

Tesis Doctoral

Neurotrofinas y neuroprotección en el SNC en desarrollo: rol del NGF y sus receptores tras un evento de hipoxia perinatal

Bogetti, María Eugenia

2015-04-09

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:

Bogetti, María Eugenia. (2015-04-09). Neurotrofinas y neuroprotección en el SNC en desarrollo: rol del NGF y sus receptores tras un evento de hipoxia perinatal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bogetti, María Eugenia. "Neurotrofinas y neuroprotección en el SNC en desarrollo: rol del NGF y sus receptores tras un evento de hipoxia perinatal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-09.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Neurotrofinas y neuroprotección en el SNC en desarrollo: rol del NGF y sus receptores tras un evento de hipoxia perinatal

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

María Eugenia Bogetti

Director de Tesis: Dra. Sara Fiszer de Plazas

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

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

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 09 de abril de 2015

Neurotrofinas y Neuroprotección en el SNC en Desarrollo: rol del NGF y sus Receptores tras un evento de hipoxia perinatal

Resumen

Los eventos hipóxicos que ocurren sobre el SNC en desarrollo, poseen consecuencias nocivas dada la alta vulnerabilidad del tejido nervioso a la falta de oxígeno.

El presente trabajo estudia los efectos sobre el Tectum óptico en desarrollo de un evento hipóxico agudo normobárico sobre embriones de aves. Encontramos que la disminución de oxígeno en tales condiciones produce una discreta pero significativa muerte neuronal de fenotipo mayoritariamente apoptótico. Mediante la inmunomarcación observamos que existe un aumento en la expresión de NGF como estrategia de rescate celular frente a la injuria, mientras que ésta produce paralelamente una disminución en la activación del receptor TrkA. Este fenómeno es correlacionado con la muerte apoptótica observada a las 6 horas de reoxigenación.

Observamos además un efecto neuroprotector por parte del NGF sobre las neuronas sometidas a hipoxia, efecto que se ve abolido en presencia de un inhibidor de la activación del receptor TrkA.

Concluimos que el efecto neuroprotector ejercido por el NGF ante un evento de injuria hipóxica, posee al receptor TrkA como una molécula iniciadora clave y consideramos el momento de finalización de la hipoxia, como un período de susceptibilidad y regulación en el que el balance y estado de receptores, serían críticos en el destino de las células que sufren daño por hipoxia.

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

Neurotrophins and Neuroprotection in development CNS: NGF role and its receptors after perinatal hypoxic event.

Abstract

Hypoxic insults during CNS development have deleterious outcomes due to high vulnerability of nervous tissue to low oxygen concentration.

In the present thesis, we analyze the effects of a normobaric acute hypoxic event in the chick Optic Tectum embryo. We find that the low oxygen produces a discrete but significative neuronal death whose fenotype is mainly apoptotic. By immunohistochemistry technique, we determine that there is a significative increase in the NGF expression as a neuronal rescue strategy. In addition, the hypoxic injury produces a decrease in the TrkA receptor activation. This fact is correlated with the apoptotic neuronal death observated 6 hours after reoxygenation.

Additionally, we determine a NGF neuroprotector effect over neurons subject to hypoxic conditions. This condition is suppressed in presence of a TrkA activation inhibitor.

We conclude that the NGF neuroprotector effect in presence of a hypoxic insult has the TrkA receptor, like an essential and initial molecule and we consider the hypoxia end like a susceptibility and regulation period. In this time, the receptors balance and state would be critic in the damaged neurons destiny in a hypoxic acute insult.

Key words: hypoxia, apoptosis, development, CNS, optic tectum,NGF, neuroprotection.

Agradecimientos

A la Dra Fiszer, por darme la oportunidad de trabajar en su Laboratorio, por brindarme libertad en mi trabajo y ayudarme a confiar en mis resultados y conocimientos.

Al Dr Dante Paz, por haberme recibido en su Laboratorio, por haberme enseñado mis primeros pasos en la investigación, por su generosidad, su ayuda permanente y su cariño.

A Victorio, por su imprescindible e invaluable ayuda. Por su paciencia, sus explicaciones, su mirada crítica y sus dibujos desordenados. Por nuestras charlas de ciencia y de la vida. Por ayudarme a confiar en mí y entender mi complicada forma de pensar. Gracias Vic.

A Seba, por su dulzura, su eterna paciencia, sus consejos y su abrazo contenedor. Por nuestras charlas y por todo lo que me enseñaste, más allá de la ciencia.

A Anto, por su amistad, su oreja permanente, su complicidad y por nuestras interminables conversaciones. Por mis retos y nuestras tentadas.

A Marina, por su calidez, su amor permanente, su humor, y por ser un ejemplo de lucha ante la adversidad. Por levantarte, siempre.

