.

VII. Inmunomarcación

VII.1. Inmunofluorescencia

Los cortes fueron sometidos a un proceso de recuperación antigénica que se realizó incubándolos a 95 °C en buffer citrato (citrato de sodio 10 mM en PBS, pH 6,0 / Tween 20 0,05%) durante 40 min. La unión inespecífica del anticuerpo fue bloqueada incubando con suero normal de cabra al 5% en PBS-TX (PBS 0,1 M pH 7,4 / Triton X-100 0,03%) durante 30 min. El anticuerpo primario se diluyó en PBS-TX (anti-caspasa-3 clivada, 1:75; anti-NeuN, 1:500) y se incubaron los cortes toda la noche a 4 °C. Luego se incubó con anticuerpo secundario diluido en PBS-TX (anti-conejo conjugado con Cy2, 1:100; anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 594, 1:200; orden respectivo a los anticuerpos primarios) durante 2 horas a 37 °C. Se realizó una tinción de Hoechst y se montaron con medio de montaje que preserva fluorescencia.

VII.2. Coinmunofluorescencia

El protocolo de coinmunofluorescencia sigue básicamente los mismos pasos que la inmunofluorescencia a excepción de los siguientes cambios. La unión inespecífica del anticuerpo fue bloqueada incubando con suero normal de cabra al 1%, diluido en PBS-TX durante 30 min. Los anticuerpos primarios se codiluyeron en PBS-TX (anti-caspasa-9 clivada, 1:70; anti-citocromo c, 1:200) y se incubaron los cortes toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos secundarios se codiluyeron en PBS-TX (anti-conejo conjugado con Cy2, 1:100; anti-ratón conjugado con Cy3, 1:200, respectivamente) y se incubaron durante 2 hs a 37 °C.

VII.3. Inmunohistoquímica

El protocolo siguió los mismos pasos que la inmunofluorescencia hasta la incubación con el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se diluyó en PBS-

TX (anti-GFAP, 1:1000) y se incubaron los cortes toda la noche a 4 °C. Luego se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% en PBS por 10 min. El anticuerpo secundario diluido en PBS-TX (anti-conejo conjugado con biotina, 1:500) fue incubado durante 2 horas a 37 °C. Fue seguido por una incubación con streptavidina/HRP (1:400) durante 30 min. Luego los cortes fueron incubados con una solución de DAB (DAB 0,05% en PBS / H₂O₂ 0,015%) durante 2 min. Finalmente las secciones fueron deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá.

VIII. Técnica de TUNEL

Para realizar el ensayo de TUNEL se utilizó un kit fluorométrico y se siguieron las instrucciones del fabricante (Promega). Los cortes fueron incubados en una solución de proteinasa K (TrisHCl 0,1 M / EDTA 50 mM / proteinasa K 20 µg/ml) durante 15 min para exponer el ADN enrollado en nucleosomas. Luego se incubaron en buffer de equilibrio durante 10 min y posteriormente se incubó con buffer de reacción (por corte: 50 µl buffer de equilibrio / 5 µl de mezcla de nucleótidos: dUTP conjugados con fluoresceína y ATP / 1 µl de deoxinucleotidil transferasa terminal) durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo con la solución SSC 2X, incubada por 15 min. Se realizó una tinción de contraste y se procedió al montaje con medio de montaje que preserva fluorescencia.

IX. Western Blot

IX.1. Obtención de fracción total

Los embriones fueron sacrificados por decapitación, los LO rápidamente removidos y se procedió mediante el uso de una lupa a separar el TO del LO, como así también remover en lo posible las meninges (este proceso se realiza manteniendo el frío). Así, los TO son homogenizados en un potter con buffer de homogenización (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 137 mM , EDTA 2 mM, Tritón X-100 1%, glicerol 10%) con inhibidores de fosfatasas (NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM) e inhibidores de proteasas (leupeptina 1 µM, aprotinina 1 µM, pepstatina A 1 µM, PMSF 1 mM). Las muestras fueron centrifugadas a 12.500 g por 30 min, y el sobrenadante (fracción total) alicuotado y guardado a -20°C. La concentración de

proteína fue determinada por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), usando seroalbúmina bovina como estándar.

IX.2. Electroforesis y electrotransferencia

Las muestras fueron desnaturalizadas en buffer de muestra (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.002%) a 100 °C durante 10 min y separadas en geles de poliacrilamida-SDS, concentrador 5% (H₂O, Tris HCl 0,5 M pH 6,8, Acrilamida/Bis 30%, SDS 10%, APS 10% y Temed, en proporciones H₂O/Acril tal que 5%) y separador de 10 a 15% de poro (Idem concentrador salvo Tris HCl 1,5 M pH 8,8), conteniendo 20 a 80 μ g de proteína por calle durante aproximadamente 2 hs (20 mA/30 min para concentrador + 25 mA/90 min para separador). Las proteínas son electroforéticamente transferidas desde el gel a membranas de PVDF a 100 V durante 90 min.

IX.3. Blotting y revelado

Antes de la exposición a anticuerpos específicos se realizó un bloqueo con una solución de PBS-T (PBS 1X-Tween 20 0.05%) al 5% de leche descremada y 1% de glicina, agitando durante 1 h. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (anti-caspasa-8, 1:600; anti-Akt, 1:1000; anti-pAkt, 1:700; anti-pTyr, 1:1000; anti-actina, 1:1000) en PBS con BSA 1% toda la noche en agitación a 4°C. Luego las membranas se lavaron (PBS-T) e incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (1:1000) diluidos en PBS con BSA 1% durante 2 hs a temperatura ambiente.

Todos los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados por exposición de las membranas a un kit de detección para quimioluminiscencia (ECL). Las membranas fueron visualizadas por exposición a placas autoradiográficas, y las placas reveladas y fijadas con soluciones apropiadas. Finalmente se escanearon y se cuantificaron densitométricamente.

X. Microscopia electrónica

Para estudios exclusivamente ultraestructurales los LO fueron disecados y fijados en una solución de Glutaraldehido al 3% en buffer fosfato (PB) 0,1 M durante toda la noche. Posteriormente fueron incluidos en agarosa al 4% en PB y cortados en un vibratomo en secciones de 200 μ m. Sobre estos cortes se seccionó

la región media del eje dorso-ventral y del eje rostro-caudal del TO. Estos cortes de aproximadamente 2 mm x 1mm fueron lavados con sacarosa fosfato 0,32 M y fijados con OsO₄ al 1,5% en PB durante 2 horas. Posteriormente se procedió a lavar con H₂O bidestilada y sumergir en solución acuosa de Acetato de Uranilo al 2% durante toda la noche. Se realizó una deshidratación en una serie de alcoholes de concentración creciente y se hizo una preinclusión en 1:1 de resina epoxy-oxido de propileno durante dos horas. Luego se incluyó en resina epoxy durante toda la noche y se procedió a la polimerización de la resina en estufa a 60 °C durante 3 días. Los tacos fueron cortados en ultramicrótomo y se obtuvieron secciones semifinas de 0,5 µm que fueron teñidas con azul de toluidina y montadas en portaobjetos para ser visualizadas con microscopia óptica. Por otro lado se obtuvieron cortes finos levantados en grillas de cobre, coloreados con solución acuosa de Acetato de Uranilo al 2% durante 30 min y finalmente teñidos con solución de Reynolds.

Para estudios con inmunohistoquímica se hicieron las siguientes modificaciones sobre el protocolo anterior. Los LO fueron fijados en una mezcla de PFA al 4% y Glutaraldehído al 0,25% en PB 0,1 M durante 6 horas. Luego de la inclusión y corte en vibratomo las secciones de 200 µm fueron sometidas a una recuperación antigénica en buffer citrato a 65 °C durante 30 min. Se continuó con una inmunohistoquímica (cfr. MyM. VII.3) con anticuerpos primarios anti-caspasa 3 (1:60) o anti-citocromo C (1:60) durante 3 días. Una vez revelada la inmunohistoquímica con DAB, se continuó como se detalla anteriormente a excepción del fijado con OsO₄, el cual se realizó durante 30 min a una concentración del 1%.

Las grillas fueron analizadas en el microscopio electrónico Zeiss EM 109T y las imágenes fueron tomadas con una cámara analógica de 35 mm incluida en el microscopio, pasadas a positivos y reveladas en papel fotográfico.

XI. Cultivo neuronal primario

Previamente al cultivo, placas de 35 mm fueron tratadas con Poly-L (100 µg/ml en DMEM), permaneciendo a 4 °C toda la noche. Luego fueron lavadas con PBS estéril y cubiertas con laminina (0,02 µg/µl en H₂O MilliQ) durante 2 hs. Posteriormente se lavaron y permanecieron en estufa de cultivo (37 °C / 5% CO₂) hasta ser sembradas.

Brevemente la disociación a partir de tejido consiste en los siguientes pasos: se disecan los LO, se separan con ayuda de una lupa los TO y estos se cortan en porciones pequeñas. Se resuspende el tejido en una solución que contiene HANKs suplementada con glucosa (90 µg/ml), se pasa a un eppendorf y se deja decantar. Luego se retira el sobrenadante, se resuspende en una solución conteniendo DMEM, tripsina (0,125 X) y glucosa (90 µg/ml) y se lleva a un baño a 37 °C durante 30 min agitando cada 2 min. Se agrega DNAasa (25 µl de 2mg/ml) manteniéndolo a 37 °C durante 2 min. Posteriormente se extrae del baño y se agrega 50% volumen de suero fetal bovino (SFB), centrifugando a 200 g durante 2 min. Se extrae el sobrenadante y se resuspende en una solución conteniendo HANKs, glucosa 90 µg/ml y DNAasa 25 µl de 2 mg/ml, y con la ayuda de una micropipeta se disocia aún más el tejido. Se centrifuga 5 min a 200 g y retira el sobrenadante reemplazándolo por medio de cultivo (DMEM, N2, glutamina 2 mM y Penicilina/Streptomycin). Luego de contar el número de células en una cámara de Neubauer, se siembran aproximadamente 30 millones de células por placa.

El ensayo de bpv(phen) se realizó de la siguiente manera: Luego de tres días *in vitro* retiramos el medio de cultivo reemplazándolo por medio nuevo con bpv(phen) 50 µM (20 µg/ml). En el caso del control se reemplazo con medio de cultivo nuevo y fueron incubados en estufa durante 30 min para luego proceder a la homogenización (cfr. MyM. IX).

XII. Enucleación

El procedimiento de enucleación en embriones de pollo ha sido utilizado desde mediados del s.XX (Filogamo, 1950; Cowan et al., 1968), sin embargo a pesar de ser un procedimiento frecuente y varias veces citado, no figura en detalle en ninguno de los trabajos. De esta manera, el protocolo puesto a punto por nosotros consiste resumidamente en los siguientes pasos.

Los huevos fértiles se ponen a incubar y en el DE 3 (aprox. estadio 21 HyH) se realiza la intervención. Este estadio es importante porque comienza la pigmentación del ojo, y por lo tanto puede ser claramente identificado. Se coloca el huevo en posición vertical y se visualiza en el extremo romo la cámara de aire utilizando una luz que atraviese el huevo. Así se delinea la cámara de aire y se pro-

cede con una sierra a hacer una ventana circular, de la cual se retira completamente la cáscara. En la base de la cámara de aire se encuentra la membrana interna de la cascara, opaca de color blanco. Se extrae con la ayuda de tijeras y pinza. Una vez retirada se observa el embrión exponiendo el lado derecho y rodeado por dos membranas vitelinas transparentes, las cuales separan al embrión con la yema del albumen. Mediante una pinza diente de ratón se procede a destruir la vesícula óptica derecha, teniendo especial cuidado en romper lo menos posible las membranas vitelinas. A diferencia de lo que se espera, la ruptura de estas membranas y no la destrucción del ojo es la causa del aumento en los días posteriores de la mortalidad de los embriones. Luego se procede a cerrar la ventana con cinta hipoalergénica y se devuelve el huevo a la incubadora para continuar con el desarrollo, en posición vertical y sin volteo.

XIII. Cultivo ex ovo

El cultivo de pollos *ex ovo* consiste en reemplazar la cascara de huevo por una placa de petri que permite llevar adelante el desarrollo del embrión fuera del huevo, posibilitando el uso de técnicas como microinyección, *grafting* y estudios de angiogénesis y tumorigénesis.

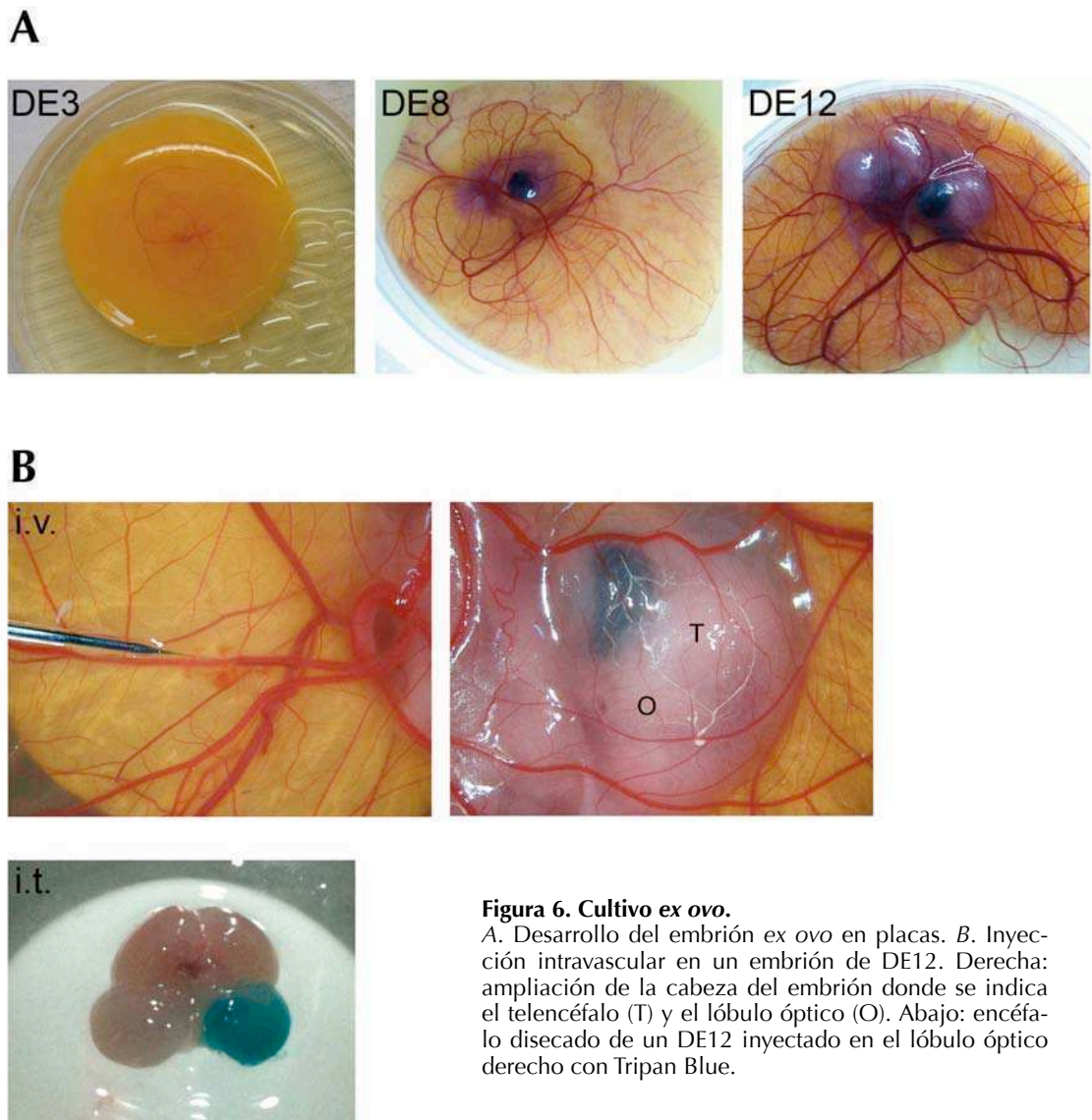
Los huevos fértiles son colocados en la incubadora (cfr. MyM. I) y se dejan durante 62-72 hs (este tiempo fue determinado analizando la eficiencia del pasaje a las placas, en tiempos mayores a 72 hs tiende a romperse la membrana vitelina). Pasado este tiempo se procede a limpiar la cascara con un papel humedecido con etanol 70%, y se dejan reposar en la incubadora en posición horizontal (sin volteo) durante una hora, marcando con un lápiz el lado que queda hacia arriba. En este tiempo, el embrión mediante la chalaza migra hacia la parte superior del huevo. Para el pasaje a la placa se utiliza una barrita metálica (del tamaño de una birome o de un agitador) en lo posible triangular, y una placa de petri plástica de 9 cm de diámetro y 2 cm de alto. Inmediatamente antes del pasaje se retira el huevo de la incubadora (es importante que el huevo mantenga su posición horizontal con la parte marcada con lápiz hacia arriba todo el tiempo) y se procede a abrir la cáscara: con la barrita metálica con la base apoyada sobre la mesada y el ápice hacia arriba se toma el huevo horizontal con ambas manos y los dedos opuestos tocándose las yemas. Con un movimiento rápido y seco se golpea el

huevo en la zona inferior que queda entre los dos pulgares contra el ápice de la barrita. Luego del golpe comienza a filtrar albumen por la rotura, con las dos manos como estaban se presenta el huevo sobre la placa de petri y tirando gradualmente con los dos pulgares hacia afuera se comienza a abrir la hendidura liberando más albumen hasta que la cascara se abre en dos liberando todo el contenido y quedando en cada mano una hemicascara. Si bien este proceso tiene una curva de aprendizaje, la eficiencia una vez aprendido es de entre 60-80% de los huevos. Comúnmente los embriones pasados a las placa que sufren rotura de la membrana vitelina en las primeras horas no logran sobrevivir y son descartados. El pasaje se puede realizar en un ambiente limpio y no necesariamente estéril.

Enseguida de traspasado el embrión a la placa, se tapa y se coloca en una incubadora a 38 °C y 50-60% de humedad en oscuridad sobre una superficie plana. La incubadora puede no tener ventilación forzada (como en nuestro caso) y es conveniente utilizar una incubadora exclusivamente para este procedimiento. Así, el embrión se deja desarrollar hasta el momento de su utilización (fig.6A).

Dos observaciones importantes relacionadas con la evolución del embrión *ex ovo*:

- Hemos observado una tendencia a un retraso relacionado con la tasa de desarrollo, encontrando en el caso más extremo al DE12 embriones correspondientes a DE11. Esto se remedia dejando incubar un tiempo más el embrión.
- La mortalidad de los embriones en cultivo al DE12 ronda el 40% de los que pasaron a placas exitosamente (sin rotura de membrana vitelina). Obviamente con tiempos de incubación más cortos la mortalidad es menor.



XIII.1. Administración de drogas

La administración de drogas en cultivos de pollos ex ovo se puso a punto para dos vías distintas: intravascular e intratectal. Las ventajas de este tipo de administración frente a la que se utiliza *in ovo* son:

- Las drogas utilizadas pueden ser lipofílicas o hidrofílicas.
- Las cantidades o concentraciones a inyectar son menores (cfr. MyM. III.), si se tiene en cuenta que el peso del embrión (aprox. 10 grs al DE12) es bastante inferior al del huevo entero (70 grs. aprox.), y que la dilución de la droga es menor.

- La incorporación a la circulación sanguínea es inmediata y no gradual como *in ovo*.
- En el caso de administración intratectal se pueden inyectar moléculas como anticuerpos o moléculas que son rápidamente metabolizadas por el hígado, que de otra forma son imposibles de utilizar.

XIII.1.1. Intravascular

Para realizar la inyección intravascular se utilizó una lupa esteroescópica, un micromanipulador y un microinyector. Con un puller y un capilar se genera la aguja y se carga con 4 μ l de solución de la droga a inyectar con 5% de Tripán Blue para asegurarse que se inyecta dentro del vaso. A su vez se le hace una marca a la punta del capilar con una fibra para poder guiarse al momento de ingresar al vaso. El vaso a inyectar corresponde a la circulación extraembrionaria, específicamente los vasos vitelinos. De estos se eligen venas (retorno de la circulación vitelina al embrión) que se caracterizan por presentar un color rojizo más claro que las arterias (además, con la lupa se puede ver el sentido de la circulación). Es importante elegir una zona alejada del embrión ya que los movimientos del mismo dificultan el procedimiento. Con una pipeta pasteur se hidrata con solución fisiológica la zona a inyectar y con el micromanipulador se empuja el vaso con impulsos rápidos hasta que es atravesado por el capilar (el sentido del capilar siempre debe ser a favor de la circulación). El capilar normalmente atraviesa el vaso por completo, se retira lentamente el capilar hasta que la punta queda dentro de la vena (en este punto sirve como guía la marca en la punta del capilar). Así, se procede a inyectar la solución, primero en pulsos para verificar que efectivamente se está dentro del vaso y luego se descarga el resto (fig.6B).

XIII.1.2. Intratectal

Los instrumentos para realizar la inyección intratectal son los mismos que para la intravascular. Hemos probado a realizar el mismo procedimiento con jeringas Hamilton y si bien es más complicado al momento de la inyección, también es factible. Debido a la rotación del embrión durante su desarrollo es frecuente encontrar el lado derecho expuesto hacia arriba y el izquierdo hacia la base de la placa. Se carga el capilar con 2 μ l de la solución a inyectar conteniendo 5% de Tripán Blue. El problema específico de éste método es que no existe un

estereotáxico que permita determinar coordenadas y profundidad, además del movimiento propio del embrión. Por este motivo establecimos como referencia el oído externo y el ojo del mismo lado, y se procede a ingresar con el capilar en la región que surge de una línea imaginaria entre la región dorsal del ojo dirigida caudalmente hasta pasar un par de milímetros el oído. El capilar ingresa unos tres a cuatro milímetros y se descarga la solución lentamente. Al momento de la disección se confirma la localización de la inyección por la presencia de Tripan Blue (fig.6B).

Hemos confirmado que ni el procedimiento de inyección ni el volumen inyectado genera mortalidad ni cambios tisulares con tinción de Nissl hasta 7 hs posteriores.

XIII.2. Tratamiento hipóxico

El tratamiento hipóxico *ex ovo* se realizó manteniendo las mismas condiciones que el tratamiento *in ovo* (cfr. MyM. II.) (i.e. Concentración de O₂, tiempo, humedad, presión). Para esto se utilizó una cámara plástica de 24 cm de largo, 8 cm de alto y 13 cm de profundidad, la cual cabe en un baño térmico. A la cámara se le agregaron dos válvulas regulables en apertura, una para el ingreso del gas y otra para la salida. Brevemente, antes de la hipoxia se coloca un paño humedecido con abundante H₂O destilada en la base de la cámara y se coloca cerrada en el baño térmico a 38-39°C durante 15 min para equilibrar la temperatura. Pasado este tiempo se colocan las placas con los embriones (entran hasta cinco en esta cámara), se cierra y se procede a abrir el ingreso de la mezcla gaseosa a 2 l/min con la válvula de escape completamente abierta. Con un oxímetro se confirmó que en 30 seg este flujo equilibra la concentración de oxígeno dentro de la cámara a 8%. Luego se cierra la válvula de salida dejando un leve escape libre y se baja desde el reductor del tubo de gas el flujo de manera que exista una circulación mínima dentro de la cámara (el pequeño volumen de la cámara, hace que un flujo demasiado alto provoque una disminución de la humedad). El uso de cámaras plásticas blandas herméticas es ideal ya que cualquier aumento en la presión interna puede ser constatado por una deformación de la cámara. Así, se mantiene durante 60 min. en el baño tapado controlando que la temperatura sea constante

38-39 °C. Una vez pasada la hora se retiran las placas y se devuelven a la incubadora.

La mortalidad de este tratamiento es nula para embriones de DE12, confirmada hasta 24 hs post-hipoxia. La técnica fue validada con parámetros que se ven modificados de la misma forma en tratamiento hipóxico *in ovo* (cfr. fig.24C1 y C2 y fig.25B). Además, las cuantificaciones absolutas de células TUNEL+ observadas en TO de embriones *ex ovo* 6 hs post-hipoxia no difieren de las observadas en TO de embriones *in ovo* 6 hs post-hipoxia (cfr. fig.25C2 vs fig.26).

XIV. Cuantificación celular

En todos los análisis de cuantificación celular (y también caracterización) partimos de cortes de LO realizados paralelos al DGA (cfr. MyM. IV). Teniendo en cuenta la variabilidad que impone el desarrollo realizamos las cuantificaciones en la región media de ambos ejes (i.e. rostro-caudal, dorso-ventral). Respecto a cuantificaciones que requerían el análisis de características morfológicas (i.e. figuras anómalas y distribución de citocromo c) tomamos imágenes de 600X o 400X de magnificación. Cada unidad experimental surge de la media de al menos ocho imágenes independientes que normalmente corresponden a secciones independientes. Las cuantificaciones que no requerían de análisis morfológicos (fundamentalmente los análisis exclusivos de TUNEL) fueron realizadas sobre imágenes de 200X o mosaicos de imágenes de esta magnificación. En algunos casos realizamos conteo manual, mientras que en otros (ensayo de enucleación) pusimos a punto en el programa ImageJ una cuantificación automatizada. La variable lámina del TO siempre fue tomada en cuenta (la densidad celular en la región cercana a la pía es mucho mayor que la ventricular), y en este sentido las imágenes fueron distribuidas equilibradamente intertratamiento. Independientemente de la forma del conteo cada unidad experimental se generó de la media de como mínimo seis imágenes independientes.

Otra variable tomada en cuenta fue la densidad celular que se ve modificada según pequeñas variaciones que no se pueden controlar en el grosor de los cortes. En conteos en imágenes de 400X o 600X la densidad se analizó por conteo manual. En el caso de magnificaciones de 200X la densidad celular se determinó

automatizando el análisis. Donde no se explicita, las cuantificaciones fueron relativizadas a la densidad.

XV. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se explicitan en los epígrafes de cada figura. Brevemente, para comparar tres o más grupos se realizaron análisis de ANOVA de una vía o dos vías cuando dos factores estaban presentes. Las pruebas de Dunnett o Bonferroni a posteriori se realizaron para detectar significancias entre los grupos. En los casos de comparación entre dos grupos se realizó la prueba de t de Student. Los supuestos de normalidad y homocedacia fueron comprobados.

Para la comparación de distribución de frecuencias de morfologías entre tratamientos se utilizó la prueba de chi-cuadrado.

La significancia estadística fue establecida para $P < 0,05$.

XVI. Programas

Todos los análisis cuantitativos (incluidos los densitométricos) y morfológicos, como así también el manejo de las imágenes se realizó con el programa de dominio público ImageJ.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Prism de GraphPad Software, San Diego, CA, USA.