A las “chicas de Alicia”, por hacer del trabajo de Laboratorio algo muy divertido y compartido: A Pau, por su humor, su mirada positiva, su contención y sensibilidad. A Lau, por su permanente solidaridad y cariño. A Trini, por su oreja, su ayuda y compañía.

A Tam, por su contención, por tener siempre una palabra de aliento y enseñarme a creer no sólo en lo que puede verse.

A Mery, por su dulzura y compañía más allá del Lab.

A la Dra Brusco por su solidaridad en momentos difíciles.

A mi papá, por haberme hecho descubrir, sin haberse dado cuenta, el maravilloso mundo de la biología.

A mi mamá, por su apoyo incondicional en cada una de mis elecciones y altibajos profesionales.

A mi hermana, por su aliento y apoyo.

A Marcelo, mi amor y compañero. Por sus largos ratos ayudándome a contar neuronas.

A Juanma, mi mayor tesoro, mi pequeño investigador, por iluminar cada uno de mis días. Por enseñarme lo más importante de la vida.

Indice

Abreviaturas	10
INTRODUCCION	12
I. Hipoxia-Isquemia	13
I.1. Hipoxia-Isquemia en humanos	13
I.2. Modelos experimentales	14
I.3. Eventos puramente hipóxicos	16
II. Muerte Celular	16
II.1. Tipos	16
II.2. Apoptosis y Necrosis en el SNC inducidas por Hipoxia-Isquemia	19
II.3. Muerte Celular Programada	20
III. Neurotrofinas	21
III.1. Generalidades	21
III.2. Las Pre-pro neurotrofinas	24
III.3. NGF	25
III.4. Receptores de Neurotrofinas	27
III.5. El NGF en nuestro modelo	32
IV. Neuroprotección y Neurotrofinas	33
V. El Tectum óptico en las Aves	35
V.1. Estructura y función	36

V.2. Desarrollo	37
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
I. Animales	42
II. Tratamiento hipóxico	42
III. Preparación de tejidos	43
IV. Tinción con Hoechst	43
V. Inmunomarcación	43
V.1. Inmunofluorescencia	43
V.2. Inmunohistoquímica	44
VI. Técnica de TUNEL	44
VII. Western Blot	45
VII.1. Obtención de fracción total	45
VII.2. Electroforesis y Electrotransferencia	45
VII.3. Blotting y Revelado	46
VIII. Cultivo Neuronal Primario	46
IX. Tratamiento hipóxico en cultivo	47
X. Cuantificación celular	48
XI. Análisis estadístico	48
XII. Programas	48
XIII. Anticuerpos e Insumos	49

RESULTADOS	51
I. Determinación de la Segunda ola de MCP en el Tectum óptico en Desarrollo	52
II. Determinación de la susceptibilidad de éste período del desarrollo a la injuria hipóxica	52
III. Expresión de caspasa-3 activa luego del tratamiento hipóxico	54
IV. Expresión y modulación de NGF, P-TrkA y p75 en respuesta a una hipoxia	55
V. Modulación de Akt en la muerte celular por hipoxia	58
VI. Puesta a punto de la técnica de cultivo neuronal primario. Seguimiento y caracterización de viabilidad celular	60
VII. Determinación del requerimiento de NGF endógeno para la supervivencia neuronal en cultivo	62
VIII. Puesta a punto de la técnica de Hipoxia en cultivo. Evaluación de la vulnerabilidad neuronal frente al daño hipóxico <i>in vitro</i>	63
IX. Rol neuroprotector del NGF	64
X. Actividad del Receptor de NGF TrkA en respuesta a la injuria por hipoxia y a un evento de neuroprotección	66
XI. Inhibición de la activación del Receptor TrkA frente al daño hipóxico en cultivo	69
DISCUSIÓN	71
I. MCP del desarrollo en el TO	72
II. Muerte celular hipóxica en el TO en desarrollo	72
III. NGF y viabilidad neuronal	73
IV. NGF y sus receptores tras un evento hipóxico	74
V. Rol de Akt en la MCHx	77

VI. NGF como molécula neuroprotectora del daño hipóxico	78
CONCLUSIONES	80
BIBLIOGRAFIA	83

Abreviaturas

AA: aminoácido

ACV: accidente cerebro vascular

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

ATP: nucleotide de adenosine trifosfato

BAD: Bcl-2 associated death promoter/ protein bcl-2 asociada a promoter de muerte

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

DAB: 3' 3'- diaminobenzidina

DE: día embrionario

ERK: extracellular signal-regulated kinase/ kinasa reguladora de señales extracelulares