XVII. Anticuerpos e Insumos

Los anticuerpos e insumos utilizados fueron adquiridos de los siguientes proveedores:

- Hoechst 33258 / Sigma, USA.
- anticuerpo contra la subunidad p17 de caspasa-3 activa / Chemicon, USA.
- anticuerpo contra proteína nuclear específica de neurona (NeuN) / Chemicon, USA.
- anticuerpo contra caspasa-9 clivada / Cell Signaling, USA.
- anticuerpo contra citocromo c / Chemicon, USA
- anticuerpo contra Akt / Cell Signaling, USA
- anticuerpo contra pAkt (Ser473) / Cell Signaling, USA
- anticuerpo contra la subunidad p18 de caspasa-8 activa / Santa Cruz, USA

- anticuerpo contra p-Tirosina / Upstate, USA
- anticuerpo contra actina / Chemicon, USA
- anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP / Chemicon, USA
- anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP / Chemicon, USA
- anticuerpo anti-conejo conjugado con Cy2 / Chemicon, USA.
- anticuerpo anti-ratón conjugado con Cy3 / Chemicon, USA.
- anticuerpo anti-conejo F(ab) conjugado con Alexa Fluor 594 / Invitrogen, USA.
- anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) / Sigma, USA.
- anticuerpo anti-conejo conjugado con biotina / Dako, USA.
- 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidrocloreuro (DAB) / Sigma, USA.
- Streptavidina/HRP / Sigma, USA
- TUNEL / Promega, USA
- ECL / Amersham Pharmacia Biotech, USA
- X-Ray film Ortho CP-G Plus / Agfa-Gevaert S.A., Arg
- PVDF / Millipore, USA
- Estradiol / Dispert, Arg
- ICI 182,780 (Fulvestrant) / Astra Zeneca, Arg
- bpv(phen) / Calbiochem, USA
- D-MEM/F-12 / Invitrogen, USA
- HANKs / Sigma, USA
- N2 supplement / Invitrogen, USA

RESULTADOS

I. Efectos de la Hipoxia sobre el TO

I.1. Estudios preliminares

I.1.1. Caracterización morfológica de núcleos

El estudio de un fenómeno que ocurre en las células como es la muerte, requiere entre otras cosas de una identificación morfológica que permita distinguir características normales de patológicas. Existen estudios histológicos antiguos pero detallados sobre el TO (cfr. Intro. III.2.2), sin embargo la caracterización nuclear esta ausente. Con el fin de conocer la composición celular característica de cada lámina como así también adquirir una noción general de la estructura en cuestión, procedimos a caracterizar los núcleos presentes en el TO al DE12. Analizamos las morfologías nucleares, las cuales fueron categorizadas en: células de tejido nervioso, células endoteliales, eritrocitos o células mitóticas (fig.7).

Los núcleos de tejido nervioso observados en cada lámina fueron:

CCT3

- Tipo I: núcleos redondos de aproximadamente 5 μm de diámetro con 2 a 5 nucléolos y cromatina que suele presentar niveles medios o altos de condensación (con hoechst la condensación se observa como brillo). Estas células son las más abundantes de esta lámina.

- Núcleos ovoides o alargados con su eje mayor transversal a la lámina.

A veces se observan en hileras de 2 o 3 núcleos. El resto de las características es similar al Tipo I. Parecerían ser células migrantes.

- Tipo II: núcleos redondos mayores a 6 μm de diámetro con 2 a 5 nucléolos y cromatina con niveles entre medios y bajos de condensación. Estas células son menos abundantes y se observan principalmente en la región inferior de la lámina.

C'h-i-j'

- Tipo I.

- Tipo II. Su abundancia es mayor que la que presenta en la lámina CCT3.

SGC

- Tipo I.

- Tipo III: núcleos redondos de diámetro mayor a 9 μm , con 2 a 4 nucleolos y cromatina de condensación baja (tenues). Corresponden a neuronas multipolares.

ZsV

- Tipo I: núcleos de forma redondeada u ovoide, con aproximadamente 5 μm de diámetro y 2 o 3 nucléolos. Cromatina de condensación media.
- Tipo II. Su presencia es escasa.
- Células endoteliales: bajo el límite inferior de la ZsV se encuentra la zona ventricular con una empalizada de células endoteliales.

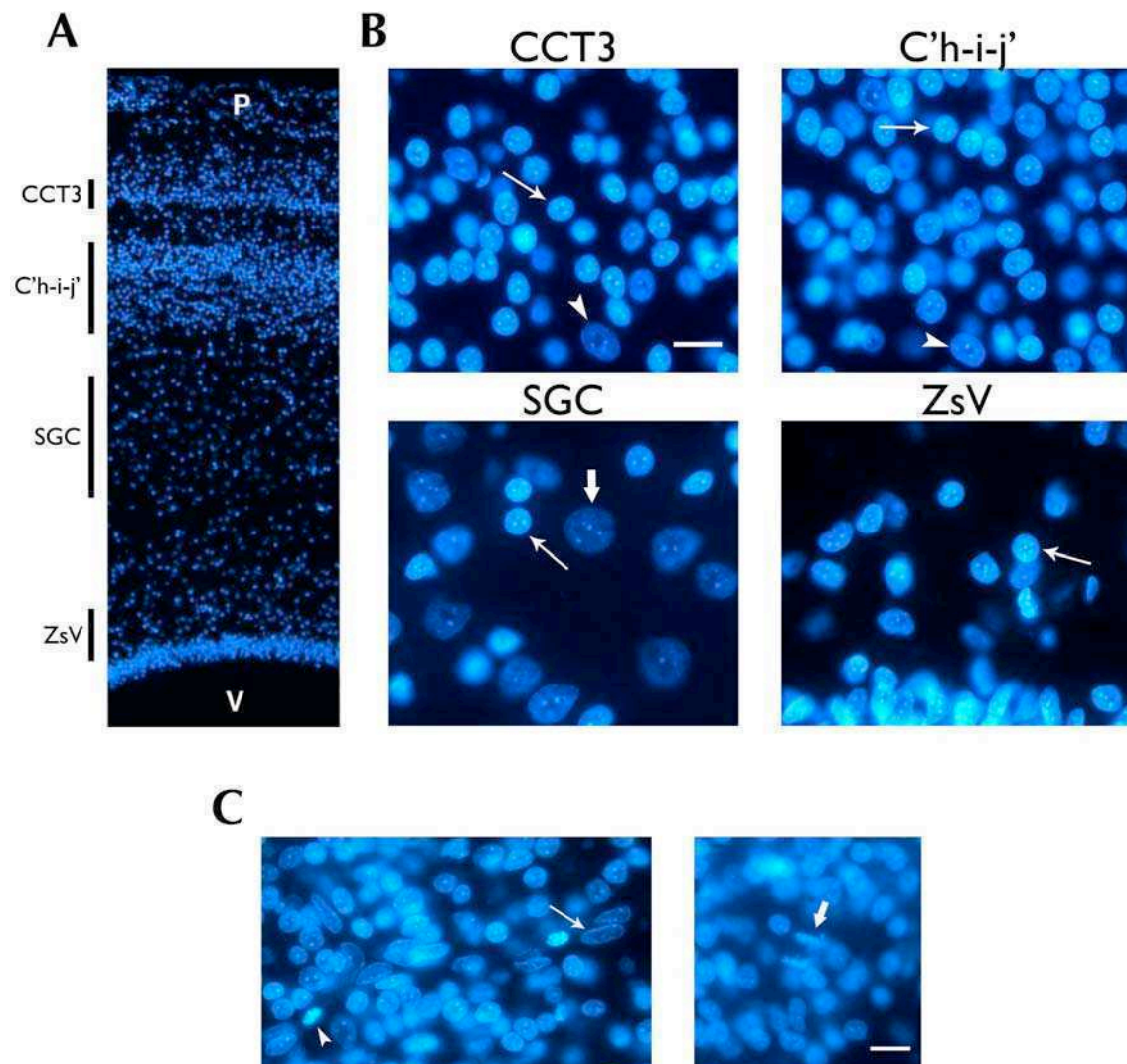


Figura 7. Morfologías nucleares normales.

Tinción de Hoechst realizada sobre cortes de TO al DE12. A. Microfotografía de la región media del TO que muestra las láminas celulares: CCT3, C'h-i-j', SGC y ZsV; P: pia, V: ventrículo. Aumento 100X. B y C. Microfotografías que muestran los fenotipos nucleares encontrados en cada lámina. B. Fenotipos de núcleos de células nerviosas por lámina: núcleos Tipo I (flecha), núcleos Tipo II (punta de flecha), núcleos Tipo III (flecha gruesa). Barra: 10 μm . C. Se observan células endoteliales (flecha) y eritrocitos (punta de flecha); figura mitótica (flecha gruesa). Barra: 10 μm .

Otras células (presentes en todas las láminas):

- Endoteliales: núcleos alargados de 11 μm de largo y aproximadamente 3 μm de ancho, con cromatina agregada en el borde de la membrana nuclear y algunas condensaciones cromatínicas chicas en el resto del núcleo. Suelen verse en hileras y cercanas o rodeando a eritrocitos. Son especialmente abundantes en la ZsV, donde corren paralelas a la lámina.

- Eritrocitos: núcleos muy brillantes con cromatina muy condensada. En su eje mayor miden 6 μm y en el menor 3 μm aproximadamente.

- Mitóticas: figuras muy escasas, que difieren en el tipo de patron según el estadio.

1.1.2. Caracterización de figuras anómalas

En la búsqueda de fenotipos que representen algún estadio de muerte celular con independencia del tratamiento, agrupamos a todos los cuerpos que por morfología no coincidieran con la categorización anterior. Debido a que no podemos afirmar que este grupo contenga exclusivamente morfologías de células en degeneración, lo denominamos figuras anómalas.

En secciones de TO de embriones normóxicos e hipóxicos encontramos que la picnosis es un denominador común, y que las variables diferenciadoras son principalmente la intensidad y la forma en que se agrupan las figuras. La picnosis se observa en agregados que en la mayoría de los casos presentan una forma circular con bordes bien definidos, y un brillo que puede variar en intensidad pero que suele ser alto y homogéneo (fig.8).

Las categorías que proponemos son:

- i.Cuerpos picnóticos perfectamente redondos y muy brillantes, con bordes bien definidos. Suelen tener aproximadamente 3 μm de diámetro.

- ii.Grupos de 2 o más cuerpos redondos picnóticos, brillantes con tamaños variables, menores a 3 μm . Sus bordes son bien definidos y no presentan halo entre ellos.

- iii.Grupos de 2 o más cuerpos redondos picnóticos con tamaños variables y menos brillantes que ii. Presentan un halo que los agrupa.

iv. Agregados muy pequeños (1 μm aprox), que no necesariamente presentan forma circular ni bordes definidos. Su brillo suele ser bajo y pueden observarse aislados o en grupo.

v. Grupos de muchos cuerpos redondeados chicos muy cercanos entre si, con forma de racimo. Su brillo es muy bajo.

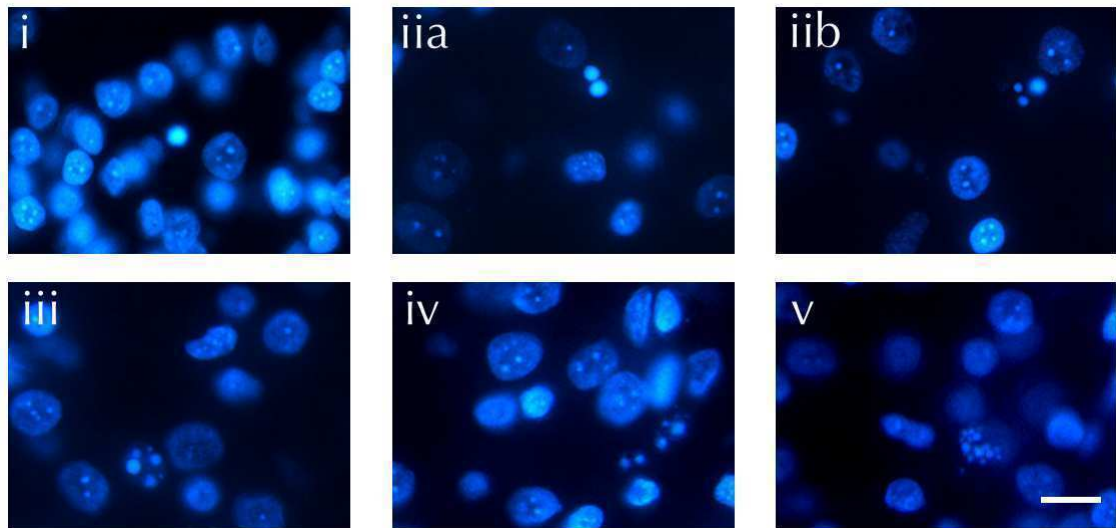


Figura 8. Figuras anómalas.

Tinción de Hoechst realizada sobre cortes de TO al DE12. Las figuras anómalas encontradas fueron categorizadas en: un cuerpo picnótico grande (i), grupo de dos (iia) o más (iib) cuerpos picnóticos con tamaño menor a 3 μm , grupo de dos o más cuerpos picnóticos con un halo que los rodea (iii), cuerpos pequeños (< 1 μm) de escaso brillo (iv) y grupos de numerosos cuerpos redondos pequeños (v). Barra: 10 μm .

Los núcleos son una característica distintiva de los distintos tipos celulares, como así también de procesos de muerte celular. Ya sea evidenciando picnosis, kariolisis o kariorexesis, en algún momento del proceso de muerte, el núcleo celular muestra signos de degeneración. Como conclusión, nuestro análisis con Hoechst nos permite asegurarnos que no pasamos por alto ningún fenotipo específico de muerte.

1.1.3. Cuantificación de figuras anómalas durante el desarrollo y luego de una hipoxia

Establecidas las morfologías anómalas procedimos a analizar su evolución durante el desarrollo y luego de una hipoxia. Como cualquier estructura en el embrión, el TO al DE12 esta sujeto a un continuo cambio. Para poder comparar daños entre láminas y descartar variables (i.e. procesos de migración o proliferación) que pudieran viciar otros análisis, cuantificamos las densidades celulares de las láminas (CCT3, C'h-i-j', SGC y ZsV) durante la ventana temporal en la cual se

realizaron los ensayos posteriores (i.e. 12 hs). Establecimos la abundancia absoluta para cada una de las láminas y observamos que el período de 12 hs es suficientemente corto como para no detectar diferencias significativas en la densidad celular de ninguna lámina (fig.9).

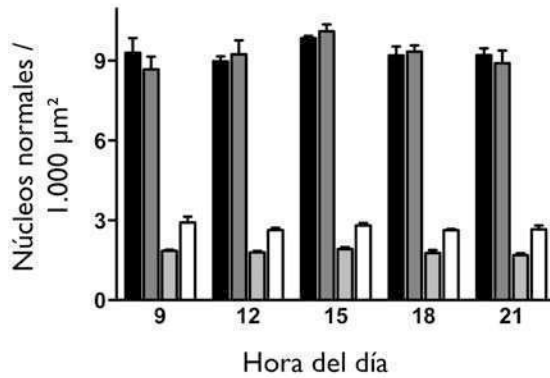


Figura 9. Las láminas no varían su densidad celular durante parte del DE12. La cuantificación de núcleos normales se realizó en la región media del TO mediante una tinción de Hoechst en cortes de embriones controles durante el DE12, comenzando a las 9:00 hs y finalizando a las 21:00 hs de incubación, en intervalos de 3 horas. No existen variaciones significativas durante el DE12 en las densidades para ninguna de las láminas ($P > 0,05$). Las barras representan la media + error estándar de la media (ESM) de cuatro experimentos independientes. Determinado con ANOVA de una vía, para cada lámina.

En una primera aproximación, cuantificamos las figuras anómalas en el desarrollo para cada una de las láminas, en el mismo intervalo del DE12 en el cual hicimos los análisis de densidades. Observamos que las cantidades de figuras anómalas relativizadas a la densidad laminar no varían a través de las 12 hs analizadas del DE12 para ninguna de las láminas. Por otro lado, las figuras anómalas relativizadas a la densidad laminar, muestran una tasa significativamente mayor para las láminas de formación más antigua en el desarrollo (i.e. ZsV), una tasa media para C'h-i-j' y SGC, y la menor tasa en la lámina más reciente (i.e. CCT3) (fig.10A).

Los embriones que sufrieron el tratamiento hipóxico presentan una evolución distinta. En este caso se encontró que no solo las tasas de núcleos anómalos difieren significativamente entre las láminas sino que también varían a través del tiempo: a las 6 hs post-hipoxia observamos un incremento de figuras anómalas en las láminas CCT3, C'h-i-j' y SGC, mientras que la lámina ZsV presenta una evolución casi plana. Estas observaciones son confirmadas por la interacción existente entre las variables lámina y tiempo (fig.10B).

A partir de estos resultados podemos afirmar que tanto el número de células normales como de figuras anómalas es constante en cada lámina durante este pe-

río del desarrollo, mientras que la hipoxia genera un aumento de las últimas en tres de las cuatro láminas.

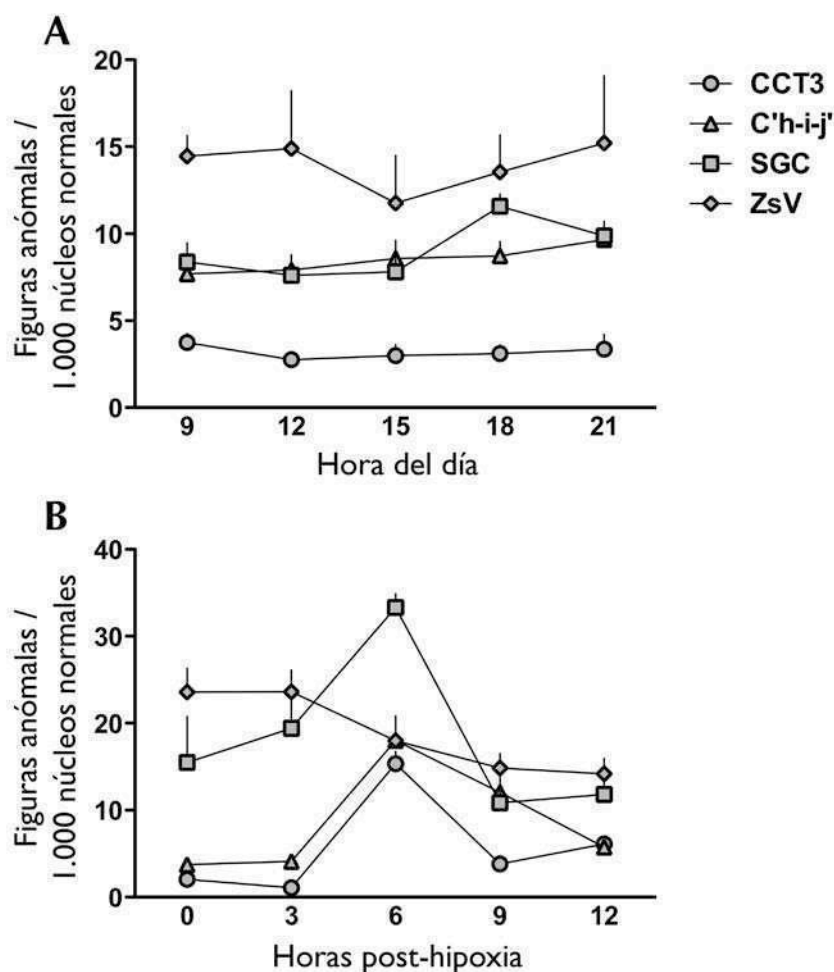


Figura 10. Las figuras anómalas tienen una tasa de aparición constante durante el DE12, mientras que 6 hs post-hipoxia existe un incremento en las figuras anómalas en las láminas CCT3, C'h-i-j' y SGC.

Mediante una tinción de Hoechst en cortes de TO de embriones controles a distintos tiempos del DE12 (A) y de embriones sometidos a hipoxia (B), cuantificamos las figuras anómalas en cada lámina y las relativizamos a 1.000 núcleos normales. A. Existe una tasa distinta para cada lámina con una cantidad mayor para la ZsV, media para C'h-i-j' y SGC, y menor para CCT3 (variable lámina, $P < 0,01$). A través de las 12 hs estudiadas las tasas se mantienen constantes para cada lámina (variable tiempo, $P > 0,05$). Los puntos representan la media + ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con ANOVA de dos vías. B. Independientemente de la tasa característica de cada lámina, CCT3, C'h-i-j' y SGC presentan un aumento evidente a las 6 hs post-hipoxia. Este aumento se revierte entre las 9 y 12 hs post-hipoxia (variable tiempo, $P < 0,01$). La ZsV mantiene un perfil relativamente plano durante las 12 hs post-hipoxia (variable lámina, $P < 0,01$). Los puntos representan la media + ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con ANOVA de dos vías, interacción entre variables significativa ($P < 0,01$).

I.2. Vulnerabilidad diferencial de las láminas del TO

Algunos de los fenotipos de las figuras anómalas observados con Hoechst podrían ser indicadores de muerte celular, indicar algún estadio particular de dife-

renciación celular, algún tipo de célula sanguínea, o hasta podrían ser artificios de la tinción. Para lograr una caracterización más exacta de estos fenotipos y confirmar su relación con la muerte celular, realizamos una doble tinción con Hoechst e inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa-3 clivada en secciones de TO a los mismos tiempos que los realizados en experimentos previos. La variación del tratamiento que representa al desarrollo normal (control) a través del tiempo no se realizó debido a que resultados previos muestran que se mantiene constante. Para el conteo tomamos en cuenta sólo las células que presentaban colocalización de núcleos anómalos y marca de caspasa-3 clivada (fig.11).

En la lámina CCT3 observamos un aumento significativo en la colocación sólo a las 6 hs post-hipoxia cuando se las compara con el control. La lámina C'h-i-j' muestra una disminución significativa apenas terminada la hipoxia, retornando a valores controles a las 3 hs post-hipoxia y alcanzando valores máximos a las 6 hs. La lámina SGC presenta un aumento significativo sólo a las 6 hs post-hipoxia, mientras que en otros tiempos no observamos variaciones. Por último, la lámina ZsV no presenta variaciones significativas en ningún tiempo post-hipoxia comparado con el control.

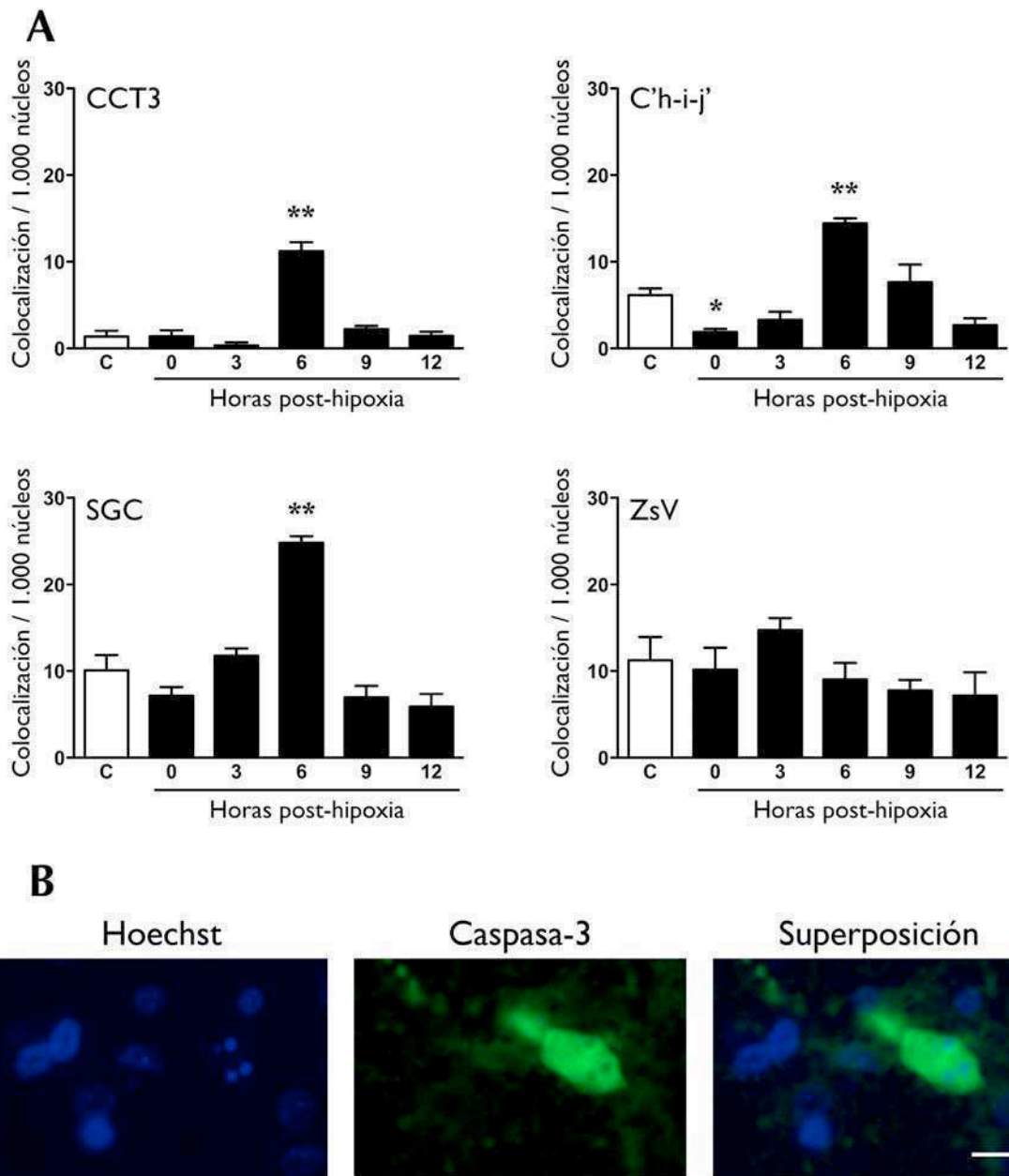


Figura 11. Colocalización de caspasa-3 clivada y figuras anómalas luego de una hipoxia.

Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-caspasa-3 clivada en cortes de TO de embriones controles y embriones sometidos a hipoxia a distintos tiempos de reoxigenación, contrateñidos con Hoechst. A. Existe un aumento significativo en la cantidad de células que colocalizan caspasa-3 clivada con figuras anómalas sólo a las 6 hs post-hipoxia para las láminas CCT3, C'h-i-j' y SGC. Las barras representan la media + ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y prueba de Dunnett para cada lámina. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. B. Microfotografías que ejemplifican la colocalización entre caspasa-3 clivada y una figura anómala. Barra 10 μm .

Debido a estos resultados nos centramos en el tiempo de las 6 hs post-hipoxia, donde todas las láminas que mostraron vulnerabilidad presentaban un aumento significativo en la tasa de colocalización. Realizamos una marcación triple en secciones de TO con Hoechst, inmunofluorescencia con anticuerpo anti-cas-

pasa 3 clivada y TUNEL en embriones controles y embriones sometidos a hipoxia con una reoxigenación de 6 hs. Sólo las células positivas para los tres marcadores fueron contabilizadas (fig.12).

El número de células que presentan colocalización aumenta significativamente con respecto al control para las láminas: CCT3, C'h-i-j' y SGC. Como observamos previamente, la lámina ZsV no presenta diferencias significativas con respecto a su control.

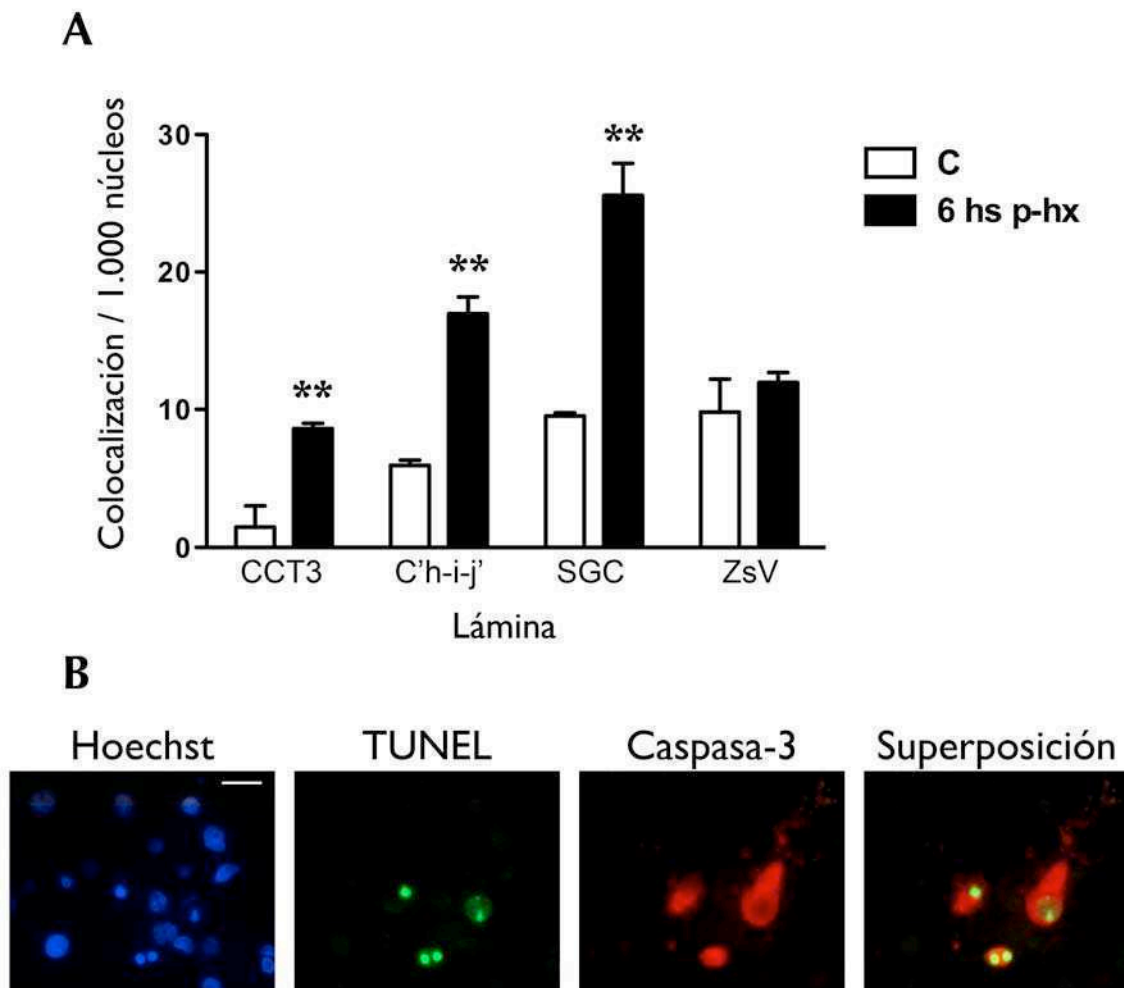


Figura 12. Colocalización de TUNEL, caspasa-3 clivada y figuras anómalas en embriones controles e hipóxicos.

Marcación triple con TUNEL, inmunofluorescencia anti-caspasa-3 y Hoechst en cortes de TO de embriones sometidos a hipoxia con 6 hs de reoxigenación y embriones controles. A. Número de células que colocalizan para los tres marcadores relativizadas a la densidad laminar. Se observa un aumento significativo en los tratamientos de 6 hs post-hipoxia comparado con el control para las láminas CCT3, C'h-i-j' y SGC. Las barras representan la media + ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni comparando C vs H6. **, $P < 0,01$. B. Microfotografías que ejemplifican la colocalización de los tres marcadores. Barra 10 μ m.

Estos resultados revelan que la amplia mayoría de las figuras anómalas presentan caspasa-3 clivada o TUNEL, validando así su morfología degenerativa (cfr. Res. III.1). Más importante es la conclusión de que las láminas del TO presentan una vulnerabilidad diferencial al evento hipóxico, como así también que la muerte celular en estas láminas es acotada en el tiempo: presenta un retraso temporal de 6 horas, y tres horas después los niveles controles se encuentran restablecidos.

Como observación podemos decir que la evolución de las tasas de muerte luego de la hipoxia nos permiten dividir a las causas en dos grupos. La muerte celular provocada por la hipoxia (MCHx) se manifiesta sólo a las 6 hs post-hipoxia, mientras que la muerte celular propia del desarrollo (MCPD) no sólo parecería estar presente en el tratamiento control sino que también en todos los tiempos post-hipoxia.

1.3. Influencia de las aferencias de las CGR en la MCPD y la MCHx

A partir del fenómeno de vulnerabilidad diferencial observado y la gran influencia de las fibras provenientes de la retina tanto en procesos madurativos como de conectividad en el TO, nos preguntamos si estas fibras podrían afectar la muerte celular mediando algún proceso desatado por la hipoxia (p.ej. excitotoxicidad, modulación de factores tróficos) o algún proceso propio del desarrollo (p.ej. factores tróficos o actividad sináptica).

A tal fin, procedimos a dañar integralmente el ojo derecho de embriones en el DE3 -esto impide la formación del nervio óptico y su proyección hacia el lado contralateral-, los cuales se dejaron desarrollar hasta el DE12, mientras que el grupo control de enucleación (*sham*) fue sometido a todos los mismos procedimientos a excepción de la enucleación en sí. Durante el DE12 un grupo fue sometido a hipoxia durante una hora y posteriormente se lo dejó seis horas en normoxia. El grupo control y el *sham* permanecieron en normoxia hasta el momento en que fueron muertos. Para este análisis cuantificamos las células TUNEL+ integrando microfotografías que barrían todo el TO (fig.13).

Observamos que existe un incremento significativo del número de células TUNEL+ en el embrión hipóxico cuando se lo compara con el control, sin embargo este incremento es independiente de la presencia de fibras. A su vez, la au-

sencia de fibras en embriones controles no modifica los niveles de células TUNEL+ con respecto al TO con fibras.

Estos resultados muestran que las fibras del SO no influyen en el daño por hipoxia: la presencia/ausencia de fibras no es un factor que influya ni en la MCPD ni en la MCHx al DE12. La no significancia del resultado no opaca las conclusiones que aporta: (1) confirma la observación de estudios previos que sugieren que hasta el DE12 el desarrollo del TO es independiente de las fibras provenientes de la retina. (2) Descarta en nuestro modelo un posible rol excitotóxico o trófico de las aferencias externas en condiciones hipóxicas. Este hecho reduce el espectro de factores que puedan influir en la MCHx en el TO, limitándolos a intrínsecos del TO. Aunque descarte fenómenos de excitotoxicidad, podría existir una implicancia trófica autocrina o paracrina en la MCHx.

En relación directa con la técnica de enucleación, el aumento de las células TUNEL+ en el control versus el *sham*, a pesar de no ser estadísticamente significativo, muestra que la enucleación es una intervención que genera cambios globales que deben ser tenidos en cuenta y en lo posible controlados.

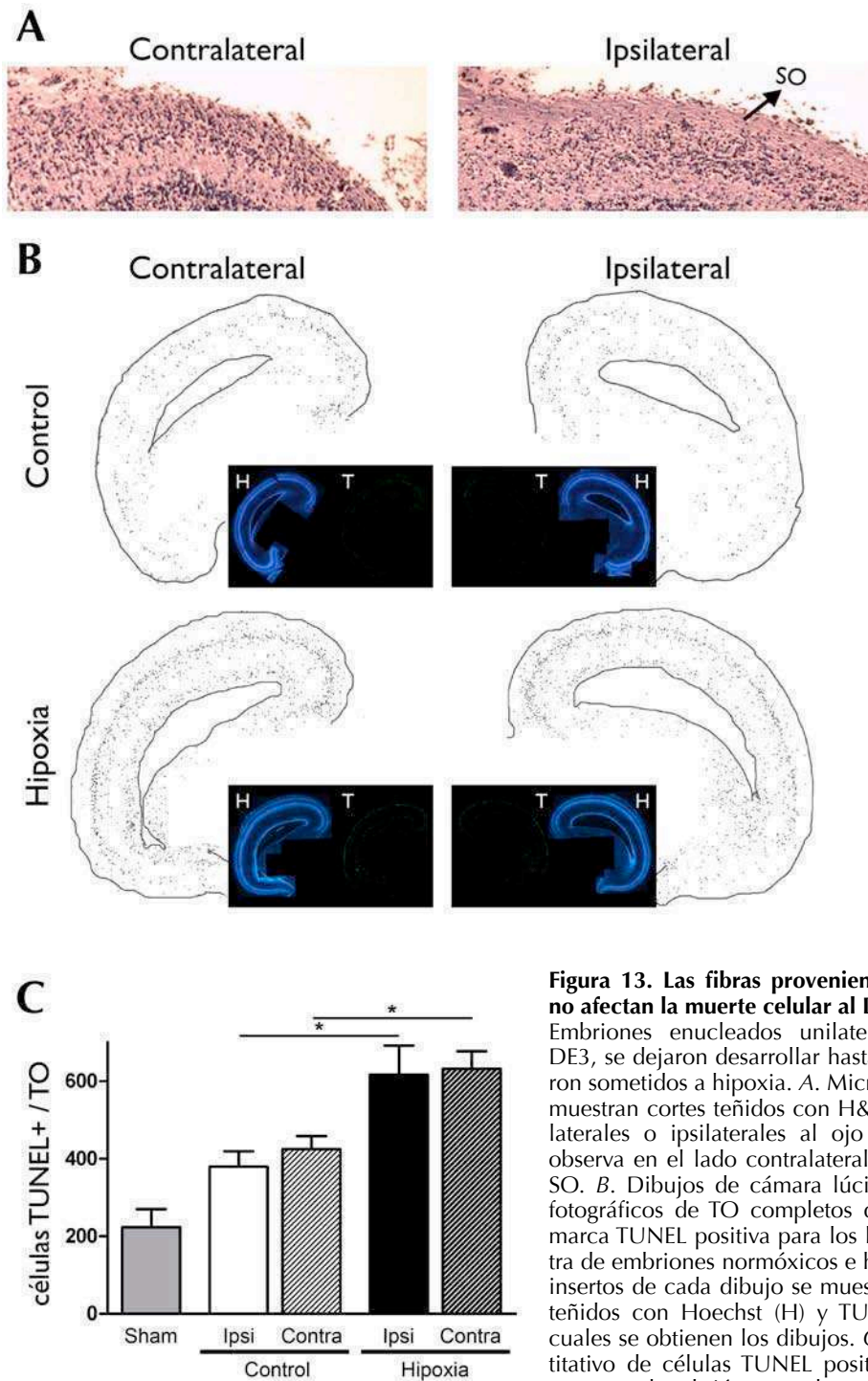


Figura 13. Las fibras provenientes de la retina no afectan la muerte celular al DE12.

Embriones enucleados unilateralmente en el DE3, se dejaron desarrollar hasta el DE12 y fueron sometidos a hipoxia. **A.** Microfotografías que muestran cortes teñidos con H&E de TO contralaterales o ipsilaterales al ojo enucleado. Se observa en el lado contralateral la ausencia del SO. **B.** Dibujos de cámara lúcida de mosaicos fotográficos de TO completos que muestran la marca TUNEL positiva para los lados ipsi y contra de embriones normóxicos e hipóxicos. En los insertos de cada dibujo se muestran los tectums teñidos con Hoechst (H) y TUNEL (T) de los cuales se obtienen los dibujos. **C.** Análisis cuantitativo de células TUNEL positivas por TO. Ya sea para el embrión control o para el sometido a hipoxia no existen diferencias significativas entre el lado ipsilateral y el contralateral (Ipsi vs. Contra: C, 379 ± 39 vs. 424 ± 34; Hx, 617 ± 74 vs. 632 ± 44). Se observa un incremento significativo en embriones sometidos a hipoxia cuando se comparan con el control los lados ipsilaterales o contralaterales independientemente. Las barras representan la media + ESM de 3 experimentos independientes. Determinado con ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. *, $P < 0,05$.

II. Análisis de tipos celulares que podrían estar involucrados en la muerte celular

Una vez caracterizado el daño hipóxico sobre el TO, intentamos averiguar si algún tipo celular se encuentra particularmente involucrado, tanto en la MCPD como en la MCHx. Para esto realizamos una doble marcación con inmunofluorescencia anti-NeuN para marcar neuronas y TUNEL para detectar muerte, en embriones normóxicos e hipóxicos. Observamos que los núcleos TUNEL positivos colocalizan ampliamente con las células NeuN positivas (fig.14).

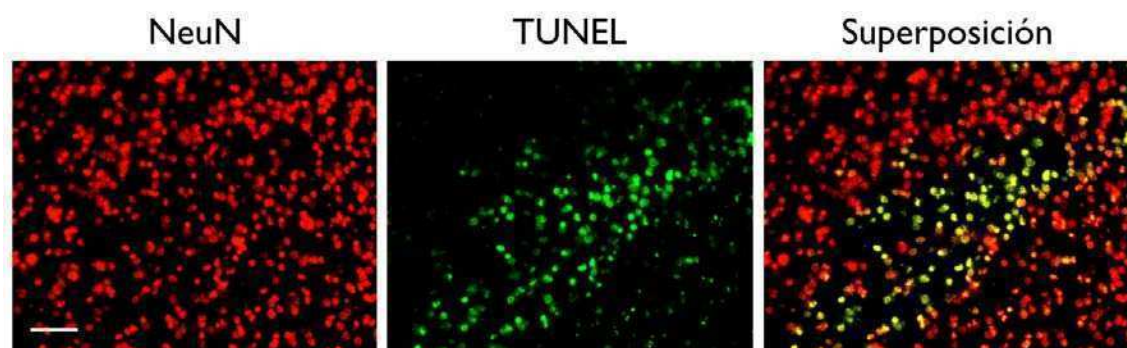


Figura 14. Colocalización de marcador neuronal con células TUNEL+. Inmunofluorescencia contra el marcador neuronal NeuN (rojo) y TUNEL (verde) en cortes de TO de embriones hipóxicos de DE12. La microfotografía muestra un área de la lámina C'h-i-j', donde la mayoría de los núcleos TUNEL+ colocalizan con NeuN. Barra 30 μ m.

La participación de astrocitos se examinó mediante una inmunofluorescencia anti-GFAP, marcador de filamentos intermedios de astrocitos diferenciados. No observamos marca alguna, y ante la posible dificultad para observar marca con fluorescencia realizamos una inmunohistoquímica: tampoco observamos marca positiva al DE12. En busca de un control positivo hicimos inmunohistoquímicas en embriones de mayor edad y encontramos que la marca GFAP comienza a aparecer en el DE14 (fig.15B).

II.1. Distribución de GFAP en el DE14

Nuestros resultados muestran que la diferenciación de astrocitos en el TO ocurre a partir del DE14. La marca de GFAP en el TO presenta dos patrones. El primero es un gradiente ventral-dorsal, con mayor presencia de GFAP en la región ventral-media y menor en la región media-dorsal. El segundo es que la marca se

limita a las láminas ZsV, SAC y SGC. El primer gradiente coincide con uno de los ejes de desarrollo, donde existe una distancia temporal aproximada de dos días embrionarios entre el extremo ventral y el dorsal (fig.15A).

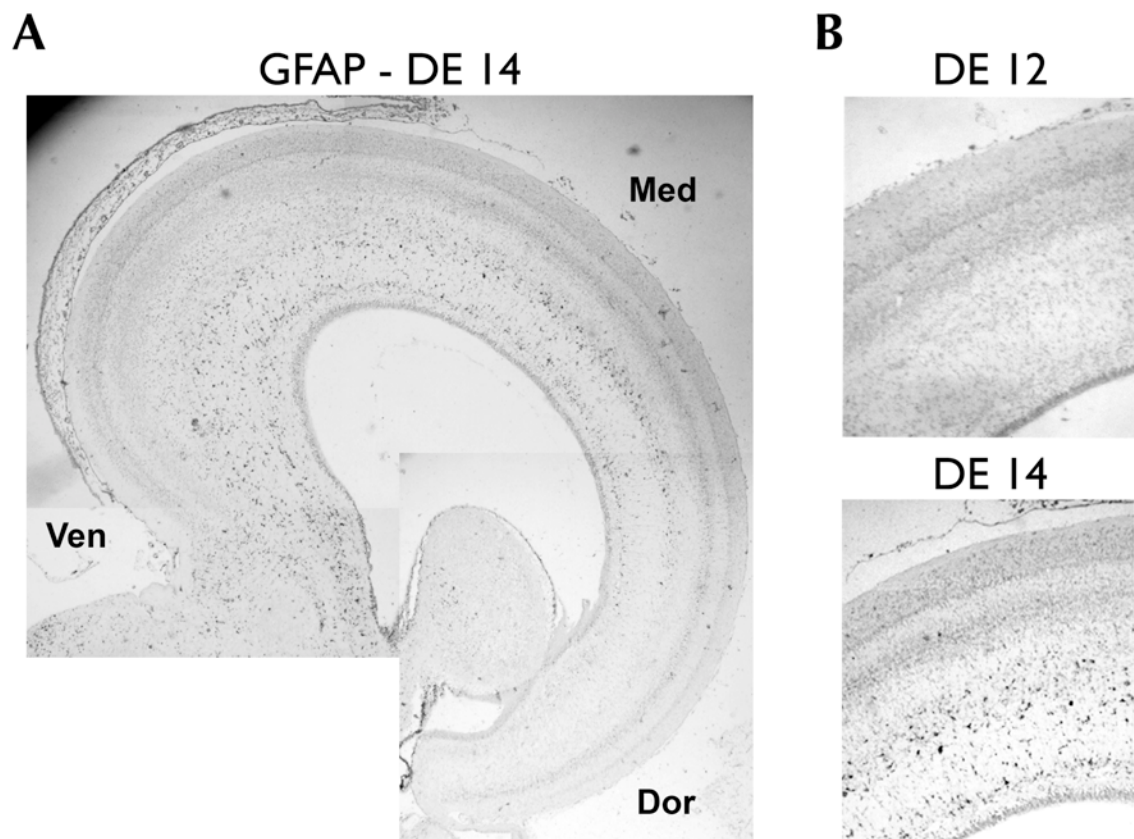


Figura 15. La expresión de GFAP en el TO se inicia alrededor del DE14.

Inmunohistoquímica anti-GFAP en cortes de TO de DE12 y 14. A. Mosaico de microfotografías de TO entero que muestra la distribución de la marca GFAP en el DE14. La marca es lámina específica y presenta un decaimiento hacia la parte dorsal. Ven, ventral; Med, medio; Dor, dorsal. Aumento: 40X. B. Comparación de la marca GFAP entre el DE12 y DE14 para la región media del TO. Aumento: 100X.

Estos resultados en conjunto con lo previamente observado sugieren que las neuronas se encuentran involucradas en la muerte celular, sin descartar una posible participación de precursores gliales.

III. Análisis morfológico comparativo entre MCPD y MCHx

III.1. Comparación morfológica y de marcación

En las cuantificaciones previas (cfr. fig.12) observamos distintas categorías en lo que concierne a marca de caspasa-3 y anomalías nucleares. Estos grupos consisten en:

- Núcleos normales que presentan una abundante marca de caspasa-3.

- Grupos de 2 o más cuerpos redondos picnóticos con tamaños variables, que presentan un halo que los agrupa. Estos fenotipos siempre correlacionan con gran cantidad de caspasa-3 clivada en el citoplasma.

- Cuerpos picnóticos perfectamente redondos y muy brillantes de aproximadamente 3 μm de diámetro o grupos de 2 o más cuerpos redondos picnóticos menores a 3 μm . Sus bordes son bien definidos y no presentan halo entre ellos. Estos cuerpos pueden presentar o no colocalización con caspasa-3.

- Agregados muy pequeños (1 μm aprox), que no necesariamente presentan forma circular ni bordes definidos. Su brillo suele ser bajo y pueden observarse aislados o en grupo. Este grupo rara vez presenta marca de caspasa-3.

En estas categorías no incluimos la presencia/ausencia de TUNEL, ya que en todos los casos que encontramos picnosis mediante hoechst, también observamos marca TUNEL+.

Procedimos a hacer un análisis donde se evidenciara si alguna de estas categorías tiene presencia en algún tratamiento en particular. La pregunta que subyace a este análisis es: ¿podrían estas categorías pertenecer a distintos fenotipos de muerte celular? o su contraria ¿podrían ser estas categorías distintos estadios de un mismo tipo de muerte celular? (Tabla 1).

Lámina / Tratamiento	Total células muertas	Positivos para caspasa-3 clivada			Negativos para caspasa-3 clivada	
		Núcleo normal (%)	Núcleo condensado (%)	Cuerpos picnóticos (%)	Cuerpos picnóticos (%)	Residuos (%)
CCT3						
Control	10	0	0	40	60	0
6 hs post-hipoxia	56	0	12	62	21	5
C'h-i-j'						
Control	46	2	4	70	22	2
6 hs post-hipoxia	100	1	7	73	15	4
SGC						
Control	27	11	4	41	15	30
6 hs post-hipoxia	51	3	24	37	11	26
ZsV						
Control	18	0	0	67	11	22
6 hs post-hipoxia	21	0	13	38	21	19

Tabla 1. Frecuencias relativas (expresadas como porcentaje del total de células muertas) de las morfologías de células muertas para cada lámina tanto en embriones controles como en embriones 6 hs post-hipoxia, categorizados con dos marcadores: Hoechst y caspasa-3 clivada. Se realizó un análisis de chi-cuadrado comparando las frecuencias de morfologías para ambos tratamientos en cada lámina. No se encontraron diferencias significativas (CCT3 P=0.164; C'h-i-j' P=0.817; SGC P=0.177; ZsV P=0.255).

Primero hicimos una comparación entre las láminas dentro de cada tratamiento (control y 6 hs post-hipoxia). Encontramos diferencias significativas entre las variables "morfologías" y "láminas" para ambos tratamientos, evidenciando que las categorías no se encuentran igualmente representadas en las distintas lá-

minas para cada tratamiento. Sin embargo, esta diferencia viene dada principalmente por la categoría “residuos”, la cual en las láminas CCT3 y C’h-i-j’ tiene escasa presencia. Esto probablemente se deba a la dificultad en distinguir partículas muy chicas en láminas con densidad celular alta, donde su escasa fluorescencia queda enmascarada por la ubicua fluorescencia nuclear. Debido a esto no fue posible juntar todas las láminas en un bloque para cada morfología y comparar ambos tratamientos.

Así, comparamos los tratamientos para cada lámina. Realizamos un análisis de chi-cuadrado, y encontramos que no existen diferencias significativas en las proporciones de las morfologías entre los tratamientos control e hipóxico en ninguna de las cuatro láminas.

Podemos destacar que la proporción de morfologías es independiente del tratamiento, lo cual indica que con los marcadores usados hasta acá, no existen diferencias cualitativas entre los tipos de muerte celular encontrados tanto en embriones controles como hipóxicos.

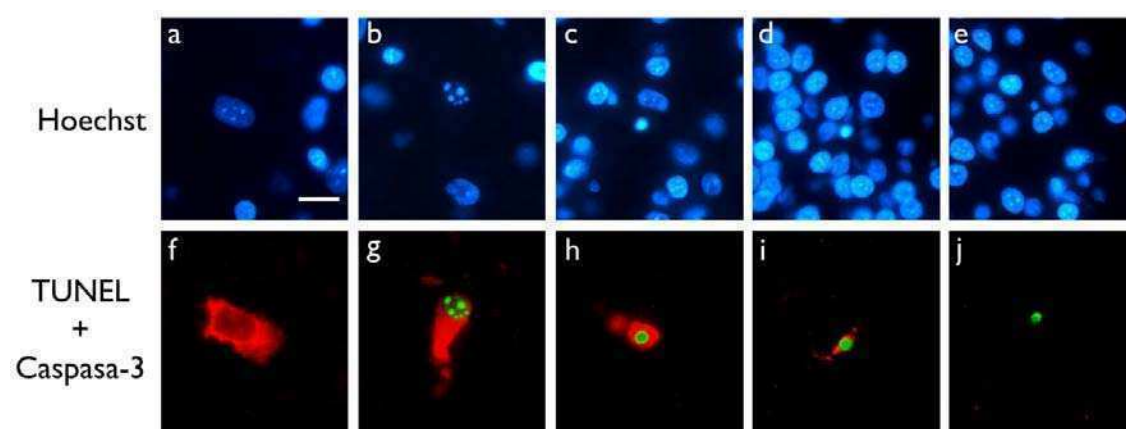


Figura 16. Categorías según la marcación, evolución fenotípica propuesta.

Microfotografías de morfologías y distribución de marca observada con Hoechst (a-e) y con inmunofluorescencia anti-caspasa-3 clivada (rojo) y TUNEL (verde) (f-j). Comienza con un núcleo de apariencia normal, TUNEL negativo y una abundante marca de caspasa-3 citoplasmática (a,f). Masas de ADN redondeadas y TUNEL positivas aparecen en un núcleo que todavía conserva su membrana nuclear y que es negativo para caspasa-3, la cual abunda en citoplasma (b,g). La condensación del núcleo avanza y se forman uno o más cuerpos picnóticos muy brillantes, la separación núcleo-citoplasma desaparece (c,h) y el/los cuerpo/s TUNEL positivo/s van disminuyendo en intensidad y en cantidad de caspasa-3 activa que los rodea (d,i). Finalmente un cuerpo pequeño TUNEL positivo queda como residuo celular (e,j). Barra 10 μm .

Por otro lado cada una de las categorías encajan en un patrón sucesivo de desintegración celular que se propone en la figura 16. Comienza con un núcleo de apariencia normal, TUNEL negativo y una abundante marca de caspasa-3 activa citoplasmática. Masas de ADN redondeadas y TUNEL positivas aparecen en un

núcleo que todavía conserva su membrana nuclear y que es negativo para caspasa-3 activa, la cual abunda en citoplasma (corresponde a iii de fig.8). La condensación del núcleo avanza y se forman uno o más cuerpos picnóticos muy brillantes (ibídem i y ii), la separación núcleo-citoplasma desaparece y los cuerpos TUNEL positivos van disminuyendo en intensidad y en cantidad de caspasa-3 clivada que los rodea. Finalmente uno o más cuerpos pequeños TUNEL positivos quedan como residuos celulares (ibídem iv).

III.2. Análisis ultraestructural

Los resultados previos muestran que ambos fenotipos de muerte (i.e. MCPD y MCHx) parecerían tener características clásicas de apoptosis, entre ellas condensación cromatínica en masas grandes y redondeadas, desarmado gradual de la membrana nuclear y disminución del tamaño celular. Si bien no son marcadores estrictamente específicos de apoptosis, la abundante presencia de caspasa-3 clivada previa a la degeneración nuclear, como así también la intensa marca de TUNEL son indicios que sugieren un mecanismo apoptótico subyacente.

Con la finalidad de comprobar si los cambios ultraestructurales que ocurren tanto en la MCPD como en la MCHx se asemejan a los clásicos cambios apoptóticos procedimos a analizar por microscopía electrónica los fenotipos en cortes de TO, tanto de embriones controles (normóxicos) como embriones sometidos a hipoxia con una reoxigenación de 6 hs (hipóxicos). También buscamos diferencias ultraestructurales que fueran características de la MCPD o de la MCHx.

Para realizar este estudio tuvimos en cuenta no sólo las láminas sino también que el análisis fuera en la región central del TO, entre el extremo ventral (más desarrollado) y dorsal (menos desarrollado). Por otro lado, es importante notar que la tasa de muerte celular como ha sido cuantificada en experimentos previos ronda el 1% de las células normales, con ligeras variaciones para cada lámina y para ambos tratamientos. Este hecho sumado a la pequeña superficie de los cortes provenientes del ultramicrotomo hace que la frecuencia de aparición de células en degeneración sea realmente baja.

III.2.1. Estadio temprano de degeneración celular

En base a comparaciones entre cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y lo observado en el microscopio electrónico, identificamos la estructura de

cada una de las láminas del TO gracias a una presencia celular y fibrilar característica -observaciones no mostradas-.

Para reconocer estadios tempranos que no presentan cambios nucleares notorios y por ende difíciles de identificar, realizamos una inmunohistoquímica anti-caspasa-3 clivada revelada con DAB. En estos estadios la marca de caspasa-3 clivada parece tener una localización exclusivamente citosólica distribuida en forma de parches electrondensos (fig.17A y B). El núcleo no presenta grandes variaciones con respecto a un núcleo normal, salvo posiblemente algunas pequeñas condensaciones aisladas, mientras que los nucléolos se ven normales. En el citosol, aparte de la marca de caspasa-3 que lo oscurece por completo, las únicas organelas evidentes son mitocondrias. En estas células de embriones hipóxicos, la mayoría de las mitocondrias presentan una forma circular y edematosa, con crestas poco definidas (fig.17D). Sin embargo, es común observar en células normales de embriones controles la misma morfología mitocondrial (fig.17C).

Haciendo una correspondencia con lo observado previamente con Hoechst, las células mostradas en C'h-i-j' y en SGC de la figura 17, corresponden a los tipos I y III respectivamente (cfr. fig.7).

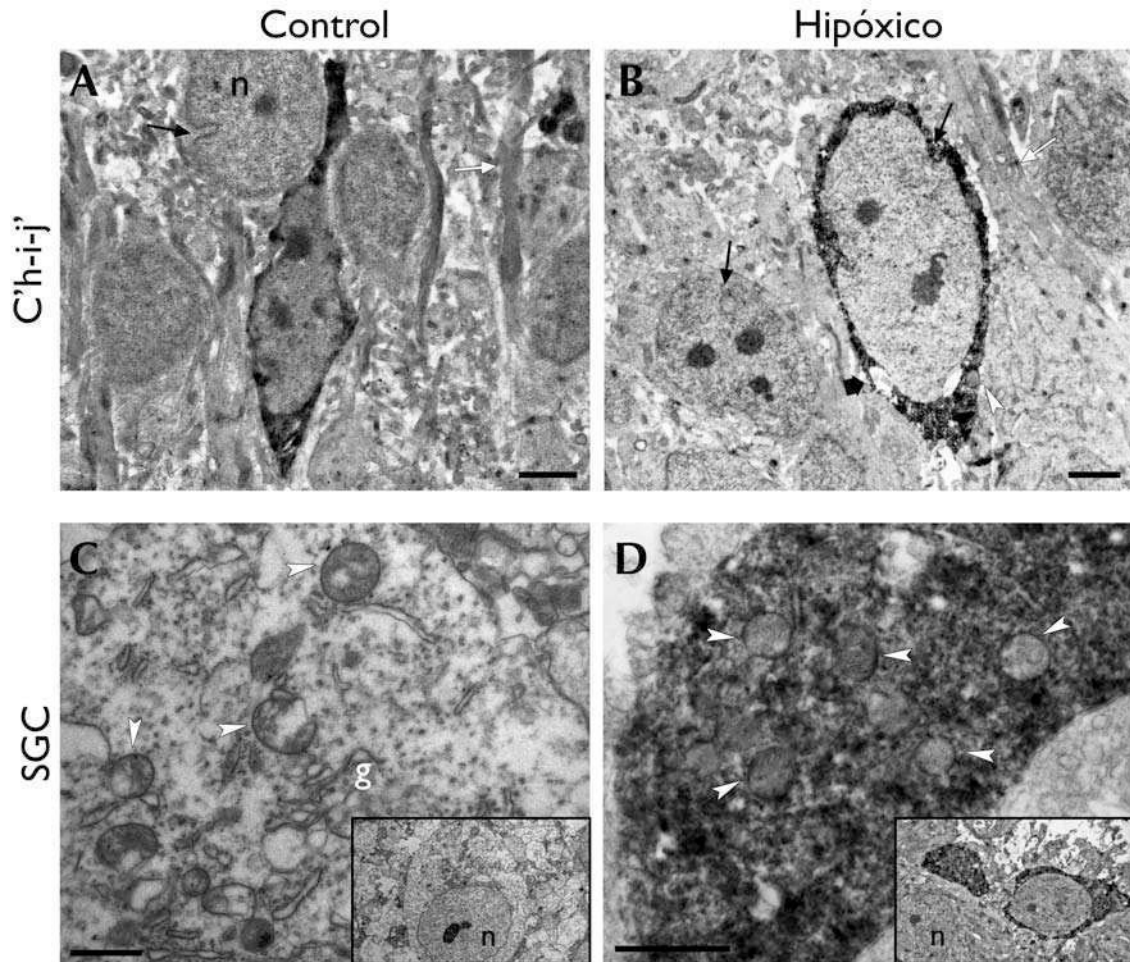


Figura 17. Estadio temprano de muerte celular con marca de caspasa-3 clivada.

Secciones de embriones normóxicos e hipóxicos con inmunohistoquímica anti-caspasa-3 realizada previamente a la inclusión y revelada con DAB. En las células positivas se observa la marca distribuida en parches electrondensos, delineando el citosol. Células presentes en la lámina C'h-i-j' de embrión normóxico (A) e hipóxico (B); células de lámina SGC de embrión normóxico (C) e hipóxico (D). A. El núcleo presenta forma irregular y una leve condensación cromatínica. Neuritas de transcurso vertical (flecha blanca) típicas de esta lámina y núcleos celulares normales (n). B. Núcleo de características normales, con indentaciones (flecha negra) que no son exclusivas de células hipóxicas. Edema de organela (flecha ancha) no identificable y mitocondrias de forma circular y crestas poco definidas (punta de flecha blanca). C. Soma neuronal de una célula control sin marca de caspasa-3 clivada (ampliación de recuadro), con mitocondrias de forma aproximadamente circular y matriz poco definida; también se observa el aparato de golgi (g), RER y ribosomas en forma de rosetas. D. Ultraestructura de una porción del soma de una célula de embrión hipóxico positiva para caspasa-3 (ampliación de recuadro). Mitocondrias con forma circular y distintos grados de degeneración de crestas. Marca de caspasa-3 en cúmulos electrondensos. Barra = 2 μm en A y B; Barra = 1 μm en C y D.

III.2.2. Estadio medio de degeneración celular

El primer indicio conspicuo de degeneración observable sin marcación, ocurre en el núcleo y corresponde a formación de agregados cromatínicos o picnosis (fig.18). Estos agregados suelen tener una forma aproximadamente circular, contenido electrondenso y especialmente granulado y homogéneo en los primeros pasos del proceso de agregación. La separación con el resto de la cromatina

se observa claramente y estos cuerpos circulares pueden ser únicos o bien varios de distintos tamaños. En los primeros estadios no suelen ser mayores a los 1,5 μm de diámetro. Se distinguen de los nucléolos debido a que estos normalmente no presentan morfología circular y contienen dos o más texturas que corresponden a sus distintas partes: organizador nucleolar, pars fibrosa y pars granulosa. A su vez en el núcleo se observa un particulado electrondenso que puede presentar distintos arreglos. Por un lado parece bastante evidente que el agregado masivo de este particulado es lo que forma las masas circulares descritas anteriormente. Por otro, a mayor aumento se observa en algunos núcleos la formación de cordones de entre 10 a 20 nm de ancho y de longitud variable que podrían corresponder a fragmentos de ADN enrollados en nucleosomas (10 nm) o a ribonucleopartículas (20 nm) (fig.20A y B). En el primer caso especulamos que estos fragmentos son producto de la acción de endonucleasas activadas por caspasa-3. Este fenómeno se observa en células de ambos tratamientos.

En este estadio la división núcleo citoplasma es evidente y la membrana nuclear se observa intacta. Con respecto al citoplasma se observan dos patrones en ambos tratamientos, uno de ellos es el citosol relativamente claro con textura normal que presenta algunas condensaciones electrondensas aisladas posiblemente producto de agregados proteicos o ribosomales -observaciones no mostradas-, mientras que el otro es de un gris homogéneo (fig.18C). Tanto en embriones controles como hipóxicos observamos mitocondrias con crestas poco definidas o con membranas interrumpidas. En algunos casos puede observarse formación de vesículas de contenido traslúcido variable con simple, doble o hasta triple membrana. También se pueden observar vesículas de membrana simple con partículas ribosomales, producto de desarmado del RER y edema en el aparato de Golgi.

El mayor tamaño de las neuronas del SGC (Tipo III) en comparación con el resto de las células y fundamentalmente la extensión de su citoplasma quedan en evidencia en las figuras 17 y 18. El conocimiento de la lámina analizada nos permite extraer características comunes a dos fenotipos distintos, que de otra manera podríamos haber identificado como estadios independientes.

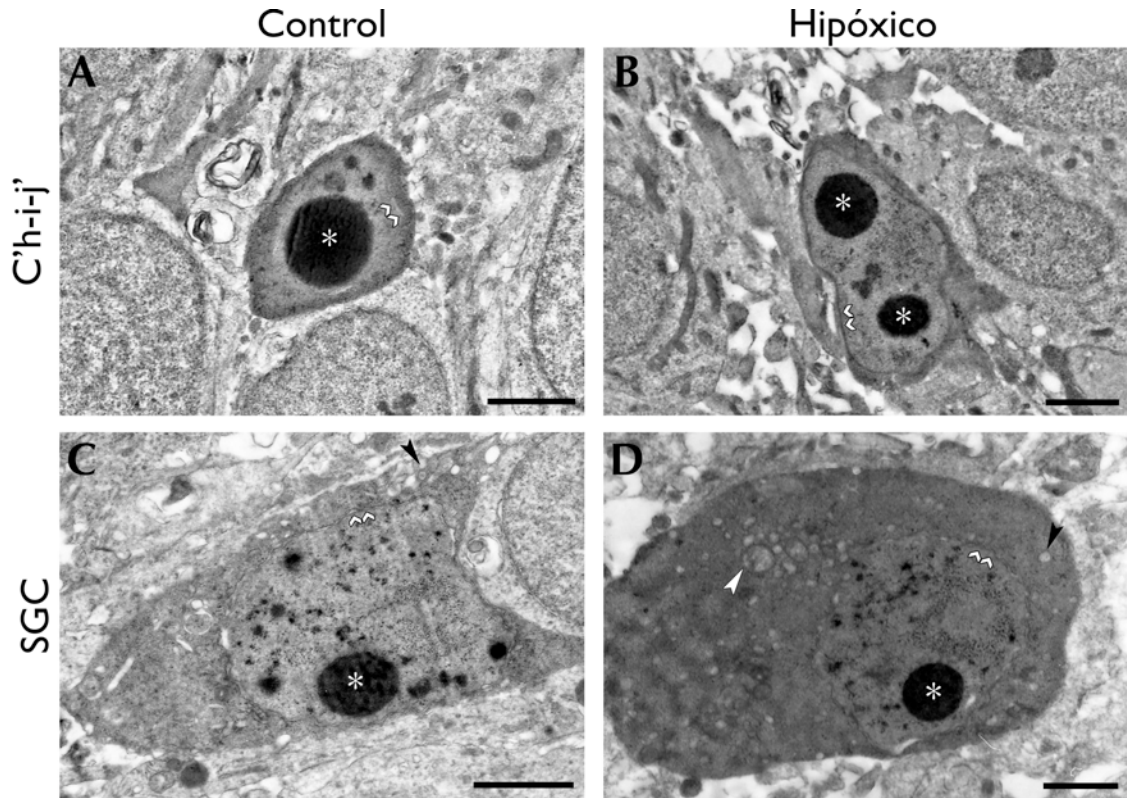


Figura 18. Estadio medio con picnosis y membrana nuclear continua.

Células correspondientes a embriones normóxicos (A y C) e hipóxicos (B y D), de las láminas C'h-i-j' (A y B) o SGC (C y D) que presentan características de degeneración nuclear y citosólica. A excepción de C, se muestran cortes sometidos a una inmunohistoquímica anti-citocromo C previo a la inclusión (A, B y D). En todas las células es característica la formación de agregados cromatínicos circulares electrondensos (asterisco) rodeados de condensaciones más pequeñas e irregulares. Se encuentran mitocondrias circulares con crestas no definidas (punta de flecha blanca) (D). También aparecen vesículas con contenido claro en distintas proporciones (punta de flecha oscura) (C y D). La membrana nuclear (punta de flecha doble blanca) es continua en todos los casos. La marca de DAB correspondiente a citocromo C se observa como un particulado fino homogéneo de localización citosólica. Barra = 2µm.

Respecto a la marca de citocromo c, esta se observa como un particulado fino homogéneo que cubre todo el citosol, oscureciéndolo. La dificultad de encontrar una célula en cortes no sometidos a inmunomarcación en el embrión hipóxico en este estadio en la lámina SGC, nos llevó a presentar una célula marcada. Las características comunes mas allá de la marca son evidentes. En todos los casos las células mantienen su integridad, mostrando un claro límite que las separa del medio externo. Sin embargo una reducción en el tamaño y pérdida de forma comienzan a ocurrir.

III.2.3. Estadio avanzado de degeneración celular

El siguiente estadio se lo puede definir a partir de la ruptura de la membrana nuclear y la fusión del contenido nuclear con el citosólico, también denominado karyorhexis (fig.19). Las condensaciones cromatínicas suelen hacerse más gran-

des, llegando a superar los 2 μm en algunos casos. Este fenómeno es muy marcado en algunas células del tratamiento hipóxico donde la picnosis adquiere una alta densidad y homogeneidad (fig.19B). Los cambios en organelas que venían presentándose se agudizan, las células disminuyen considerablemente su tamaño y a pesar de que los límites celulares permanecen evidentes es común observar fragmentación somática (fig.19C). En este último estadio es común encontrar a los cuerpos rodeados por células astrocíticas o fagocíticas, y se vuelve notoria la presencia de un particulado electrondenso con características de agregado proteico o ribonucleoproteico que en algunos casos adquiere forma de cordones, siendo esto especialmente evidente en células del tratamiento hipóxico (fig.19C y fig.20D, E y F).

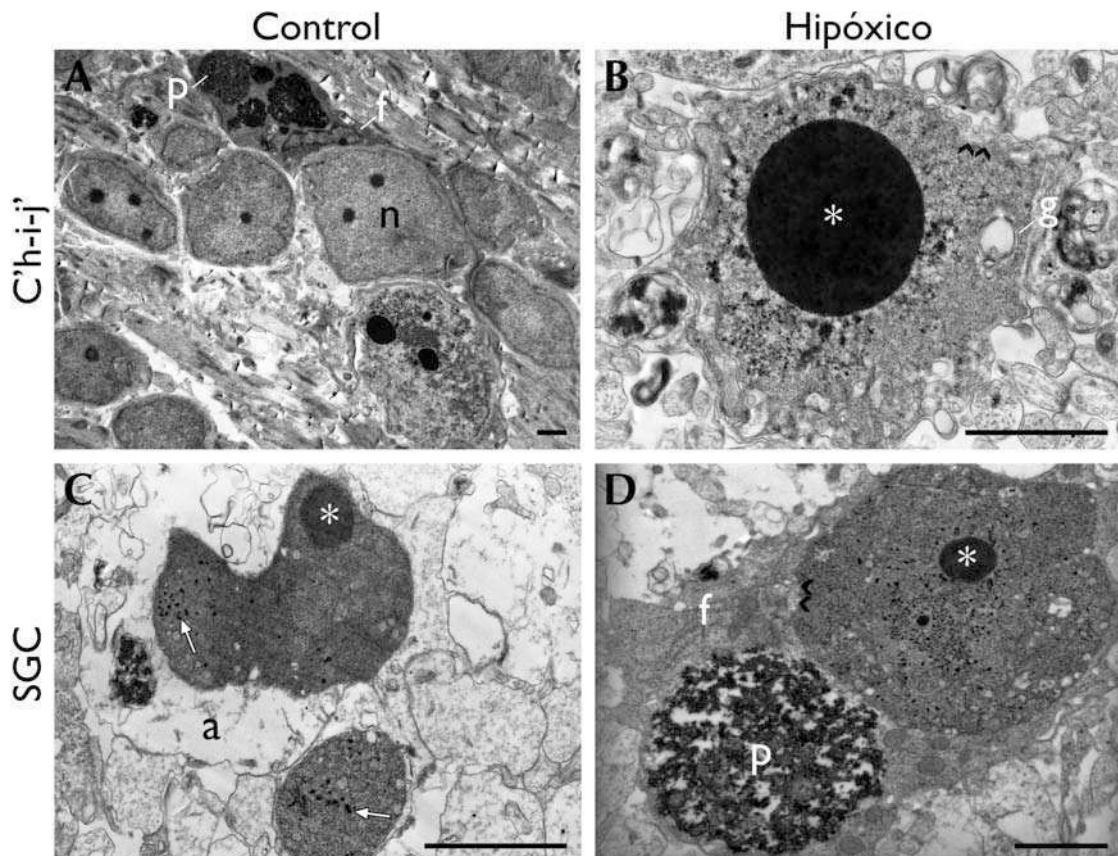


Figura 19. Estadio avanzado con ruptura de membrana nuclear.

Microfotografías de embriones normóxicos (A y C) e hipóxicos (B y D), de lámina C'h-i-j' (A y B) o SGC (C y D). En A y D se observan cuerpos rodeados por células fagocíticas (f). Si bien presentan ruptura de membrana nuclear, son estadios menos avanzados que B y C. Obsérvese la distinta morfología presente en la degradación de un soma con respecto a la degradación de una porción de neurita (p). En algunas células hipóxicas las condensaciones cromatínicas (asterisco) presentan un compactamiento y tamaño mayores (B). El aparato de Golgi (g) se encuentra edematoso (B), y se observa gran cantidad de vesículas (B, C y D). En algunos casos el cuerpo celular se puede encontrar rodeado por prolongaciones astrocitarias (a) (C). En C también se observa agregado ribonucleoproteico (flecha blanca) electrondenso disperso y sacos membranosos con contenido variable. Barra = 2 μm .

La morfología y el contenido del soma celular difiere con respecto a la degeneración de las proyecciones. Éstas presentan una gran cantidad de sacos membranosos enrollados sobre si mismos, junto a agregados proteicos electron-densos que se agrupan formando ovillos. Estos cuerpos suelen presentarse cerca de los somas en degeneración (fig.19A y D).

Como conclusión podemos asegurar que el proceso de muerte celular que ocurre en embriones normóxicos y en hipóxicos es de características apoptóticas. Esta afirmación la sostienen las siguientes observaciones: (1) las células mantienen su integridad durante todo el proceso degenerativo; (2) la picnosis se concentra en dos o tres cuerpos circulares, y gran parte de este proceso ocurre con la membrana nuclear intacta; (3) no hemos observado edema celular o *swelling*, más bien la célula se compacta gradualmente durante todo el proceso.

Hemos encontrado algunas pocas células con características anómalas, como oscurecimiento generalizado o abundante presencia de sacos membranosos que se asemejan al fenotipo autofagocítico, pero su escasa abundancia (una o dos células en todos los cortes) nos ha llevado a descartarlas. Las leves diferencias entre células de embriones hipóxicos y normóxicos encontradas (i.e. mayor tamaño de cuerpos picnóticos y agregados ribonucleoproteicos más evidentes), son distinciones de grado que no consideramos relevantes como diferenciadoras de ambos procesos. Finalmente, los fenotipos que observamos con microscopia electrónica y con microscopia de fluorescencia (cfr. fig.16) presentan una gran correspondencia.

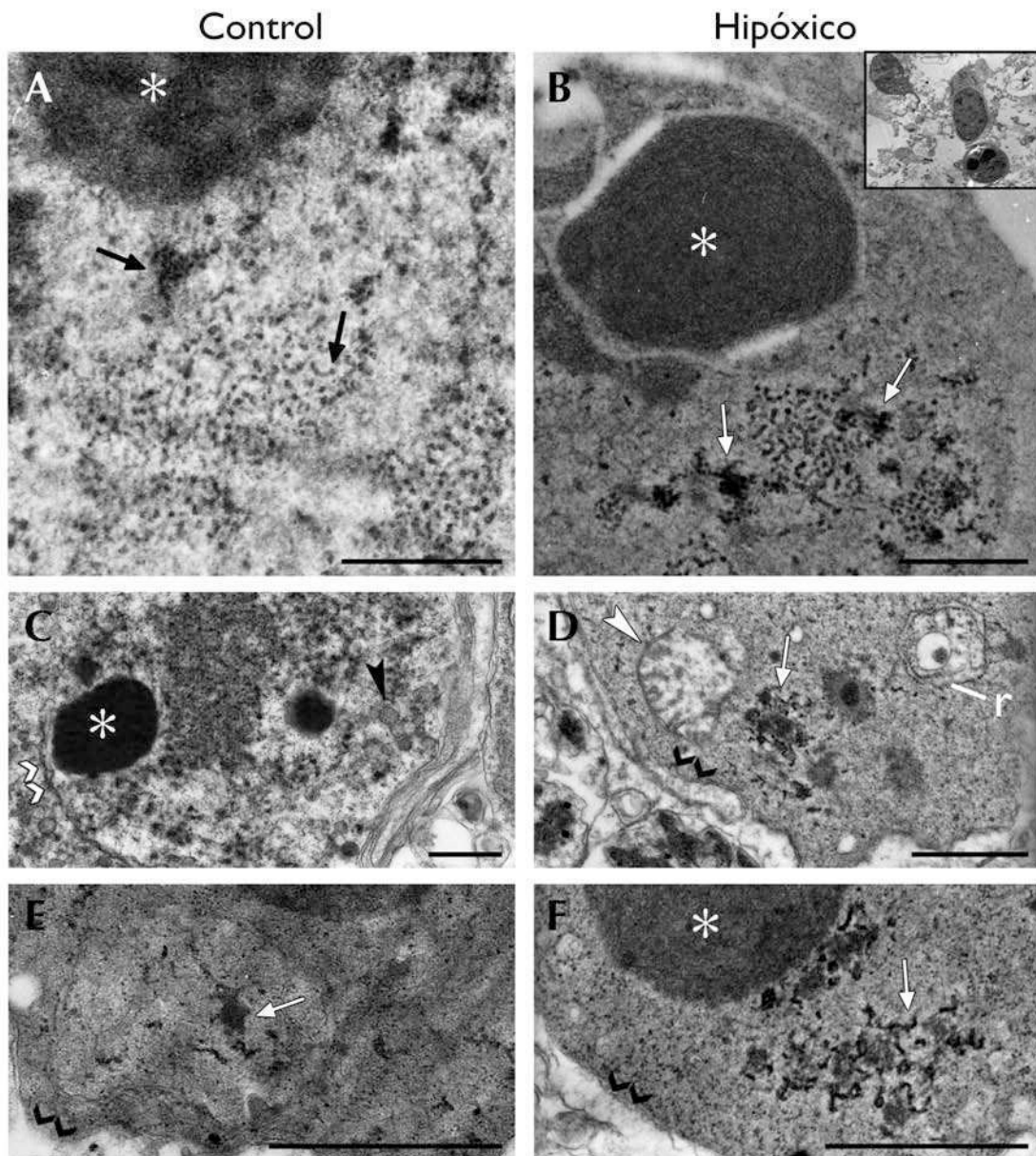


Figura 20. Algunos cambios estructurales típicos presentes en ambos tratamientos.

A, C y E pertenecen a células de embriones normóxicos, B, D y F a embriones hipóxicos. A. Compartimento nuclear con cordones de cromatina y agregados de tamaño variable (flecha negra). B. Célula en degeneración sin Tetroxido de Osmio. La marca más electrodensa corresponde a la tinción con acetato de uranilo, el cual tiñe ácidos nucleicos. Se observan agregados de ribonucleoproteínas (flecha blanca), de la mismas características que en A. C. Célula con membrana nuclear discontinua y vesículas (punta de flecha negra). D. Agregados de ribonucleoproteínas, mitocondria con crestas poco definidas (punta de flecha blanca) y ruptura de membrana y sacos de RER (r). E y F. Células con agregados de ribonucleoproteínas, con conformación particular en F. Estos agregados difieren de los presentes en A y B no solo por su forma, sino también por el estadio en el cual están presentes, A y B: estadio medio, D, E y F: estadio avanzado. Barra = 0,5 μm en A y B; 1 μm en C, D, E y F.

IV. Vías ejecutoras involucradas en la MCPD y en la MCHx

IV.1. Vía intrínseca

Tanto la MCPD como la MCHx presentan un fenotipo apoptótico y una activación de caspasa-3, la cual puede ocurrir por dos vías distintas, vía caspasa-9 (intrínseca) o vía caspasa-8 (extrínseca). Para probar si la MCPD y la MCHx comparten un mecanismo común realizamos la inmunomarcación con caspasa-9 clivada y liberación de citocromo C en embriones controles y embriones sometidos a hipoxia con distintos tiempos de reoxigenación (fig.21).

La inmunomarcación de caspasa-9 clivada debería ocurrir exclusivamente en células que estén en proceso de muerte, mientras que la marca de citocromo c es esperable en todos los tipos y estados de la célula. En un análisis previo a la cuantificación concluimos que la distribución de citocromo c en la mayor parte de las células se encuentra en un particulado de aproximadamente 1 μm , tamaño que correlaciona con el de las mitocondrias. Por otro lado, las células endoteliales presentan una marca muy intensa y distinguible del resto de las células, mientras que los eritrocitos son negativos. En la gran mayoría de las células que presentan picnosis y/o marca de caspasa-9 clivada observamos que la marca de citocromo c se agrupa y presenta una mayor homogeneidad (menos particulada). Ni caspasa-9 clivada ni citocromo c se encuentran en el compartimento nuclear (fig.21C); caspasa-9 tiene una distribución más amplia y su presencia en prolongaciones es común y más abundante que citocromo c. En este experimento, por colocalización nos referimos a células que presentan el patrón de distribución de citocromo c arriba mencionado y marca de caspasa-9 clivada.

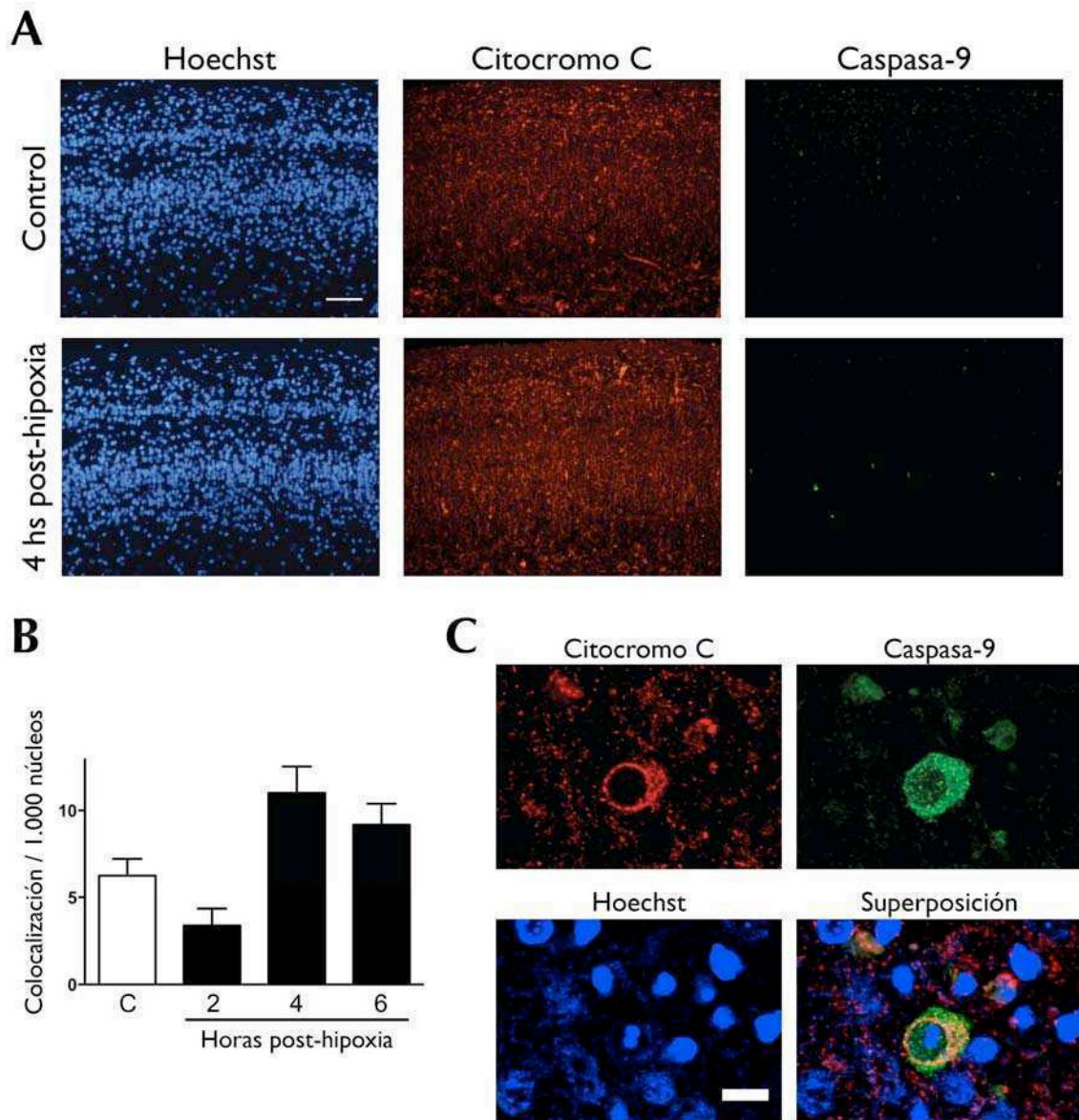


Figura 21. La liberación de citocromo c y clivaje de caspasa-9 es un proceso común a la MCPD y la MCHx. Coinmunofluorescencia anti-caspasa-9 clivada y citocromo C en cortes de TO de embriones controles y embriones sometidos a hipoxia con 2, 4 y 6 hs de reoxigenación, contrateñidos con Hoechst. *A.* Microfotografías representativas de la tinción en cortes de embriones controles y 4 hs post-hipoxia. Barra 50 μ m. *B.* Cuantificación de células que presentan colocalización entre caspasa-9 clivada y citocromo C distribuido homogéneamente. Al menos un grupo presenta una media que difiere significativamente del resto ($P < 0,01$). Las barras representan la media + ESM de tres experimentos independientes. Determinado con ANOVA de una vía. *C.* Microfotografía de microscopía confocal que muestra la colocalización y distribución en una célula típica. Barra 10 μ m.

En todos los tratamientos post-hipoxia y control, observamos células que presentan colocalización, y el número de ellas aumenta a las 4 y 6 hs post-hipoxia (fig.21B). Este experimento no fue diseñado para dar cuenta de un cambio cuantitativo sino más bien cualitativo. El cambio cuantitativo observado nos permite inferir que no existe variación cualitativa, es decir que se da una igualdad en

la ejecución de la MCPD y la MCHx. Confirmando lo obtenido en experimentos anteriores, el perfil de la evolución post-hipóxica y los valores absolutos de células que colocalizan se asemejan a lo observado con caspasa-3.

IV.2. Vía extrínseca

Siguiendo la misma línea que el experimento de la vía intrínseca, quisimos analizar lo que ocurre con caspasa-8 luego de una hipoxia, preguntándonos si el perfil de activación correlaciona con el de caspasa-3 o 9. El anticuerpo dirigido contra la subunidad p18 de caspasa-8 activa, nos llevo a realizar un WB debido a su reactividad con la forma inactiva procaspasa-8 (p55) (fig.22).

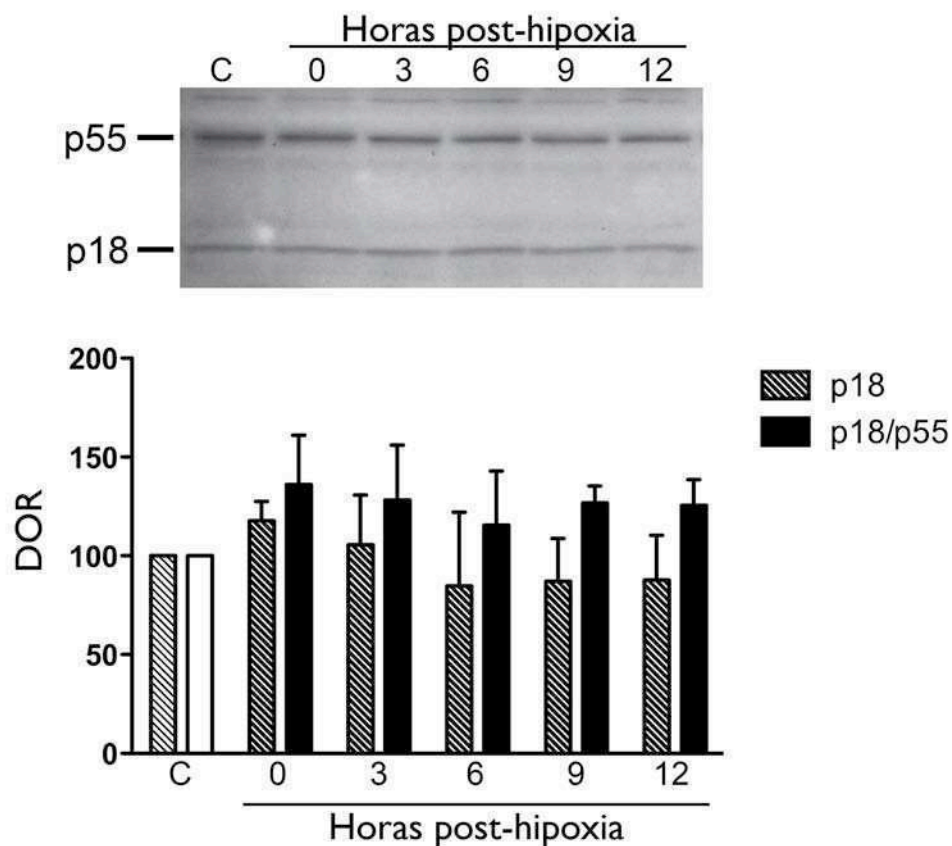


Figura 22. Los niveles de caspasa-8 inactiva y clivada no varían luego de una hipoxia.

Western Blot con anticuerpo anti-caspasa-8 sobre homogenatos totales de TO de embriones controles y sometidos a hipoxia con posterior reoxigenación. Placa autoradiográfica que muestra las bandas correspondientes a la procaspasa-8 (p55) y a una de las subunidades de la proteasa activa (p18) para cada tratamiento. En el gráfico de barras se presenta la cuantificación de la densidad óptica de ambas bandas relativizadas a su respectivo control, donde se grafica la forma activa y el cociente forma activa/procaspasa, para embriones controles y 0, 3, 6, 9 y 12 hs posteriores a la hipoxia. Los tratamientos no presentan diferencias significativas ni en el nivel de p18 ($P > 0,05$) ni en el cociente p18/p55 ($P > 0,05$). Las barras representan la media + ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con ANOVA de una vía independiente para cada análisis.

Sorpresivamente, observamos que ni los niveles de p18 ni los de p55 varían significativamente en ninguno de los tiempos post-hipoxia estudiados. La presencia de p18 en el tratamiento control y el mantenimiento de sus niveles en los distintos tiempos post-hipoxia podría ser un indicador de una actividad basal de caspasa-8 independiente de la hipoxia. Estos resultados nos permiten concluir que caspasa-8 no está involucrada en el proceso de muerte luego de una hipoxia; abriendo la posibilidad de que la vía extrínseca tenga un rol activo en la ejecución de la MCPD.

V. Vías de supervivencia en la MCHx

V.1. PI3K / Akt

A partir de los resultados que muestran que la mitocondria está involucrada en la MCHx, nos planteamos estudiar los mecanismos disparadores: ¿qué ocurre antes de los fenómenos mitocondriales?. Como las evidencias previas indican que la vía extrínseca no está involucrada, elegimos analizar la respuesta de la vía de supervivencia PI3K / Akt al evento de hipoxia. Akt tiene acciones rápidas y no genómicas sobre la regulación de la integridad de la mitocondria, específicamente sobre Bad (cfr. Intro. II.2.3.1) y podría tener un rol relativamente rápido de regulación sobre la liberación de citocromo c observado a las 4 hs post-hipoxia. Este rol podría ser tanto de rescate como de ejecución. Esto depende de la evolución de los niveles de pAkt luego de una hipoxia, si estos se elevan uno esperaría una respuesta de rescate, en el caso contrario una causa para la pérdida de integridad mitocondrial.

En concordancia con la hipótesis buscamos variaciones de Akt en tiempos peri-hipoxia: 0, 30 y 90 min post-hipoxia y también 30 min de hipoxia -es decir, qué ocurre en el medio de la hipoxia de una hora- (fig.23).

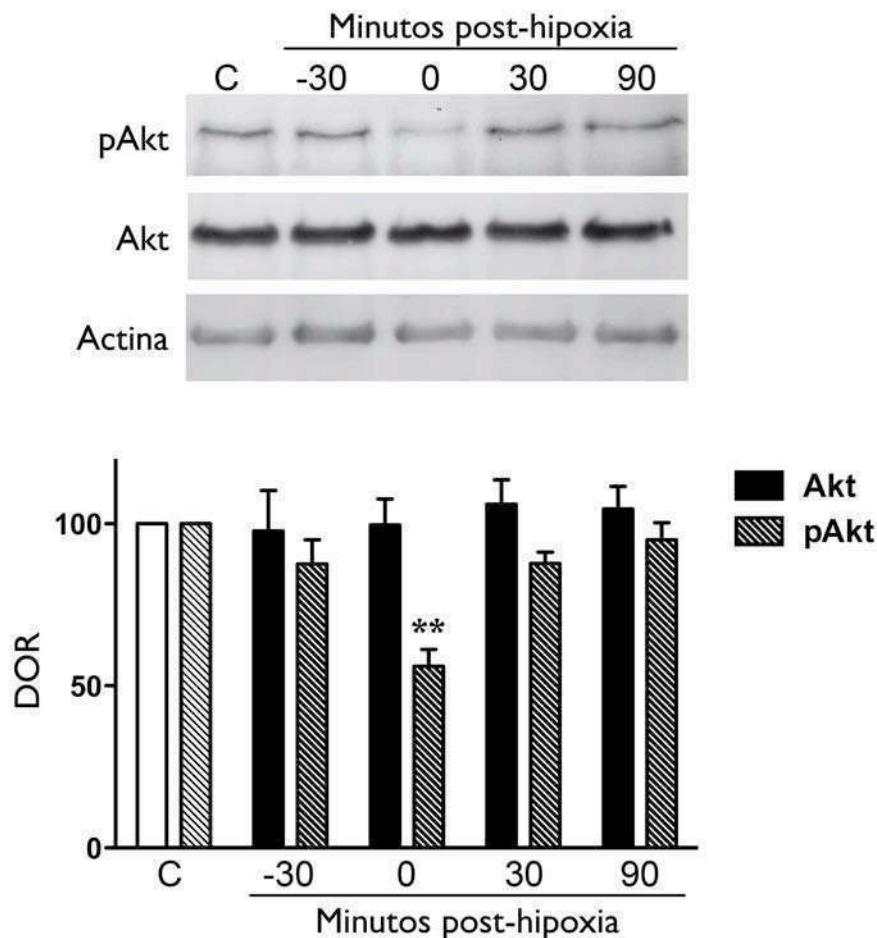


Figura 23. La activación de Akt disminuye durante la hipoxia.

Western Blot revelado con anticuerpos anti-Akt en su forma fosforilada, total y anti-actina sobre homogenatos totales de TO de embriones controles y sometidos a hipoxia clásica de una hora con posterior reoxigenación (0, 30 y 90 min) y a una hipoxia de 30 min (-30 min.). Placas autoradiográficas que muestran resultados típicos para los anticuerpos y tratamientos mencionados. En el gráfico de barras se presenta la cuantificación de la densidad óptica relativizada a su respectivo control para Akt y pAkt. La evolución de Akt total no varía significativamente ni durante la hipoxia (-30 y 0 min) ni posteriormente ($P > 0,05$). Por otro lado, los niveles de pAkt se encuentran significativamente reducidos luego de una hs de hipoxia ($P < 0,01$). Las barras representan la media + ESM de seis experimentos independientes. Determinado con ANOVA de una vía independiente para Akt, pAkt y Actina, y en caso de significancia prueba de Dunnett comparando los tratamientos versus el control. **, $P < 0,01$.

Los resultados obtenidos muestran que la activación de Akt disminuye a la hora de la hipoxia, recuperando rápidamente los niveles controles durante el período de reoxigenación -sin superar nunca estos niveles-. ¿Podría ser que esta disminución transitoria tenga incidencia sobre la MCHx también transitoria? Estos resultados indican que Akt en nuestro modelo no tiene un rol de rescate. Quizas, el costado negativo de este experimento es que no ofrece información sobre el tratamiento control. Previamente a hacer el WB, se probaron inmunofluorescencias en secciones de TO para aprovechar la información topográfica y específicamente relaciones Akt-pAkt por lámina que condujeran a establecer correla-

ciones con las tasas de muerte observadas previamente (cfr. fig.11 y 12). Sin embargo, fue imposible poner a punto estas inmunomarcaciones.

V.2. Estudio preliminar sobre la modulación de Akt

Una de las formas de probar una relación causal entre la disminución de pAkt durante la hipoxia y la muerte observada a las 6 hs es revertir esa disminución y ver que ocurre con las tasas de muerte. Debido a que los niveles de Akt totales no varían, su regulación es exclusivamente por fosforilación-defosforilación. Akt es fosforilada por dos kinasas, proceso que requiere de PIP3. Por otro lado, la defosforilación ocurre por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) que actúa sobre ser/treo y que tiene un amplio abanico de sustratos. Dadas estas condiciones, optamos por actuar sobre PIP3. La formación de PIP3 depende de PI3K, kinasa que fosforila PIP2 y el camino contrario lo realiza PTEN, una tirosina fosfatasa. Estimular la actividad de PI3K es complicado debido a que su activación depende del armado de un complejo de proteínas. La inhibición de PTEN podría ser una forma viable de incrementar los niveles de PIP3 temporalmente y así elevar los niveles de pAKT. A tal fin probamos bpv(phen), un compuesto de la familia de bisperoxovanadio (bpv), que a bajas concentraciones inhibe específicamente a PTEN mientras que en altas concentraciones es inhibidor de fosfatasas que actúan sobre tirosinas.

La forma de administración clásica en embriones de pollos es *in ovo*. En nuestro laboratorio se ha utilizado esta vía con éxito para administrar sistemáticamente varios fármacos, aunque todos ellos pequeños o liposolubles. Bpv(phen) es una molécula hidrofílica y relativamente pequeña, pero su administración por esta vía no mostró efectos para ninguna de las concentraciones sobre los dos marcadores que utilizamos: pAkt para ver sus efectos específicos y pTyr para ver sus efectos inespecíficos (fig.24A).

Para probar la eficacia de la droga, reproducimos los experimentos citados en la literatura sobre cultivos primarios de neuronas de TO obteniendo el aumento en pAkt y pTyr en los cultivos tratados con bpv(phen) durante 30 min (fig.24B).

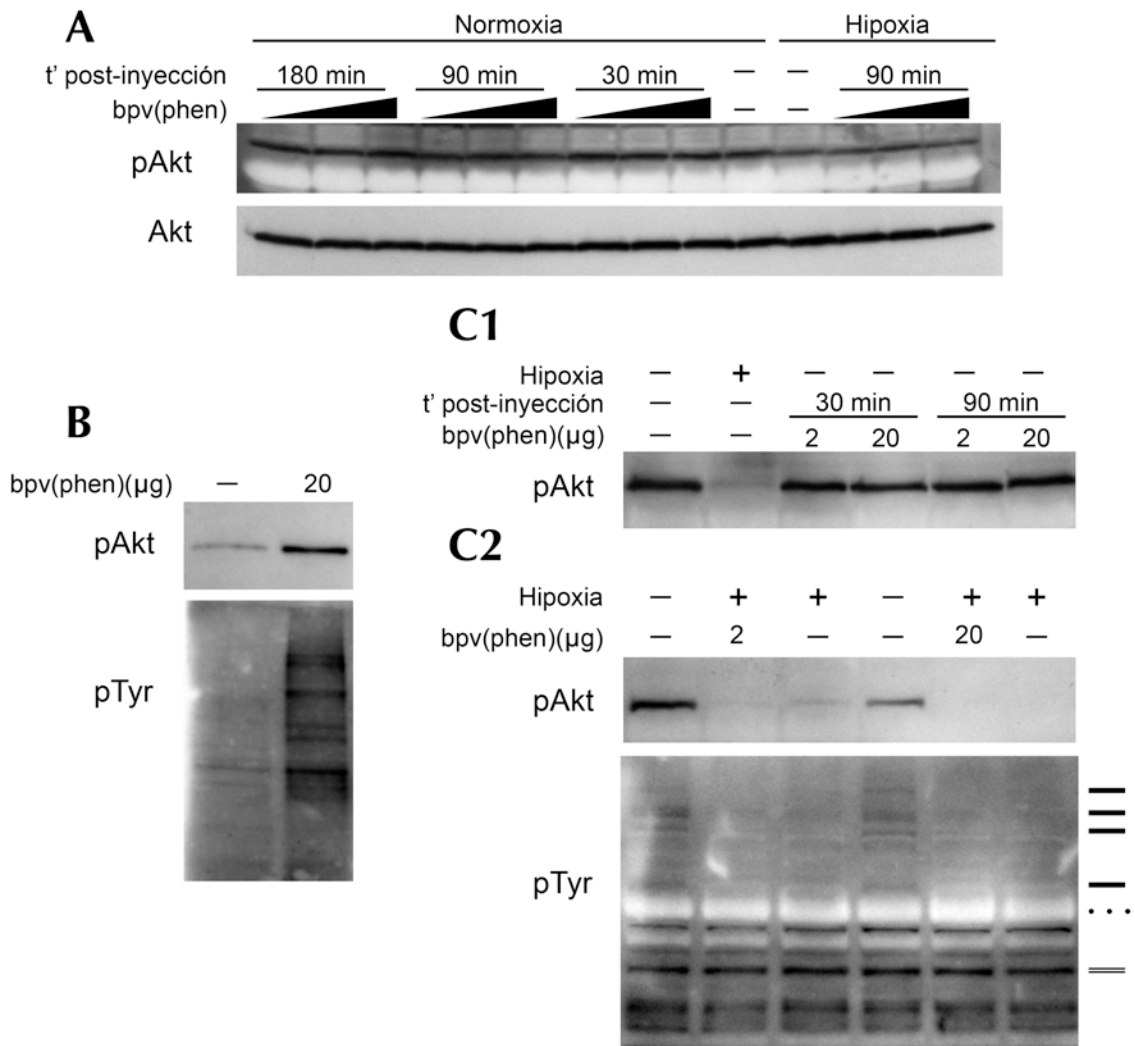


Figura 24. La administración de bpv(phen) *in ovo* o intravascular no genera variaciones de pAkt o pTyr en el TO.

Tres modelos experimentales sobre los cuales se administró bpv(phen): embriones *in ovo* (A), cultivo de embriones *ex ovo* vía intravascular (C) y cultivo neuronal primario (B). Western Blot revelado con anti-Akt en forma total, fosforilada y pTyr de homogenatos totales de TO (A y C) o fracción total de cultivo (B) para evaluar efectos de bpv. A. Embriones inyectados con 2, 20 y 200 μg de bpv y sacrificados a 30, 90 y 180 min post-inyección. Embriones sometidos a hipoxia de una hora previamente inyectados con bpv (30 min antes de la hipoxia) y sacrificados al finalizar la hipoxia. Los niveles de Akt no varían para ninguno de los tratamientos, mientras que los de pAkt varían sólo bajo el factor hipoxia. B. Cultivo de neuronas de TO de DE12 incubados durante 30 min con 20 ug de bpv. Tanto pAkt como pTyr muestran un evidente incremento con respecto al control. C. Cultivo de embriones *ex ovo*. La disminución de pAkt luego de una hipoxia es similar al modelo *in ovo* (calles 2 C1 y 3, 6/C2). La hipoxia *per se* genera disminución en la pTyr (C2) de algunas proteínas (líneas solidas) especialmente en el rango mayor a la ovoalbúmina (50 Kd aprox., línea punteada), mientras otras proteínas no varían (línea doble). La inyección intravascular de bpv sobre embriones normóxicos (C1) e hipóxicos (C2) no muestra efectos ni en los niveles de pAkt ni en los de pTyr.

Probada la acción de la droga el problema se centró en la forma de administrarla. El embrión a partir del DE6 se sumerge en el interior del huevo y comienza a moverse, motivos que hacen que el acceso al mismo se dificulte enormemente. Por esta razón pusimos a punto la técnica de cultivo de embriones *ex ovo* (cfr.

MyM. XIII). El embrión queda expuesto en su totalidad y se puede acceder tanto a la vasculatura como al embrión mismo. En los primeros ensayos se procedió mediante el uso de una lupa, un microinyector y un micromanipulador a inyectar intravascularmente bpv(phen) a 2 concentraciones distintas en embriones de DE12. Los resultados de la droga dieron negativos no encontrando variaciones en ninguno de los tratamientos (fig.24C1). A su vez, diseñamos un modelo en el cual realizar la hipoxia en los embriones *ex ovo*. Esta generó variaciones en pAkt similares a las observadas *in ovo*, las cuales no se ven modificadas por la inyección de bpv(phen) (fig. 24C1 y C2). Bpv(phen) tampoco afecta los niveles de pTyr, lo que indicaría que la droga es procesada previamente a su llegada al TO. A su vez por vez primera observamos que la hipoxia disminuye los niveles de pTyr, específicamente en bandas de peso molecular mayor a 50 Kd (el tamaño de la ovoalbúmina)(fig.24C2).

Frente a la imposibilidad de obtener efectos con la administración sistémica de bpv(phen), procedimos a desarrollar un método de inyección intratectal en cultivos *ex ovo*. Puesta a punto la técnica, procedimos a probar la inyección unilateral en embriones normóxicos de bpv(phen) a 3 concentraciones distintas, y dos tiempos post-inyección (fig.25A). Los resultados muestran la acción de la droga incrementando los niveles de pAkt de manera dosis y tiempo dependiente. También existe un aumento visible en el lado contralateral a la inyección, el cual posiblemente corresponda a la difusión de la droga por medio del ventrículo que separa ambos TO. pTyr presenta a grandes rasgos la misma respuesta dosis y tiempo dependiente, aunque los cambios en magnitud sean visiblemente mayores. A partir de estos datos, estimamos una cantidad de bpv de compromiso entre el mayor efecto posible sobre pAkt y el menor efecto sobre pTyr. Esta cantidad de 0,8 µg fue inyectada en TO derecho de embriones justo antes de ser sometidos a hipoxia, los cuales fueron divididos en dos grupos: uno sacrificado apenas finalizada la hipoxia (0 hs post-hipoxia) para análisis de WB (fig.25B), el otro sacrificado 6 hs post-hipoxia para analizar el efecto sobre la muerte celular (fig.25C). Las evaluaciones de los WB muestran que la inyección de bpv impide la caída en los niveles de pAkt que resulta de la hipoxia. Sin embargo, los niveles de pTyr siguen el mismo perfil, especialmente en el lado ipsilateral donde el aumento es eviden-

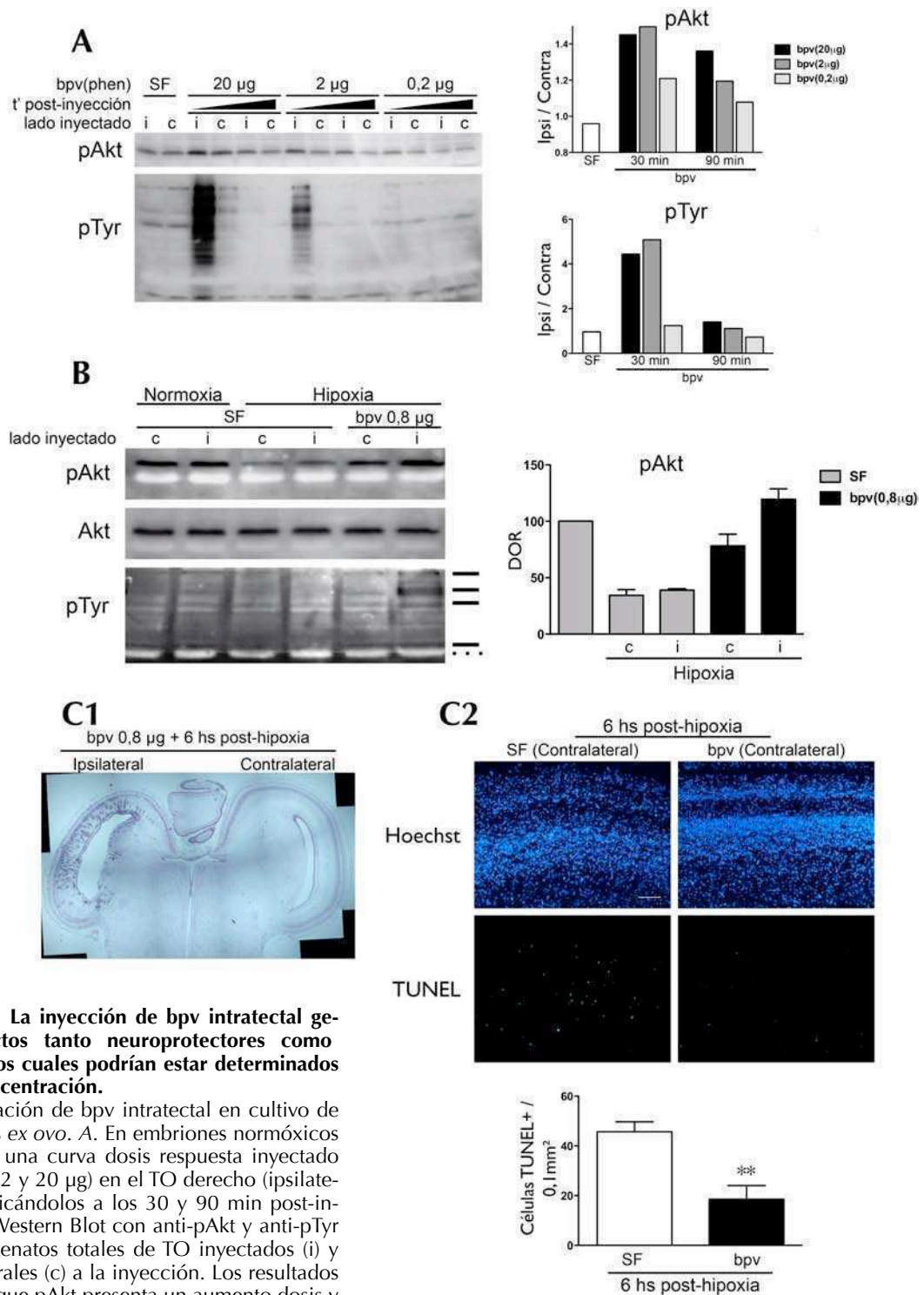


Figura 25. La inyección de bvp intratecal genera efectos tanto neuroprotectores como nocivos, los cuales podrían estar determinados por la concentración.
 Administración de bvp intratecal en cultivo de embriones *ex ovo*. A. En embriones normóxicos se realizó una curva dosis respuesta inyectado bvp (0,2 , 2 y 20 µg) en el TO derecho (ipsilateral), sacrificándolos a los 30 y 90 min post-inyección. Western Blot con anti-pAkt y anti-pTyr de homogenatos totales de TO inyectados (i) y contralaterales (c) a la inyección. Los resultados muestran que pAkt presenta un aumento dosis y tiempo dependiente. pTyr presenta cambios similares pero de mayor magnitud. Las gráficas evalúan las veces de incremento en los niveles de pAkt y pTyr de el lado inyectado (i) sobre el no inyectado (c). B. Embriones inyectados con 0,8 ug de bvp o solución fisiológica e inmediatamente sometidos a hipoxia, sacrificándolos a la finalización de la misma. Los Western Blot muestran que la caída en los niveles de pAkt al finalizar la hipoxia no ocurre cuando bvp es administrado previamente. El lado contralateral también presenta un incremento aunque menor con respecto a los embriones hipóxicos con SF. La gráfica presenta una --

cuantificación de densidades ópticas relativas, mostrando la media +ESM de dos experimentos independientes. pTyr presenta una respuesta similar a pAkt aunque más pronunciada, lo cual impide diferenciar la vía de acción de bvp. C. Embriones sometidos al mismo protocolo que en B pero con un período de 6 hs de recuperación post-hipoxia. C1. Tinción de Nissl en cortes de TO inyectados con bvp . C2. Hoechst y TUNEL sobre TO contralaterales de embriones inyectados con bvp o SF. Microfotografías que muestran resultados típicos para ambos tratamientos y gráfica donde se observa una disminución significativa de células TUNEL+ para el TO tratado con bvp. Las barras representan la media + ESM de 3 experimentos independientes. Determinado con prueba de student; ** P < 0,01.

te. Más allá de los resultados que se presentan en el próximo párrafo, esta acción de bpv sobre las fosfatasa de tirosina hace imposible la discriminación entre el efecto de aumentar pAkt y aumentar pTyr, y sería necesario probar la inyección de cantidades menores de bpv con el riesgo asociado de perder activación de Akt.

Debido a que hasta el momento no habíamos podido observar cambios en los niveles de pAkt, los embriones nunca se dejaron vivir más de 90 min post-inyección. Todos los embriones sobrevivieron hasta las 6 hs post-hipoxia (e inyección), aunque los inyectados con bpv presentaban a simple vista en el TO ipsilateral una gran vasodilatación y hemorragia. Incluimos, seccionamos y teñimos los TO de estos embriones con la tinción de Nissl. Esta tinción corroboró la vasodilatación y la infiltración de elementos de la sangre en el tejido nervioso, el cual presenta una degeneración neuronal masiva (fig.25C1). Sin embargo el TO contralateral mantiene su citoarquitectura con vasos aparentemente normales. Esta observación nos llevó a realizar un TUNEL sobre estos cortes, donde observamos que la marca TUNEL positiva en el lado contralateral es escasa y comparada con el lado contralateral inyectado con SF es significativamente menor (fig.25C2). Además, las cuantificaciones absolutas de células TUNEL+ del embrión inyectado con solución fisiológica y el inyectado con bpv (ambos contralaterales) coinciden con valores observados para embriones *in ovo* sometidos a hipoxia y embriones *in ovo* controles respectivamente (cfr. fig.26 tratamientos controles e hipóxicos). Esto significa que por un lado la hipoxia *ex ovo* funciona de manera similar a la hipoxia *in ovo* (validando el modelo), por otro que bpv a una concentración determinada podría estar neuroprotegiendo. Entendemos que esta última afirmación es de carácter potencial y que en realidad abre un posible camino de estudio donde experimentos con mayor peso estadístico como así también pruebas con distintas concentraciones deben ser realizados. Esto es especialmente cierto si se quiere discriminar si la acción neuroprotectora de bpv ocurre vía pAkt o vía pTyr.

VI. Efectos neuroprotectores del estradiol post-hipoxia

Habiendo caracterizado la MCHx tanto en evolución temporal como en activación de marcadores moleculares, nos propusimos probar los efectos neuroprotectores del estradiol post-injuria. Varios estudios documentan los efectos neuroprotectores del estradiol frente a daños del tipo HI, sin embargo la mayoría de estos estudios son preventivos y la vía de acción del estradiol genera resultados contradictorios. Se conocen dos mecanismos de acción del estradiol, uno dado por sus propiedades antioxidantes, el otro mediante interacción con receptores. Para discriminar entre estas dos vías de acción utilizamos un antagonista competitivo de los receptores de estrógenos, ICI 182,780.

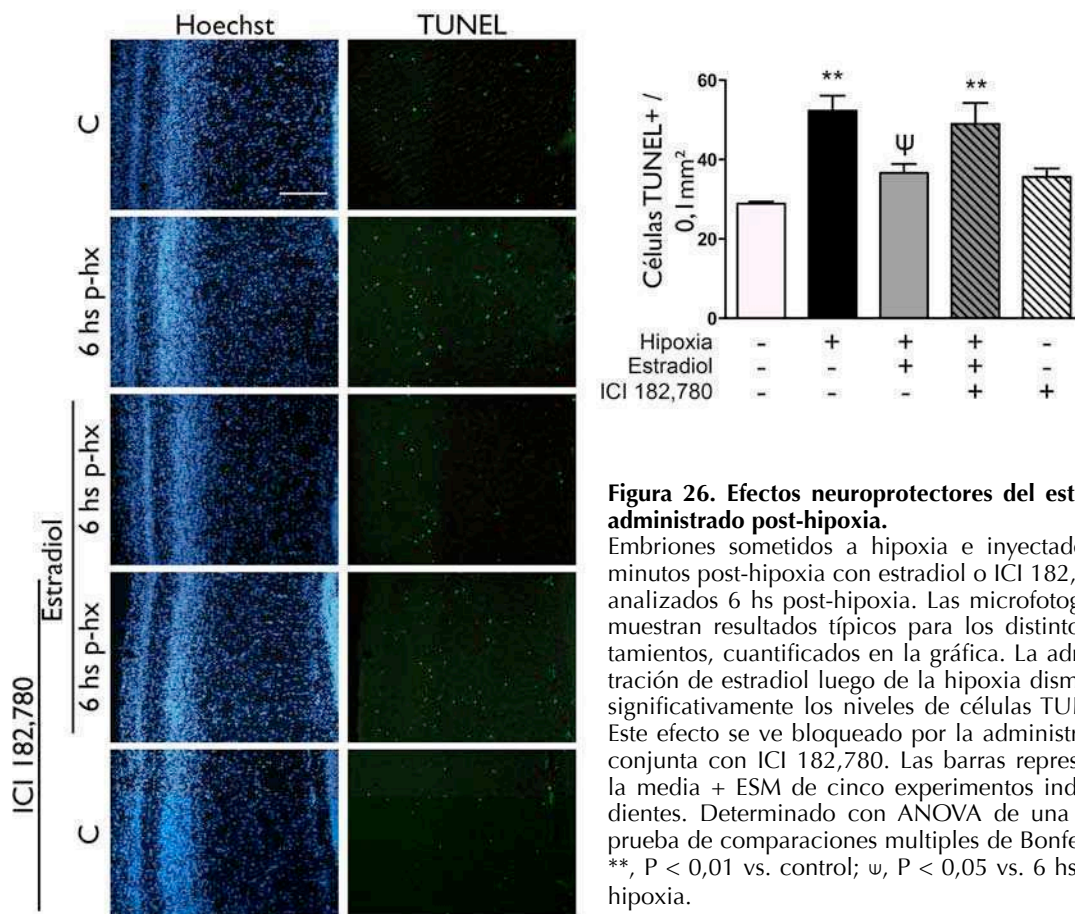


Figura 26. Efectos neuroprotectores del estradiol administrado post-hipoxia.

Embriones sometidos a hipoxia e inyectados 30 minutos post-hipoxia con estradiol o ICI 182,780 y analizados 6 hs post-hipoxia. Las microfotografías muestran resultados típicos para los distintos tratamientos, cuantificados en la gráfica. La administración de estradiol luego de la hipoxia disminuye significativamente los niveles de células TUNEL+. Este efecto se ve bloqueado por la administración conjunta con ICI 182,780. Las barras representan la media + ESM de cinco experimentos independientes. Determinado con ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. **, $P < 0,01$ vs. control; ψ , $P < 0,05$ vs. 6 hs post-hipoxia.

A tal fin, sometimos a hipoxia a los embriones de DE12, de los cuales un grupo fue inyectado con estradiol solo y otro con estradiol e ICI 182,780 a los 30 minutos post-hipoxia. Los embriones fueron incubados hasta las 6 hs post-hipoxia momento en el cual se sacrificaron (fig.26). La cuantificación de células TUNEL+

en los distintos tratamientos muestra que el estradiol actúa como neuroprotector cuando se administra 30 min después del evento hipóxico. También observamos que si se bloquea la interacción con el receptor de estrógenos, la neuroprotección se pierde, indicando que la vía de acción del estradiol no es por sus propiedades antioxidantes. Estos resultados fueron complementados y confirmados con análisis de liberación de citocromo C y clivaje de caspasa-3 (datos no mostrados).

Este estudio aporta un dato interesante relacionado con las observaciones previas: la intervención 30 min post-hipoxia es capaz de inhibir la MCHx. Esto significa que una vez finalizada la hipoxia y hasta una hora después también, el destino celular no está determinado. El momento o el evento donde se determina el destino de muerte se conoce como punto de no retorno, una vez pasado no hay forma de impedir la muerte celular. Entre las acciones rápidas de los estrógenos se ha descrito una modulación positiva de PI3K. Sería interesante probar si el estradiol logra elevar los niveles de pAkt de forma que revierta lo que la disminución de pAkt durante la hipoxia hizo.

DISCUSSION

I. Daños hipóxicos sobre el TO

Nuestro modelo de hipoxia representa una componente de la isquemia, es decir la disminución en la concentración de O_2 en los tejidos. En este sentido, los daños generados por la hipoxia corresponden exclusivamente a la disminución de O_2 , y si bien el modelo hipóxico es reduccionista, es más transparente a la hora de reconocer las causas que generan un daño. La hipoxia al ser de carácter global, carece de las regiones de núcleo y penumbra definidas en base al nivel de flujo sanguíneo en los eventos isquémicos. En la hipoxia todo el organismo es expuesto a una misma reducción de O_2 , y las diferentes respuestas entre estructuras son atribuibles a características intrínsecas del sistema que se analiza y no a diferencias fruto del modelo.

Nuestros resultados muestran por primera vez que las propiedades típicas de eventos de HI como vulnerabilidad diferencial y retraso temporal son producto de la disminución en la concentración de O_2 . Es cierto que existen variables que no fueron analizadas (niveles de CO_2 , niveles de glucosa, variaciones en el flujo sanguíneo) que pueden verse afectadas, sin embargo -en caso de existir- son producto de la respuesta del organismo a la disminución sistémica en los niveles de O_2 , y como tales secundarias.

Por un lado observamos una vulnerabilidad diferencial de las láminas: tres de cuatro láminas son sensibles a la hipoxia (cfr. fig.11). En modelos de HI uno de los causales de la vulnerabilidad diferencial proviene de factores externos a la estructura: excitotoxicidad y factores tróficos.

La excitotoxicidad ha sido ampliamente estudiada en relación a patologías isquémicas, donde se la asocia con muerte neuronal tardía y aguda localizada en la penumbra isquémica (Olney, 1993; Dirnagl et al., 1999; Mergenthaler et al., 2004). Durante un evento de hipoxia-isquemia, ocurren despolarizaciones anóxicas en la región núcleo que conducen a un incremento en la liberación de glutamato (Katchman y Hershkowitz, 1993; Balestrino, 1995), generando en la postsinapsis -que puede estar fuera del núcleo isquémico- una sobreactivación tanto de receptores ionotrópicos como metabotrópicos, con la consecuente entrada masiva de calcio, generación de radicales libres y actividad enzimática anormal en la

neurona postsináptica (Siesjö et al., 1989; Lipton y Rosenberg, 1994; Lipton, 1999).

Respecto a factores tróficos -particularmente en modelos de desarrollo-, se observó que luego de una HI focal que afecta principalmente el prosencéfalo, se produce un daño tardío -en días- en regiones secundarias interconectadas con la primera (Nakajima et al., 2000; Northington et al., 2001c). Estas observaciones sumadas al hecho de que el fenotipo de muerte secundaria es apoptótico (Northington et al., 2001a) y que la inyección ICV de neurotrofinas es neuroprotectora sólo en animales inmaduros (Cheng et al., 1997), han llevado a plantear la hipótesis de que la privación de factores tróficos de forma aferente puede inducir daño selectivo secundario (Northington et al., 2005). Esta hipótesis cobra especial relevancia durante el desarrollo, cuando la dependencia de factores tróficos para la supervivencia es fundamental.

Teniendo en cuenta estos dos procesos, hipotetizamos que la vulnerabilidad diferencial podía ser producto de alguno de ellos, ya que en el sistema retino-tectal al DE12 las condiciones podrían dar lugar a fenómenos de excitotoxicidad o de dependencia de factores tróficos: a) el TO presenta sinápsis glutamatérgicas provenientes de las CGR desde el DE7 (McGraw y McLaughlin, 1980; Beaudet et al., 1981); b) se han registrado potenciales espontáneos en las CGR en el DE12 (Wong et al., 1998); c) ha sido descrito el transporte de factores tróficos desde y hacia la retina (von Bartheld et al., 1996; Herzog y von Bartheld, 1998; Caleo et al., 2000; Chytrova y Johnson, 2004); d) las láminas vulnerables (i.e. CCT3, C'h-i-j' y SGC) presentan conexiones con las fibras provenientes de la retina, mientras que la lámina que no se ve modificada por la hipoxia no.

A pesar de los argumentos, el ensayo de enucleación muestra que el daño hipóxico es el mismo independientemente de la presencia o ausencia de fibras. Así permite rechazar la hipótesis y concluir que los daños provocados por la hipoxia en el TO son producto de fenómenos exclusivamente locales. Las características locales que podrían estar influyendo en la vulnerabilidad diferencial son múltiples (cfr. Intro. 1.3.2). En los análisis preliminares con Hoechst sobre el TO, observamos una mayor abundancia de células endoteliales y eritrocitos en la lámina ZsV. En el resto de las láminas su abundancia disminuye aunque se pueden evidenciar vasos de trayecto radial bien claros. Esta observación tiene una impor-

tancia que no debe ser menospreciada en modelos de hipoxia. La mayor vascularización de una lámina podría influir en la susceptibilidad de la región a la hipoxia. Nuestras observaciones indican que la lámina aparentemente más vascularizada es invulnerable en términos de muerte celular a la hipoxia. Esta línea por la cual abordar las diferentes vulnerabilidades laminares podría ser promisorio para futuros análisis.

Otro fenómeno característico observado es el retraso temporal: en las láminas vulnerables la muerte se manifiesta 6 horas después de finalizada la hipoxia. En los modelos de HI las cosas son distintas. Modelos experimentales con HI “suaves” o cortas muestran un retraso prolongado en la muerte neuronal. Du et al han observado que luego de una HI transitoria de 30 min la corteza no muestra signos de neurodegeneración (células TUNEL +) hasta 3 días posteriores al evento, sin embargo una HI de 90 min presenta a las 6 hs evidencias de daño (Du et al., 1996). Los modelos en que el daño se manifiesta durante o en las primeras horas son HI permanentes (Liu et al., 2004) o corresponden a isquemias globales (Kawai et al., 1992). Si bien nuestro modelo actúa a nivel global, el impacto en el organismo parece ser leve: los embriones completan su maduración y eclosionan sin mostrar diferencias evidentes con embriones normóxicos. Conjeturamos que la rapidez en la manifestación de la muerte hipóxica en nuestro modelo se debe a que los mecanismos de muerte se encuentran con un grado de disponibilidad más alto que si ocurriera en un animal adulto. Esta afirmación esta apoyada por resultados obtenidos en nuestro laboratorio donde se observó que en el DE18, cuando la MCPD es significativamente menor que en el DE12, la hipoxia no genera daños (Vacotto et al., 2006).

Una característica exclusiva de la muerte hipóxica en nuestro modelo es el escaso tiempo que dura la manifestación de la muerte. No se observa presencia de MCHx hasta las 6 hs, y a las 9 horas post-hipoxia las tasas de muerte están restablecidas a valores del desarrollo sin quedar rastros. En los modelos de HI la evolución de marcadores de muerte celular es prolongada en el tiempo, observándose duraciones de aproximadamente 72 hs -para marcadores como caspasa-3 y TUNEL en distintas regiones (Zhu et al., 2000)- o hasta más tiempo (Nakajima et al., 2000; Wang et al., 2001). Esta característica propia de la hipoxia marca lo

discreto del fenómeno en términos temporales: la muerte celular hipóxica tiene un inicio y un fin muy delimitados. Es probable que en nuestro modelo una subpoblación inicie el proceso de muerte en conjunto, al mismo tiempo y con los mismos tiempos de ejecución y los restos celulares sean rápidamente removidos.

II. MCPD en el TO

El TO al DE 12 se encuentra rodeado temporalmente por dos grandes oleadas de MCPD. La primera ocurre en el DE7 (Zhang y Galileo, 1998), corresponde a la muerte temprana sobre neuroblastos y células postmitóticas jóvenes. La segunda, descrita en nuestro laboratorio -observaciones no publicadas-, se manifiesta principalmente en los DE15-16 y depende de influencias tróficas y sinápticas. Nuestros resultados muestran que existe un gradiente de muerte que afecta principalmente a la ZsV y la SGC -láminas ontogenicamente más tempranas- y en menor medida a las láminas C'h-i-j' y CCT3 -láminas más tardías-. La mayor muerte en la ZsV sugiere que la muerte observada al DE12 es una prolongación o resabio de la primer oleada de muerte, localizada fundamentalmente en la zona ventricular.

Por otro lado, nuestros resultados sobre la enucleación muestran que la supervivencia neuronal en el TO es independiente de factores tróficos o actividad sináptica provenientes de la retina al DE12. Además, amplían estudios previos que sugieren que el desarrollo del TO hasta el DE12 es independiente de la retina (LaVail y Cowan, 1971; Kelly y Cowan, 1972). En estos estudios se analizó el desarrollo citoarquitectónico del TO durante su ontogenia en embriones enucleados pero nada sobre procesos sutiles como la muerte celular, que podría estar ocurriendo sin por ello afectar el patrón laminar. Se ha descrito mediante la inyección de bloqueantes del transporte axonal (colchicina) o de potenciales de acción (TTX) en la retina, que las células del TO al DE16 son dependientes de ambos estímulos anterógrados (Catsicas et al., 1992). Debido a que no encontramos cambios en los niveles de muerte celular entre el lado aferentado o deaferentado, podemos concluir que esta dependencia comienza en algún momento entre el DE13 y el DE15.

Es común en experimentos donde se cuantifican los niveles de muerte celular o se quiere seguir la evolución de un daño encontrarse con el problema de la tasa de desaparición de células muertas (Blaschke et al., 1996), puesto de otra forma: ¿cómo saber si la célula marcada al tiempo $t+1$ es o no la misma que la marcada al tiempo t ? Si es la misma hay una célula muerta, caso contrario hay dos, acumuladas en el tiempo. A pesar de parecer un dato menor, es una complicación al momento de estimar la evolución y magnitud del daño. La solución, que no siempre es posible, es contar células normales en vez de muertas. Sin embargo en nuestro modelo existe otra forma. Por ejemplo en la figura 10A se muestra la evolución a través del DE12 de la muerte celular, donde en esas 12 horas las tasas son iguales para cada lámina. Si tomamos la lámina CCT3 vemos que alrededor de 4 células muertas aparecen cada 3 horas del día, ¿Son cuatro células en las 12 horas o son 20 células en 12 horas? Para responder esto observamos que el proceso apoptótico luego de una hipoxia se manifiesta aproximadamente durante 3 hs. Si aceptamos la premisa de que la duración de ambos procesos es la misma si muere por hipoxia o por muerte del desarrollo -lo cual es altamente probable-, entonces podemos afirmar que en la lámina CCT3 tenemos una tasa de muerte de cuatro células cada 3 horas. El proceso apoptótico *in vivo* puede transcurrir en tiempos muy variables: en el hígado se ha observado que ocurre en 3 hs (Bursch et al., 1990), en corteza suprarrenal toma entre 12-18 hs (Wyllie et al., 1980), mientras que en SNC luego de un daño alrededor de 24 hs (Portera-Cailliau et al., 1997a; Al-Abdulla et al., 1998). La gran diferencia de tiempo con respecto a nuestros resultados, indican que posiblemente la muerte celular del desarrollo en tanto que programada presenta una mayor rapidez en su ejecución.

III. Tipos celulares involucrados en la muerte celular

Para identificar que tipo celular podría estar involucrado tanto en la MCHx como en la MCPD utilizamos anticuerpos contra la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN). Esta marca mostró colocalización casi en su totalidad con la marca TUNEL+. Sin embargo la marca ubicua de NeuN y su ambigüedad como marcador neuronal en general (Rakic, 2002; Abrous et al., 2005), nos condujo a probar la inmunomarcación astrogliar.

Nuestros ensayos de inmunomarcación muestran por primera vez, que la expresión de GFAP comienza a observarse en el DE14. Su distribución sigue el gradiente ventro-dorsal de desarrollo, con abundante marca en la región ventral -aproximadamente DE15- y ausencia de marca en la región dorsal -aproximadamente DE13-. Sorpresivamente coincide temporalmente con oligodendrocitos MAG positivos (Galileo, 2003). Sin embargo la distribución de la marca presenta algunas diferencias: la marca GFAP+ se observa en la ZsV, SAC y la región inferior del SGC, quedando excluidos en el DE14 las láminas superiores. Por otro lado, los oligodendrocitos al DE15 están presentes en la ZsV, SAC y SO. Nuestros resultados fueron corroborados por un trabajo posterior que realizó una caracterización ontogénica de GFAP en el TO, donde se observa un incremento notorio de GFAP alrededor del DE14 (Seo et al., 2008).

A pesar de los resultados negativos de GFAP en el DE12, el aporte del análisis ultraestructural en líneas generales muestra que las células en proceso apoptótico tienen características neuronales (cfr. Res. III). Sin embargo, El TO en el DE12 se encuentra bajo un proceso generalizado de diferenciación, ya sea a tipo neuronal como glial y tratar de distinguir entre los tipos celulares requeriría de una batería de marcadores mucho más amplia que los utilizados en nuestros experimentos.

IV. Análisis morfológicos

Tanto la rapidez con la que se desarrolla la muerte hipóxica, como su corta duración, nos llevo a plantearnos si esta muerte podría ser una exacerbación de la MCPD. El análisis morfológico y ultraestructural es una parte de la comparación, el análisis de vías moleculares la otra.

En los análisis de colocalización observamos que tanto la MCPD como la MCHx presentan condensaciones nucleares en distintas formas, con marca TUNEL positiva y caspasa-3 clivada. Sin embargo, podría ser el caso que alguna categoría formada por la conjunción de estas tres variables se viera representada diferencialmente en algún tratamiento o en alguna lámina, abriendo la posibilidad de encontrar distintos procesos de muerte.

Mas allá de que los análisis de frecuencias para las distintas láminas nos muestran que éstas categorías se distribuyen diferencialmente entre las láminas

para cada tratamiento, las conclusiones que pudieran sacarse de este resultado las minimizamos debido a la influencia de la categoría residuos. Experimentalmente resulta muy difícil distinguir partículas muy chicas en láminas con densidad celular alta, su escasa fluorescencia queda enmascarada por la ubicua fluorescencia nuclear. Así, se observa que en las láminas de baja densidad (EGC y ZsV) la categoría residuos tiene una frecuencia relativa importante mientras que en las de alta densidad (CCT3 y C'h-i-j') es casi nula, y esto ocurre en ambos tratamientos. También podría explicarse como un resultado de la fagocitosis de células circundantes. Al ser la densidad celular más alta, el tiempo de vida libre de los residuos es mucho más bajo, ya que la cercanía de células favorece la fagocitosis y su desaparición.

Cuando comparamos la distribución de las frecuencias entre los distintos tratamientos, observamos que no existen diferencias significativas para ninguna de las láminas. Este resultado nos conduce a pensar que las categorías observadas ordenadas sucesivamente muestran lo que sería un proceso de degeneración celular, y que este proceso es común a la MCPD y la MCHx. Este proceso detallado en la figura 16 está compuesto por estadios que tienen distintas frecuencias de aparición, las cuales reflejan los tiempos de duración de cada estadio.

La caracterización de la muerte derivada de HI ha sido objeto de controversias metodológicas (Collins et al., 1992; Wei et al., 2004) y ultraestructurales (Colbourne et al., 1999; Nakajima et al., 2000; Chu et al., 2002). Dos factores han contribuido a que esto ocurra: uno, la heterogeneidad de los modelos experimentales; dos, la evidente dificultad de enmarcar un fenómeno gradual en categorías rígidas.

En nuestro modelo experimental el análisis ultraestructural es concluyente respecto a las características apoptóticas de la MCHx, no solo por similitud con la MCPD, sino por las descripciones propuestas por Wyllie (Wyllie et al., 1980) y otros autores (Martin et al., 1998). La presencia de los siguientes hitos de la apoptosis es clara en ambos procesos:

- mantenimiento de la integridad celular durante todo el proceso degenerativo
- picnosis concentrada en dos o tres cuerpos grandes circulares

- ausencia de edema celular o *swelling*, más bien existe un compactamiento gradual de la célula durante todo el proceso.

Como contrapartida y en alusión a la tendencia de enmarcar un fenómeno gradual en categorías, podemos decir que por un lado observamos ruptura de la membrana nuclear, que si bien es tardía no suele ocurrir en las descripciones de apoptosis clásicas. Por otro lado, no hemos podido observar claramente la evolución mitocondrial. En las descripciones clásicas de apoptosis la mitocondria mantiene su integridad hasta avanzado el proceso degenerativo.

Otras características interesantes observadas:

- Caspasa-3 como ejecutora: la abundante presencia de caspasa-3 activa previa a la degeneración nuclear es un claro indicio de que la caspasa-3 no solo acompaña la muerte sino que la precede. En determinados casos de necrosis también existe activación de caspasa-3, pero esta ocurre luego de que se evidencian daños morfológicos.
- Participación de las neuronas en el proceso apoptótico: Durante el desarrollo la identificación de los tipos celulares es difícil debido a su escasa diferenciación. Sin embargo, hemos identificado neuronas multipolares de la SGC: son células con un gran núcleo y abundante citoplasma, que presenta un RER bien desarrollado, mitocondrias y aparato de Golgi visibles. Los fenotipos apoptóticos observados en la SGC pertenecen en su mayoría a estas neuronas. En la lámina C'h-i-j' los tipos celulares presentes son más homogéneos y resulta difícil poder hacer una discriminación certera.
- Fagocitosis: la amplia mayoría de las células en proceso apoptótico son fagocitadas por células fagocíticas o por astrocitos y no por células vecinas.
- Degradación de prolongaciones: nuestras observaciones nos llevan a concluir que la degradación de las prolongaciones de la neurona presenta una morfología distinta a la que sufre el soma -no hemos encontrado en la literatura observaciones al respecto-. Las prolongaciones presentan sacos membranosos enrollados sobre si mismos, junto a agregados proteicos electrondensos que se agrupan formando ovillos. La distribución de estos agregados es muy similar a las prolongaciones marcadas con caspasa-3 en forma de cuentas de collar, observadas con microscopia de fluorescencia. Normalmente se encuen-

tran cerca del soma en degeneración, y por eso han sido identificadas como cuerpos apoptóticos desprendidos del soma (Ishimaru et al., 1999). Sin embargo los cuerpos apoptóticos, si bien están separados del soma presentan un contenido muy similar a este.

En conjunto, nos resulta llamativo que la hipoxia genere un fenotipo con características similares a la MCPD subyacente, observación que tomada en conjunto con la evolución temporalmente discreta de la MCHx nos conducen a pensar que la apoptosis como proceso activo durante el DE12 (MCPD) sirve de molde para el daño hipóxico. Los resultados se pueden pensar como un umbral a partir del cual las células mueren, determinado por un equilibrio en la relación supervivencia/muerte. La presencia de factores desequilibrantes del sistema (como la hipoxia), disminuye temporalmente ese umbral, conduciendo a una muerte celular mayor.

V. Vías ejecutoras

Análisis en nuestro laboratorio sobre las vías ejecutoras que participan en la muerte apoptótica por hipoxia muestran que ocurre un incremento en la liberación de citocromo c a las 4 hs post-hipoxia mediante western blot (Pozo Devoto et al., 2008) y mediante inmunomarcación. Con esta segunda técnica confirmamos que esta liberación se ve acompañada por clivaje de caspasa-9 como ha sido reportado previamente (Cain et al., 2000). Esta marca se adelanta temporalmente a la marca de caspasa-3 clivada observada a las 6 hs y la marca de caspasa-3 clivada se adelanta a la fragmentación de DNA (cfr. fig.16a-b).

Sin embargo, caspasa-8 queda excluida de la MCHx (cfr. fig.22) y por lo tanto la vía intrínseca sería la única ejecutora de la MCHx.

Los resultados sobre la MCPD son un poco más complejos. Por un lado se observa activación de la vía intrínseca. Por otro lado la vía extrínseca parecería tener una activación basal que no se ve modificada por la hipoxia y un perfil muy similar a las tasas de muerte del desarrollo (cfr. fig.22). Como se detalla en la introducción la vía extrínseca puede activar mediante Bid la intrínseca, y ese proceso explicaría lo observado. Pero esto conduce a que los activadores de la MCPD sean propios de la extrínseca: por ejemplo FasL.

¿Qué tan común es la vía extrínseca como ejecutora de la MCPD? A diferencia de la intrínseca la vía extrínseca no ha recibido la misma atención en el SNC en desarrollo. El rol de ésta ha sido estudiado en profundidad en el sistema inmune donde -entre otras- ejecuta la selección de linfocitos T competentes en el timo (Nagata, 1997). En el SNC en desarrollo la expresión de los receptores de muerte ha sido evidenciada por varios estudios (Park et al., 1998; Cheema et al., 1999), mientras que en adultos la expresión parece estar restringida a la sustancia blanca (Shin et al., 2002) o con posterioridad a un daño (Martin-Villalba et al., 1999; Beer et al., 2000). Se ha observado que Fas se expresa en el desarrollo en corteza e hipocampo, y colocaliza con la expresión de FasL en la zona ventricular de la corteza. A su vez, tanto la expresión espacial como temporal de Fas durante el desarrollo correlaciona con la presencia de figuras apoptóticas (Cheema et al., 1999). Sin embargo, la activación de la casacaada apoptótica requiere más que la presencia de Fas/FasL: mutantes con pérdida de función para Fas no presentan anomalías en el desarrollo del SNC (Cohen y Eisenberg, 1991); la expresión de moléculas adaptadoras como FADD necesarias para la activación de mecanismos apoptóticos podría tener una regulación temporal; también la expresión de moléculas inhibitoras de la activación de Fas como FLIP (Scaffidi et al., 1999) y LFG (lifeguard) presenta una dependencia temporal (Schweitzer et al., 1998).

En conclusión, el resultado de caspasa-8 es simplemente un indicio, pero este cobra relevancia a la luz de los experimentos de bpv(phen) y de estradiol. La neuroprotección brindada por estas dos moléculas revierten la muerte a las 6 hs post-hipoxia sólo hasta los niveles normóxicos, y su sola aplicación no altera la MCPD. Estas evidencias apoyan la noción de que en algún punto la cascada de eventos que conducen a la MCPD y a la MCHx difieren.

VI. Rol de PI3K/Akt en la MCHx

Tres horas luego de una HI transitoria los niveles de pAkt se ven incrementados, y a las 7 horas se observa un incremento en las células TUNEL+. Si se aplica un inhibidor de PI3K, los niveles de pAkt no se elevan y el número de células TUNEL+ se ve incrementado (Kamada et al., 2007). Esta respuesta de Akt es un ejemplo que se repite en los modelos de HI transitoria (Ouyang et al., 1999), bá-

sicamente parecería que pAkt “sale a rescatar” luego de un daño HI. En esos modelos claramente el ejecutor de la muerte es otra vía, posiblemente JNK.

En nuestro modelo hemos observado que sólo luego de una hipoxia de una hora los niveles de pAkt se encuentran disminuidos, para restablecerse a los valores controles a los 30 min post-hipoxia. Según nuestros resultados la respuesta de rescate esta ausente, más bien se podría involucrar a Akt como un mediador de la muerte hipóxica, en el sentido de que su apagado transitorio conduzca a desbalances que generen activación de la vía intrínseca. Todo esto sin la necesidad de una vía de ejecución.

¿Podría ser que sólo la inhibición transitoria de PI3K/Akt fuera la responsable de la MCHx? Como antecedente, un estudio en múltiples sistemas celulares *in vitro* ha descrito que la sola desactivación de Akt es causal de muerte celular (Luo et al., 2003).

Para probar una parte de la relación causal diseñamos el experimento de bpv(phen). bpv(phen) es un compuesto de la familia de bisperoxovanadio, los cuales están relacionados con los compuestos de Vanadio -entre ellos el ortovanadato es un inhibidor de fosfatasas de tirosina ampliamente utilizado-. bpv(phen) tiene la capacidad de inhibir fosfatasas de tirosina pero presenta una acción específica sobre PTEN a concentraciones 100 veces menor que sobre el resto de las fosfatasas (Schmid et al., 2004). La mayoría de los estudios utilizando esta molécula fueron realizados en cultivos celulares (Schmid et al., 2004) o tejidos (Lai et al., 2007)

Nuestros resultados preliminares muestran que una estimulación de pAkt a niveles por debajo del control podría estar ejerciendo efectos neuroprotectores frente al daño hipóxico (cfr. fig.25). Este efecto sería producto de una difusión de la droga del lado ipsilateral al contralateral a través del tercer ventrículo (cfr. fig.25A: los lados contralaterales presentan un aumento leve en pTyr y pAkt para 20 y 2 µg). Sin embargo, es indiscutible que la concentración de 0,8 µg inyectada en el tectum a pesar de generar un aumento de pAkt a las 0 hs post-hipoxia tiene efectos nocivos en el lado ipsilateral. Tanto el procedimiento como el volumen inyectado quedan descartados como factores: los inyectados con solución fisioló-

gica no presentan ningún daño. Con respecto a este inconveniente sería acertado probar inyectar cantidades menores de bpv(phen).

El problema más relevante a afrontar en estudios posteriores es el efecto de bpv(phen) sobre la fosfotirosinas. Por los resultados obtenidos no queda duda que la concentración de compromiso (concentración que aumente pAkt y no pTyr) es difícil de encontrar. Si se confirma una neuroprotección de bpv(phen) a concentraciones menores, la pregunta que surge es ¿es la acción sobre pAkt o sobre alguna otra proteína? Con respecto a esto es interesante la comparación con el único trabajo que aplican bpv(phen) en un modelo de HI permanente (Li et al., 2009). Observan una disminución de pAkt a los 30 min de iniciada la HI, con una consecuente manifestación de células TUNEL+ en el cerebro. Por otro lado la aplicación de bpv(phen) de manera crónica previamente a la HI no solo revierte los niveles de pAkt a los normales sino que reduce la muerte neuronal observada posteriormente. A pesar de estos resultados, no aportan pruebas que confirmen que los niveles de pTyr no están siendo modificados, como sí lo hacen en otro estudio en pulmones *in vivo* (Lai et al., 2009).

Esta dicotomía pAkt - pTyr cobra especial importancia frente a nuestros resultados que muestran que la hipoxia *per se* produce una disminución generalizada en los niveles de fosfotirosinas, específicamente en proteínas de tamaños mayores a 50 KDa. Por otro lado varios estudios describen neuroprotección mediada por ortovanadato (Hasegawa et al., 2006; Wu et al., 2006; Feng et al., 2008), aumentando los niveles de fosforilación mediante una inhibición competitiva de las fosfatasas de tirosina. Esta acción inespecífica tiene como resultado la fosforilación indirecta de Akt (Akt se fosforila en ser/treo) posiblemente debido a la acción sobre PTEN, pero dada su gran inespecificidad es pura especulación.

En resumen, restablecer pAkt a los niveles controles luego de una hipoxia independientemente de la variación de fosfotirosinas, aportaría un indicio importante a la relación causal: disminución pAkt - MCHx.

VII. Neuroprotección

Nuestro modelo presenta condiciones ideales para probar efectos neuroprotectores: solo la variable concentración de oxígeno es modificada, el daño celular producto de la hipoxia esta profundamente caracterizado y la administración de drogas lipofílicas es relativamente sencilla.

Por esto decidimos probar la acción neuroprotectora del estradiol que si bien se ha demostrado previamente que presenta efectos neuroprotectores en eventos HI (Dubal et al., 1998; Toung et al., 1998; Jover et al., 2002), variables como dosis, vía de administración, ventana temporal y aplicación crónica o aguda se encuentran en discusión.

En ensayos preliminares observamos que la administración 20 min antes de la hipoxia generaba efectos neuroprotectores -observaciones no mostradas-. Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que en la mayoría de los modelos *in vivo* la administración es durante o previa al evento de HI (Dubal et al., 1998; Bagetta et al., 2004), decidimos administrarlo con posterioridad a la hipoxia intentando probar sus efectos neuroprotectores posteriores al evento de HI, y estudiar su mecanismo de acción en nuestro modelo.

Así, observamos que el estradiol logra neuroproteger aún cuando es administrado 30 min luego de finalizada la hipoxia, revirtiendo no solo el número de células TUNEL+ sino también la activación de caspasa-3 y la liberación de citocromo c (datos no mostrados). Estos resultados permiten inferir que los procesos disparados por la hipoxia que conducen a la MCHx pueden ser revertidos hasta como mínimo 30 min post-hipoxia.

Se han descrito tres posibles mecanismos neuroprotectores del estradiol. El primero consiste en la unión a los receptores intracelulares de estrógenos alfa y beta, los cuales dimerizan y translocan al núcleo modulando la transcripción de genes blanco (Singh et al., 1999; Wu et al., 2005; Mannella y Brinton, 2006). El segundo depende de la unión a proteínas receptoras que están asociadas a membrana y median efectos rápidos y no genómicos a través de la vía de señalización PI3K/Akt con los efectos de supervivencia ya vistos (Kousteni et al., 2001; Cimarosti et al., 2005). Por último los efectos neuroprotectores pueden resultar de mecanismos independientes de receptores, principalmente a través de sus propieda-

des antioxidantes (Behl et al., 1997). Nuestros resultados descartan la acción antioxidante como mecanismo neuroprotector abriendo el interrogante de si la acción es genómica o no genómica. Es más probable pensar que la acción ocurra a través de una vía no genómica como PI3K/Akt, debido a que el tiempo desde la administración hasta la liberación de citocromo c es como máximo de 3 hs, y en los modelos donde el estradiol actúa por vía genómica los tiempos de acción son mayores (Wu et al., 2005).

En conclusión, nuestras observaciones sobre las propiedades neuroprotectoras del estradiol generan un potencial clínico relevante, donde la droga podría actuar de forma aguda y aún más importante, con posterioridad al evento hipóxico.

CONCLUSIONES

En la presente tesis demostramos que la disminución en la concentración de oxígeno es condición suficiente para reproducir las propiedades típicas de eventos de HI como la vulnerabilidad diferencial de las estructuras del SNC y el retraso temporal en la manifestación del daño. A su vez, probamos que los daños producidos por un evento de hipoxia no están mediados ni por fenómenos excitotóxicos ni por privación de factores tróficos provenientes de las aferencias de la retina. Así, concluimos que los daños provocados por la hipoxia en el TO son producto de fenómenos exclusivamente locales.

Describimos ultraestructuralmente la evolución de la muerte celular luego de una hipoxia, encontrando una morfología apoptótica que no presenta diferencias con respecto a la muerte celular propia del desarrollo. A su vez, la caracterización bioquímica muestra que la apoptosis se ejecuta por la vía intrínseca, también común a la muerte propia del desarrollo. A partir de estas observaciones hipotetizamos que la hipoxia genera un desequilibrio transitorio, que conduce al incremento de la muerte celular propia del desarrollo.

Encontramos que la vía de supervivencia PI3k/Akt y la fosfotirosinación se encuentran reguladas negativamente durante la hipoxia, y que podrían estar implicadas en la ejecución del daño hipóxico. Con el objeto de evaluar la estimulación de esta vía desarrollamos con éxito las técnicas de inyección intravascular, intratectal y la hipoxia aguda normobárica en cultivo de pollos *ex ovo*.

Con el fin de poder distinguir las características normales de las patológicas realizamos una caracterización de la estructura normal del tectum óptico de aves en el DE 12, estudiando las morfologías nucleares presentes, su distribución en cada lámina y su densidad a lo largo de este día embrionario. Encontramos que la muerte celular propia del desarrollo esta presente fundamentalmente en las láminas ventriculares y que no se encuentra regulada por aferencias provenientes de las células ganglionares de la retina, sugiriendo que la muerte celular al DE12 se compone principalmente de células progenitoras en degeneración. Dicha muerte celular presenta una morfología apoptótica, con activación de la vía intrínseca y posiblemente también de la vía extrínseca, observación que podría ser asociada con mecanismos de ejecución tempranos en el desarrollo.

Determinamos que la diferenciación de los astrocitos en el tectum óptico mediante la marcación de la proteína ácida gliofibrilar comienza en el día embrionario catorce, con un gradiente de diferenciación ventro-dorsal y una presencia en láminas cercanas al ventrículo.

Por último, los efectos neuroprotectores del estradiol presentan un potencial clínico relevante, donde la droga podría actuar de forma aguda y aún más importante, con posterioridad al evento hipóxico.

Victorio Pozo Devoto

Dra. Sara Fiszler de Plazas

La integración de algunos diseños experimentales, resultados y análisis expuestos en este estudio han permitido publicar los siguientes trabajos:

- “Hypoxia-induced apoptotic cell death is prevented by oestradiol via oestrogen receptors in the developing central nervous system”. V M Pozo Devoto*, S Giusti*, J C Chavez and S Fiszler de Plazas. *Journal of Neuroendocrinology*, 20 (2008), 375-380.
- “Acute hypoxia and programmed cell death in developing CNS: differential vulnerability of chick optic tectum layers”. Victorio M Pozo Devoto, Juan Chavez and Sara Fiszler de Plazas. *Neuroscience*, 142 (2006), 645-653.

Bibliografía

- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85, 523-69.
- Al-Abdulla, N.A., Portera-Cailliau, C., and Martin, L.J. (1998). Occipital cortex ablation in adult rat causes retrograde neuronal death in the lateral geniculate nucleus that resembles apoptosis. *Neuroscience* 86, 191-209.
- Alles, A., Alley, K., Barrett, J.C., Buttyan, R., Columbano, A., Cope, F.O., Copelan, E.A., Duke, R.C., Farel, P.B., and Gershenson, L.E. (1991). Apoptosis: a general comment. *FA-SEB J* 5, 2127-8.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-8.
- Astrup, J., Siesjö, B.K., and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-5.
- Back, S.A., Han, B.H., Luo, N.L., Chricton, C.A., Xanthoudakis, S., Tam, J., Arvin, K.L., and Holtzman, D.M. (2002). Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 22, 455-63.
- Bagetta, G., Chiappetta, O., Amantea, D., Iannone, M., Rotiroli, D., Costa, A., Nappi, G., and 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.
- Balestrino, M. (1995). Pathophysiology of anoxic depolarization: new findings and a working hypothesis. *J Neurosci Methods* 59, 99-103.
- Banasiak, K.J., and Haddad, G.G. (1998). Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797, 295-304.
- Barsoum, I.B., Hamilton, T.K., Li, X., Cotechini, T., Miles, E.A., Siemens, D.R., and Graham, C.H. (2011). Hypoxia Induces Escape from Innate Immunity in Cancer Cells via Increased Expression of ADAM10: Role of Nitric Oxide. *Cancer research*.
- Baud, O., Daire, J.-L., Dalmaz, Y., Fontaine, R.H., Krueger, R.C., Sebag, G., Evrard, P., Gressens, P., and Verney, C. (2004). Gestational hypoxia induces white matter damage in neonatal rats: a new model of periventricular leukomalacia. *Brain Pathol* 14, 1-10.
- Beudet, A., Cuénod, M., Reubi, J.C., and Cuénod, M. (1981). Selective bidirectional transport of [3H]d-aspartate in the pigeon retino-tectal pathway. *Neuroscience* 6, 2021-34.
- Beer, R., Franz, G., Schöpf, M., Reindl, M., Zelger, B., Schmutzhard, E., Poewe, W., and Kampfl, A. (2000). Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 669-77.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., and Holsboer, F. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51, 535-41.
- Benn, S.C., and Woolf, C.J. (2004). Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 5, 686-700.
- Bertossi, M., Girolamo, F., Errede, M., Benagiano, V., Virgintino, D., and Roncali, L. (2002). Developmental changes of HT7 expression in the microvessels of the chick embryo brain. *Anat Embryol* 205, 229-33.

- Bilge, M. (1971). Electrophysiological investigations on the pigeon's optic tectum. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 56, 242-9.
- Blaschke, A.J., Staley, K., and Chun, J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122, 1165-74.
- Bodsch, W., Takahashi, K., Barbier, A., Ophoff, B.G., and Hossmann, K.A. (1985). Cerebral protein synthesis and ischemia. *Prog Brain Res* 63, 197-210.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 19, 223-9.
- Bravo, H., and Pettigrew, J.D. (1981). The distribution of neurons projecting from the retina and visual cortex to the thalamus and tectum opticum of the barn owl, *Tyto alba*, and the burrowing owl, *Speotyto cunicularia*. *J Comp Neurol* 199, 419-41.
- Brenner, C., and Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25, 4744-56.
- Broughton, B.R.S., Reutens, D.C., and Sobey, C.G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-9.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68.
- Buck, L.T., and Pamerter, M.E. (2006). Adaptive responses of vertebrate neurons to anoxia--matching supply to demand. *Respir Physiol Neurobiol* 154, 226-40.
- Bursch, W., Paffe, S., Putz, B., Barthel, G., and Schulte-Hermann, R. (1990). Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11, 847-53.
- Busl, K.M., and Greer, D.M. (2010). Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation* 26, 5-13.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-70.
- Caleo, M., Menna, E., Chierzi, S., Cenni, M.C., and Maffei, L. (2000). Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr Biol* 10, 1155-61.
- Camm, E.J., Gibbs, M.E., and Harding, R. (2001). Restriction of prenatal gas exchange impairs memory consolidation in the chick. *Brain Res Dev Brain Res* 132, 141-50.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-21.
- Catron, T., Mendiola, M.A., Smith, S.M., Born, J., and Walker, M.K. (2001). Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1alpha mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 602-7.
- Catsicas, M., Bonness, V., Becker, D., and Mobbs, P. (1998). Spontaneous Ca²⁺ transients and their transmission in the developing chick retina. *Curr Biol* 8, 283-6.
- Catsicas, M., Péquignot, Y., and Clarke, P.G. (1992). Rapid onset of neuronal death induced by blockade of either axoplasmic transport or action potentials in afferent fibers during brain development. *J Neurosci* 12, 4642-50.

- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-62.
- Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., and Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-3.
- Cheema, Z.F., Wade, S.B., Sata, M., Walsh, K., Sohrabji, F., and Miranda, R.C. (1999). Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci* 19, 1754-70.
- Cheng, Y., Gidday, J.M., Yan, Q., Shah, A.R., and Holtzman, D.M. (1997). Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 41, 521-9.
- Chu, D., Qiu, J., Grafe, M., Fabian, R., Kent, T.A., Rassin, D., Nestic, O., Werrbach-Perez, K., and Perez-Polo, R. (2002). Delayed cell death signaling in traumatized central nervous system: hypoxia. *Neurochem Res* 27, 97-106.
- Chytrova, G., and Johnson, J.E. (2004). Spontaneous retinal activity modulates BDNF trafficking in the developing chick visual system. *Mol Cell Neurosci* 25, 549-57.
- Cimarosti, H., Zamin, L.L., Frozza, R., Nassif, M., Horn, A.P., Tavares, A., Netto, C.A., and Salbego, C. (2005). Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3beta. *Neurochem Res* 30, 191-9.
- Cirulli, F., Bonsignore, L.T., Venerosi, A., Valanzano, A., Chiarotti, F., and Alleva, E. (2003). Long-term effects of acute perinatal asphyxia on rat maternal behavior. *Neurotoxicol Teratol* 25, 571-8.
- Clarke, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181, 195-213.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16.
- Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 9, 243-69.
- Colbourne, F., Sutherland, G.R., and Auer, R.N. (1999). Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci* 19, 4200-10.
- Collins, R.J., Harmon, B.V., Gobé, G.C., and Kerr, J.F. (1992). Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61, 451-3.
- Cowan, W., Adamson, L., and Powell, T. (1961). An experimental study of the avian visual system. *Journal of Anatomy*, 545-63.
- Cowan, W.M., Martin, A.H., and Wenger, E. (1968). Mitotic patterns in the optic tectum of the chick during normal development and after early removal of the optic vesicle. *J Exp Zool* 169, 71-92.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-9.
- Crossland, W.J., Cowan, W.M., and Rogers, L.A. (1975). Studies on the development of the chick optic tectum. IV. An autoradiographic study of the development of retino-tectal connections. *Brain research* 91, 1-23.

- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6, 41-51.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., and Snyder, S.H. (1993). Nitric oxide as a mediator of neurotoxicity. *NIDA Res Monogr* 136, 258-71; discussion 71-3.
- De Long, G.R., and Coulombre, A.J. (1965). Development of the retinotectal topographic projection in the chick embryo. *Exp Neurol* 13, 351-63.
- del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., and Nuñez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-9.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-7.
- Du, C., Hu, R., Csernansky, C.A., Hsu, C.Y., and Choi, D.W. (1996). Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 195-201.
- Du, K., and Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273, 32377-9.
- Dubal, D.B., Kashon, M.L., Pettigrew, L.C., Ren, J.M., Finklestein, S.P., Rau, S.W., and Wise, P.M. (1998). Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1253-8.
- Dubal, D.B., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Zhu, H., Yu, J., Cashion, A.B., Suzuki, S., Gerhold, L.M., Bottner, M.B., Dubal, S.B., *et al.* (2006). Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology* 147, 3076-84.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15, 6377-88.
- Engelage, J., and Bischof, H.-J. (1993). The Organization of the Tectofugal Pathway in Birds: A Comparative Review. In *Vision, Brain, and Behaviour in Birds*, H. Zeigler, and H.-J. Bischof, eds. (Cambridge, Massachusetts, London, England: MIT Press), pp. 137-58.
- Feng, Y., Bhatt, A.J., Fratkin, J.D., and Rhodes, P.G. (2008). Neuroprotective effects of sodium orthovanadate after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull* 76, 102-8.
- Ferriero, D.M. (2001). Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 23, 198-202.
- Ferriero, D.M., and Miller, S.P. (2010). Imaging selective vulnerability in the developing nervous system. *J Anat* 217, 429-35.
- Filogamo, G. (1950). Conseguenze della demolizione dell'abbozzo dell'occhio sullo sviluppo del lobo ottico nell'embrione di pollo. *Rivista di biologia* 42, 73-80.
- Flemming, W. (1885). Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Folikel. *Arch Anat EntwGesch*, 221-44.
- Freeman, B.A., and Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-26.

- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-49.
- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Murakami, K., Kawase, M., and Chan, P.H. (1998). Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1239-47.
- Fujita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S., and Tsuruo, T. (1998). Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 17, 1295-304.
- Galileo, D.S. (2003). Spatiotemporal gradient of oligodendrocyte differentiation in chick optic tectum requires brain integrity and cell-cell interactions. *Glia* 41, 25-37.
- Galileo, D.S., Gray, G.E., Owens, G.C., Majors, J., and Sanes, J.R. (1990). Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 458-62.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-20.
- Gao, Y., Signore, A.P., Yin, W., Cao, G., Yin, X.-M., Sun, F., Luo, Y., Graham, S.H., and Chen, J. (2005). Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 694-712.
- Garcia, J.H., Yoshida, Y., Chen, H., Li, Y., Zhang, Z.G., Lian, J., Chen, S., and Chopp, M. (1993). Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142, 623-35.
- Giussani, D.A., Salinas, C.E., Villena, M., and Blanco, C.E. (2007). The role of oxygen in prenatal growth: studies in the chick embryo. *J Physiol (Lond)* 585, 911-7.
- Glücksman, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 26, 59-86.
- Golan, H., and Huleihel, M. (2006). The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci* 9, 338-49.
- Gräper, L. (1914). Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. *Arch Zellforsch* 12, 373-94.
- Gray, G.E., Glover, J.C., Majors, J., and Sanes, J.R. (1988). Radial arrangement of clonally related cells in the chicken optic tectum: lineage analysis with a recombinant retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7356-60.
- Gray, G.E., and Sanes, J.R. (1992). Lineage of radial glia in the chicken optic tectum. *Development* 114, 271-83.
- Green, D.R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.
- Güntürkün, O. (1991). In *Neural and behavioural plasticity: the use of the domestic chick as a model*, R.J. Andrew, ed. (Oxford University Press), pp. 92-105.
- Güntürkün, O. (1993). *Functional Anatomy of the Avian Visual System*. In *Vision, Brain, and Behaviour in Birds*, H. Zeigler, and H.-J. Bischof, eds. (Cambridge, Massachusetts, London, England: MIT Press), pp. 99-101.
- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92.

- Han, B.H., and Holtzman, D.M. (2000). BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 20, 5775-81.
- Han, S.I., Kim, Y.-S., and Kim, T.-H. (2008). Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep* 41, 1-10.
- Hasegawa, Y., Morioka, M., Hasegawa, S., Matsumoto, J., Kawano, T., Kai, Y., Yano, S., Fukunaga, K., and Kuratsu, J.-I. (2006). Therapeutic time window and dose dependence of neuroprotective effects of sodium orthovanadate following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 875-81.
- Henke (1983). In *Progress in nonmammalian brain research*, G. Nisticò, and L. Bolis, eds. (CRC Press), pp. 112-58.
- Heron, M. (2011). Deaths: Leading causes for 2007. In *National vital statistics reports* (Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics).
- Herzog, K.H., and von Bartheld, C.S. (1998). Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci* 18, 2891-906.
- Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J.E., and Xia, Z. (1999). Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 274, 22569-80.
- Hochachka, P.W. (1986). Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-41.
- Hodos, W. (1993). The Visual Capabilities of Birds. In *Vision, Brain, and Behaviour in Birds*, H. Zeigler, and H.-J. Bischof, eds. (Cambridge, Massachusetts, London, England: MIT Press), pp. 63-76.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-95.
- Huber, G.C., and Crosby, E. (1933). A phylogenetic consideration of the optic tectum. *Proceedings of the National Academy of ...*
- Ikeda, Y., and Long, D.M. (1990). The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27, 1-11.
- Ishimaru, M.J., Ikonomidou, C., Tenkova, T.I., Der, T.C., Dikranian, K., Sesma, M.A., and Olney, J.W. (1999). Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 408, 461-76.
- Itasaki, N., and Nakamura, H. (1996). A role for gradient en expression in positional specification on the optic tectum. *Neuron* 16, 55-62.
- Jassik-Gerschenfeld, D., and Guichard, J. (1972). Visual receptive fields of single cells in the pigeon's optic tectum. *Brain research* 40, 303-17.
- Jover, T., Tanaka, H., Calderone, A., Oguro, K., Bennett, M.V.L., Etgen, A.M., and Zukin, R.S. (2002). Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* 22, 2115-24.
- Kamada, H., Nito, C., Endo, H., and Chan, P.H. (2007). Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 521-33.

- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999). Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9, 601-4.
- Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10, 381-91.
- Karten, H. (1979). Visual Lemniscal Pathways in Birds. In *Neural mechanisms of behavior in the pigeon*, A.M. Granda, and J.H. Maxwell, eds. (Plenum Press), pp. 409-30.
- Karten, H.J., Cox, K., and Mpodozis, J. (1997). Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the retinotectoretotundal pathway of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 387, 449-65.
- Katchman, A.N., and Hershkowitz, N. (1993). Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol* 70, 1-7.
- Kawai, K., Nitecka, L., Ruetzler, C.A., Nagashima, G., Joó, F., Mies, G., Nowak, T.S., Saito, N., Lohr, J.M., and Klatzo, I. (1992). Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 238-49.
- Kelly, J.P., and Cowan, W.M. (1972). Studies on the development of the chick optic tectum. 3. Effects of early eye removal. *Brain research* 42, 263-88.
- Kerr, J., Gobé, G., Winterford, C., and Harmon, B. (1995). Anatomical methods in cell death. In *Cell Death*, L.M. Schwartz, and B.A. Osborne, eds. (Academic Press), pp. 1-27.
- Kerr, J., and Harmon, B. (1991). Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In *Apoptosis: the molecular basis of cell death*, L.D. Tomei, and F.O. Cope, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 5-29.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F., and Chao, M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21, 893-901.
- Kitzmueller, E., Krapfenbauer, K., Hoeger, H., Weitzdoerfer, R., Lubec, G., and Lubec, B. (2004). Life-long effects of perinatal asphyxia on stress-induced proteins and dynamin 1 in rat brain. *Neurochem Res* 29, 1767-77.
- Koong, A.C., Denko, N.C., Hudson, K.M., Schindler, C., Swiersz, L., Koch, C., Evans, S., Ibrahim, H., Le, Q.T., Terris, D.J., et al. (2000). Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer research* 60, 883-7.
- Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer research* 59, 1693s-700s.
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., et al. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719-30.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.

- Kubota, Y., and Suda, T. (2009). Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 19, 38-43.
- Kuida, K. (2000). Caspase-9. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 121-4.
- Kurinczuk, J.J., White-Koning, M., and Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 86, 329-38.
- Lai, J.-P., Bao, S., Davis, I.C., and Knoell, D.L. (2009). Inhibition of the phosphatase PTEN protects mice against oleic acid-induced acute lung injury. *British Journal of Pharmacology* 156, 189-200.
- Lai, J.-P., Dalton, J.T., and Knoell, D.L. (2007). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair. *Br J Pharmacol* 152, 1172-84.
- Laiho, K.U., Shelburne, J.D., and Trump, B.F. (1971). Observations on cell volume, ultrastructure, mitochondrial conformation and vital-dye uptake in Ehrlich ascites tumor cells. Effects of inhibiting energy production and function of the plasma membrane. *Am J Pathol* 65, 203-30.
- LaVail, J.H., and Cowan, W. (1971). The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain research*.
- Lee, J.-Y., Kim, Y.-J., Kim, T.-Y., Koh, J.-Y., and Kim, Y.-H. (2008). Essential role for zinc-triggered p75NTR activation in preconditioning neuroprotection. *J Neurosci* 28, 10919-27.
- Lee, K.S., Frank, S., Vanderklish, P., Arai, A., and Lynch, G. (1991). Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7233-7.
- Leist, M., and Jäätelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-98.
- Lennon, S.V., Martin, S.J., and Cotter, T.G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24, 203-14.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J* 6, 1145-54.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-77.
- Li, D., Qu, Y., Mao, M., Zhang, X., Li, J., Ferriero, D., and Mu, D. (2009). Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1903-13.
- Li, Y., Chopp, M., Jiang, N., Yao, F., and Zaloga, C. (1995a). Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 15, 389-97.
- Li, Y., Chopp, M., Jiang, N., Zhang, Z.G., and Zaloga, C. (1995b). Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26, 1252-7; discussion 57-8.
- Linser, P.J. (1985). Multiple marker analysis in the avian optic tectum reveals three classes of neuroglia and carbonic anhydrase-containing neurons. *J Neurosci* 5, 2388-96.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431-568.
- Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330, 613-22.

- Liu, C.L., Siesjö, B.K., and Hu, B.R. (2004). Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience* 127, 113-23.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-84.
- Lossi, L., and Merighi, A. (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 69, 287-312.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
- Luksch, H., Cox, K., and Karten, H.J. (1998). Bottlebrush dendritic endings and large dendritic fields: motion-detecting neurons in the tectofugal pathway. *J Comp Neurol* 396, 399-414.
- Luo, H.R., Hattori, H., Hossain, M.A., Hester, L., Huang, Y., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Nagata, E., and Snyder, S.H. (2003). Akt as a mediator of cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11712-7.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-90.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Mannella, P., and Brinton, R.D. (2006). Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action. *J Neurosci* 26, 9439-47.
- Markus, R., Reutens, D.C., Kazui, S., Read, S., Wright, P., Pearce, D.C., Tochon-Danguy, H.J., Sachinidis, J.I., and Donnan, G.A. (2004). Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. *Brain* 127, 1427-36.
- Marti, H.H., and Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15809-14.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., and 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-Villalba, A., Herr, I., Jeremias, I., Hahne, M., Brandt, R., Vogel, J., Schenkel, J., Herdegen, T., and Debatin, K.M. (1999). CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19, 3809-17.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prévost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., et al. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-31.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11598-603.

- McDonald, J.W., Silverstein, F.S., and Johnston, M.V. (1988). Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res* 459, 200-3.
- McGraw, C.F., and McLaughlin, B.J. (1980). Fine structural studies of synaptogenesis in the superficial layers of the chick optic tectum. *J Neurocytol* 9, 79-93.
- McLoon, S.C. (1985). Evidence for shifting connections during development of the chick retinotectal projection. *J Neurosci* 5, 2570-80.
- McQuillen, P.S., Sheldon, R.A., Shatz, C.J., and Ferriero, D.M. (2003). Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 23, 3308-15.
- Ment, L.R., Schwartz, M., Makuch, R.W., and Stewart, W.B. (1998). Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 111, 197-203.
- Mergenthaler, P., Dirnagl, U., and Meisel, A. (2004). Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19, 151-67.
- Mey, J., and Thanos, S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 32, 343-79.
- Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2001). Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58, 1045-53.
- Millward, T.A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B.A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 24, 186-91.
- Miyakawa, N., Sato, K., and Momose-Sato, Y. (2004). Optical detection of neural function in the chick visual pathway in the early stages of embryogenesis. *Eur J Neurosci* 20, 1133-49.
- Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Yoshimoto, T., and Chan, P.H. (2001). Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke. *Stroke* 32, 2356-61.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65.
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M.S., Gabrielson, K.L., Wilson, M.A., Martin, L.J., Blue, M.E., and Johnston, M.V. (2000). Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 20, 7994-8004.
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18, 3659-68.
- Newmeyer, D.D., Farschon, D.M., and Reed, J.C. (1994). Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79, 353-64.
- Nico, B., Roncali, L., and Ribatti, D. (1985). [Use of horseradish peroxidase as a marker in studies of the formation of the blood-brain barrier (optic tectum of the normal and experimentally-treated chick embryo)]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 61, 73-8.
- Nilsson, G.E. (2001). Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci* 16, 217-21.
- Niquet, J., Baldwin, R.A., Allen, S.G., Fujikawa, D.G., and Wasterlain, C.G. (2003). Hypoxic neuronal necrosis: protein synthesis-independent activation of a cell death program. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2825-30.

- Northington, F.J., Chavez-Valdez, R., and Martin, L.J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 69, 743-58.
- Northington, F.J., Ferriero, D.M., Flock, D.L., and 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., and 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.
- Northington, F.J., Ferriero, D.M., and Martin, L.J. (2001c). Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxia-ischemia is programmed cell death. *Dev Neurosci* 23, 186-91.
- Northington, F.J., Graham, E.M., and Martin, L.J. (2005). Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res Brain Res Rev* 50, 244-57.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75^{NTR}--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15, 49-57.
- Olney, J.W. (1993). Role of excitotoxins in developmental neuropathology. *APMIS Suppl* 40, 103-12.
- Oppenheim, R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14, 453-501.
- Ouyang, Y.B., Tan, Y., Comb, M., Liu, C.L., Martone, M.E., Siesjö, B.K., and Hu, B.R. (1999). Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like proteases. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1126-35.
- Pan, J., Zhang, Q.-G., and Zhang, G.-Y. (2005). The neuroprotective effects of K252a through inhibiting MLK3/MKK7/JNK3 signaling pathway on ischemic brain injury in rat hippocampal CA1 region. *Neuroscience* 131, 147-59.
- Park, C., Sakamaki, K., Tachibana, O., Yamashima, T., Yamashita, J., and Yonehara, S. (1998). Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 623-8.
- Pentón-Rol, G., Marín-Prida, J., Pardo-Andreu, G., Martínez-Sánchez, G., Acosta-Medina, E.F., Valdivia-Acosta, A., Lagumersindez-Denis, N., Rodríguez-Jiménez, E., Llopiz-Arzua-ga, A., López-Saura, P.A., et al. (2011). C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res Bull* 86, 42-52.
- Petito, C.K., Feldmann, E., Pulsinelli, W.A., and Plum, F. (1987). Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37, 1281-6.
- Piantadosi, C.A., and Zhang, J. (1996). Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke* 27, 327-31; discussion 32.
- Portera-Cailliau, C., Price, D.L., and Martin, L.J. (1997a). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 378, 70-87.
- Portera-Cailliau, C., Price, D.L., and Martin, L.J. (1997b). Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378, 88-104.

- Pozo Devoto, V.M., Giusti, S., Chavez, J.C., and de Plazas, S.F. (2008). Hypoxia-induced apoptotic cell death is prevented by oestradiol via oestrogen receptors in the developing central nervous system. *J Neuroendocrinol* 20, 375-80.
- Puelles, L., and Bendala, M.C. (1978). Differentiation of neuroblasts in the chick optic tectum up to eight days of incubation: a Golgi study. *Neuroscience* 3, 307-25.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., and Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11, 491-8.
- Putcha, G.V., and Johnson, E.M. (2004). Men are but worms: neuronal cell death in *C. elegans* and vertebrates. *Cell Death Differ* 11, 38-48.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-6.
- Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22, 614-8.
- Ramón y Cajal, S. (1889). Estructura del lóbulo óptico de las aves y origen de los nervios ópticos. *Revista Trimestral de Histología Normal y Patología* 1, 65-80.
- Rees, S., Mallard, C., Breen, S., Stringer, M., Cock, M., and Harding, R. (1998). Fetal brain injury following prolonged hypoxemia and placental insufficiency: a review. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 119, 653-60.
- Rehn, A.E., Van Den Buuse, M., Copolov, D., Briscoe, T., Lambert, G., and Rees, S. (2004). An animal model of chronic placental insufficiency: relevance to neurodevelopmental disorders including schizophrenia. *Neuroscience* 129, 381-91.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 361, 1545-64.
- Rodgers, E.E., and Theibert, A.B. (2002). Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int J Dev Neurosci* 20, 187-97.
- Rodricks, C.L., Gibbs, M.E., Castillo-Melendez, M., and Miller, S.L. (2010). The effect of hypoxia on the functional and structural development of the chick brain. *Int J Dev Neurosci* 28, 343-50.
- Rodríguez Gil, D.J., Viapiano, M.S., and 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.
- Rogers, L.J. (1995). The development of brain and behaviour in the chicken.
- Roncali, L., Nico, B., Ribatti, D., Bertossi, M., and Mancini, L. (1986). Microscopical and ultrastructural investigations on the development of the blood-brain barrier in the chick embryonic optic tectum. *Acta Neuropathol* 70, 193-201.
- Roohey, T., Raju, T.N., and Moustogiannis, A.N. (1997). Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev* 47, 115-46.
- Rosenbaum, D.M., Gupta, G., D'Amore, J., Singh, M., Weidenheim, K., Zhang, H., and Kessler, J.A. (2000). Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 61, 686-92.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-37.

- Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Sawitzki, B., Priller, J., Dirnagl, U., and 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.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274, 22532-8.
- Schmid, A.C., Byrne, R.D., Vilar, R., and Woscholski, R. (2004). Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS Lett* 566, 35-8.
- Schuster, S.J., Badiavas, E.V., Costa-Giomi, P., Weinmann, R., Erslev, A.J., and Caro, J. (1989). Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood* 73, 13-6.
- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E., and Osborne, B.A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 980-4.
- Schwartz, M.L., Vaccarino, F., Chacon, M., Yan, W.L., Ment, L.R., and Stewart, W.B. (2004). Chronic neonatal hypoxia leads to long term decreases in the volume and cell number of the rat cerebral cortex. *Semin Perinatol* 28, 379-88.
- Schweichel, J.U., and Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-66.
- Schweitzer, B., Taylor, V., Welcher, A.A., McClelland, M., and Suter, U. (1998). Neural membrane protein 35 (NMP35): a novel member of a gene family which is highly expressed in the adult nervous system. *Mol Cell Neurosci* 11, 260-73.
- Scicolone, G., Pereyra-Alfonso, S., Brusco, A., Pecci Saavedra, J., and Flores, V. (1995). Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *Int J Dev Neurosci* 13, 845-58.
- Semenza, G.L., and 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.
- Seo, J.H., Chang, J.H., Song, S.H., Lee, H.N., Jeon, G.S., Kim, D.W., Chung, C.K., and Cho, S.S. (2008). Spatiotemporal gradient of astrocyte development in the chick optic tectum: evidence for multiple origins and migratory paths of astrocytes. *Neurochem Res* 33, 1346-55.
- Shibata, M., Hattori, H., Sasaki, T., Gotoh, J., Hamada, J., and Fukuuchi, Y. (2002). Temporal profiles of the subcellular localization of Bim, a BH3-only protein, during middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 810-20.
- Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 577-82.
- Shimizu, T., and Karten, H.J. (1993). The Avian Visual System and the Evolution of the Neocortex. In *Vision, Brain, and Behaviour in Birds*, H. Zeigler, and H.-J. Bischof, eds. (Cambridge, Massachusetts, London, England: MIT Press), pp. 103-14.
- Shin, D.H., Lee, E., Kim, H.J., Kim, S., Cho, S.S., Chang, K.Y., and Lee, W.J. (2002). Fas ligand mRNA expression in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol* 123, 50-7.
- Shioda, S., Ozawa, H., Dohi, K., Mizushima, H., Matsumoto, K., Nakajo, S., Takaki, A., Zhou, C.J., Nakai, Y., and Arimura, A. (1998). PACAP protects hippocampal neurons

- against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 865, 111-7.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-5.
- Siesjö, B.K., Bengtsson, F., Grampp, W., and Theander, S. (1989). Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 568, 234-51.
- Simpson, L., and Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264, 29-41.
- Singh, M., Sétáló, G., Guan, X., Warren, M., and Toran-Allerand, C.D. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19, 1179-88.
- Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-6.
- Stern, C.D. (2004). The chick embryo--past, present and future as a model system in developmental biology. *Mech Dev* 121, 1011-3.
- Stieda, L. (1869). Studien über das zentrale Nervensystem der Vögel und Säugetiere. *Z wiss Zool*, 1-94.
- Storey, K.B., and Hochachka, P.W. (1974). Enzymes of energy metabolism in a vertebrate facultative anaerobe, *Pseudemys scripta*. Turtle heart pyruvate kinase. *J Biol Chem* 249, 1423-7.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-45.
- Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G.W., Saito, A., Hayashi, T., Narasimhan, P., Maier, C.M., and Chan, P.H. (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 1, 17-25.
- Szabó, C. (1996). DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 21, 855-69.
- Tazawa, H. (1980). Adverse effect of failure to turn the avian egg on the embryo oxygen exchange. *Respir Physiol* 41, 137-42.
- Thanos, S., and Bonhoeffer, F. (1987). Axonal arborization in the developing chick retinotectal system. *J Comp Neurol* 261, 155-64.
- Toung, T.J., Traystman, R.J., and Hurn, P.D. (1998). Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke* 29, 1666-70.
- Trump, B.F., Goldblatt, P.J., and Stowell, R.E. (1965). STUDIES ON NECROSIS OF MOUSE LIVER IN VITRO. ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS IN THE MITOCHONDRIA OF HEPATIC PARENCHYMAL CELLS. *Lab Invest* 14, 343-71.
- Vacotto, M., Paz, D., and 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.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 700-14.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-76.

- Vexler, Z.S., and Ferriero, D.M. (2001). Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 6, 99-108.
- Viscoli, C.M., Brass, L.M., Kernan, W.N., Sarrel, P.M., Suissa, S., and Horwitz, R.I. (2001). A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N Engl J Med* 345, 1243-9.
- von Bartheld, C.S., Byers, M.R., Williams, R., and Bothwell, M. (1996). Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379, 830-3.
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-6.
- Wakai, S., and Hirokawa, N. (1978). Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. *Cell Tissue Res* 195, 195-203.
- Walton, M., Connor, B., Lawlor, P., Young, D., Sirimanne, E., Gluckman, P., Cole, G., and Dragunow, M. (1999). Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 137-68.
- Wang, F., Luo, Y., Ling, F., Wu, H., Chen, J., Yan, F., He, Z., Goel, G., Ji, X., and Ding, Y. (2010). Comparison of neuroprotective effects in ischemic rats with different hypothermia procedures. *Neurol Res* 32, 378-83.
- Wang, Y., Chang, C.F., Morales, M., Chou, J., Chen, H.L., Chiang, Y.H., Lin, S.Z., Cadet, J.L., Deng, X., Wang, J.Y., *et al.* (2001). Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats. *Stroke* 32, 2170-8.
- Warburton, S.J., Hastings, D., and Wang, T. (1995). Responses to chronic hypoxia in embryonic alligators. *J Exp Zool* 273, 44-50.
- Wei, L., Ying, D.-J., Cui, L., Langsdorf, J., and Yu, S.P. (2004). Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res* 1022, 54-61.
- Wong, W.T., Sanes, J.R., and Wong, R.O. (1998). Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina. *J Neurosci* 18, 8839-52.
- Wu, D.-N., Pei, D.-S., Wang, Q., and Zhang, G.-Y. (2006). Down-regulation of PTEN by sodium orthovanadate inhibits ASK1 activation via PI3-K/Akt during cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 404, 98-102.
- Wu, T.-W., Wang, J.M., Chen, S., and Brinton, R.D. (2005). 17Beta-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135, 59-72.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Yager, J.Y., and Thornhill, J.A. (1997). The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 167-74.
- Yamagata, M., and Sanes, J.R. (1995). Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic tectum. *Development* 121, 189-200.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., and Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9, 680-4.

- Yin, X.-M., Luo, Y., Cao, G., Bai, L., Pei, W., Kuharsky, D.K., and Chen, J. (2002). Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J Biol Chem* 277, 42074-81.
- Young, C., Tenkova, T., Dikranian, K., and Olney, J.W. (2004). Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia. *Curr Mol Med* 4, 77-85.
- Zhang, H., and Semenza, G.L. (2008). The expanding universe of hypoxia. *J Mol Med* 86, 739-46.
- Zhang, Z., and Galileo, D.S. (1998). Widespread programmed cell death in early developing chick optic tectum. *Neuroreport* 9, 2797-801.
- Zhao, M. (2007). PTEN: a promising pharmacological target to enhance epithelial wound healing. *Br J Pharmacol* 152, 1141-4.
- Zhu, C., Wang, X., Hagberg, H., and Blomgren, K. (2000). Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem* 75, 819-29.
- Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 20, 1-15.
- Zoratti, M., and Szabò, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-76.