Grb2: proteína adaptadora de unión al receptor del factor de crecimiento

HI: hipoxia-isquemia

LO: lóbulo óptico

MAPK: mitogen activated protein kinase/ protein kinasa activada por mitógenos

MCHx: muerte celular por hipoxia

MCP: muerte celular programada

NFkB: nuclear factor kappa B/ factor nuclear kappa B

NTF: neurotrofina

NT-3: neurotrofina 3

NT-4: neurotrofina 4

NGF: nerve growth factor/ factor de crecimiento nervioso

PI3k: phosphatidyl inositol 3-kinase/kinasa fosfatidil inositol 3

PIP2: fosfatidil inositol di-fosfato

PKC: proteína kinasa C

Shc: SH2 domain-containing protein/proteína conteniendo dominio SH2

SN: sistema nervioso

SNC: sistema nervioso central

SOS: factor intercambiador de nucleótidos de guanina

TO: tectum óptico

TrkA/B/C: tyrosine kinase receptor A/B/C/ receptor de tirosinas kinasas A/B/C

INTRODUCCIÓN

I. Hipoxia-Isquemia

I.1. Hipoxia-Isquemia en humanos

La Hipoxia (Hx) es una condición en la cual un organismo o tejido en particular presenta una menor disponibilidad de oxígeno (O_2), lo que puede deberse a asfixia, anemia, envenenamiento (con CO por ejemplo), o disminución de la presión parcial de oxígeno. Se diferencia de la isquemia ya que en esta última, además de los niveles críticos de O_2 , también se encuentran comprometidos los de nutrientes y los de CO_2 , debido a que se produce una disminución del flujo sanguíneo (total o parcial) en un tejido dado (Klabunde, 2011).

Los fenómenos de Hipoxia-Isquemia (HI) que afectan al sistema nervioso, presentan demográficamente tasas de mortalidad y morbilidad elevadas, tanto en adultos como en niños.

Los daños provocados por una HI en regiones específicas del cerebro inmaduro, en especial durante los períodos pre y perinatal, tienen un profundo impacto en la maduración cerebral subsiguiente ya que se producen en etapas críticas de diferenciación celular y tisular. Por esta razón, el daño producido por una HI en neonatos, es uno de los principales factores de riesgo para varios desórdenes neurológicos graves en humanos, tales como discapacidades motoras y de aprendizaje, parálisis cerebral, epilepsia, convulsiones e incluso la muerte (Johnston, 1997; Northington et al., 2001a).

Los altos requerimientos energéticos en comparación con las bajas reservas energéticas, hace al cerebro particularmente vulnerable a condiciones hipóxicas. Dentro del tejido nervioso, las neuronas son el tipo celular más sensible a la falta de O_2 , de ahí que una disminución en su aporte durante el desarrollo del cerebro, conduzca a daño cerebral mediado por la actividad de agentes citotóxicos y vías de muerte celular que culminan con la muerte neuronal (Barks & Silverstein, 1992; Martin et al., 1997; Johnston 2001).

La muerte celular luego de una HI se caracteriza por un retraso temporal entre el momento de la injuria y la manifestación del daño celular (Balduini et al., 2004). Esta ventana temporal es muy variable y depende de la intensidad de la injuria y la zona afectada. El daño puede manifestarse luego de algunos días o incluso semanas, mientras que en algunos casos, ocurre al cabo de unas pocas horas.

Se considera que mientras el resto de los factores se mantenga constante, cuanto mayor sea la carencia energética, menor será el tiempo en el que el daño vaya a manifestarse (Lipton, 1999). Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen al daño y la muerte neuronal luego de una HI no están completamente elucidados (La Manna, 2007; Taoufik & Probert, 2008).

I.2. Modelos experimentales

Existen varios modelos experimentales usados para estudiar los fenómenos de HI. Podrían ser clasificados en aquellos que buscan emular patologías humanas (por ejemplo ACV, encefalopatía neonatal), y los que analizan exclusivamente distintas respuestas a nivel molecular, celular o tisular a una disminución en la concentración de O₂.

El primer grupo cuenta con la ventaja de reproducir en forma más fidedigna las patologías humanas, pero adolece de múltiples variables que dificultan la comprensión de los mecanismos subyacentes. Lo inverso ocurre en el segundo grupo.

El primer grupo cuenta en su mayoría con modelos *in vivo* y en roedores (ratas, ratones, jerbos, hámsters) en los cuales se ocluye uno o más vasos, de forma transitoria o permanente, dando lugar a modelos de isquemia global, isquemia focal e HI (Lipton, 1999; Vexler y Ferreiro, 2001).

En el segundo grupo los modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, abarcan varias zonas de interés, entre ellas: angiogénesis (Marti y Risau, 1998; Kubota y Suda, 2009), muerte celular (Banasiak y Haddad, 1998; Niquet et al., 2003), e incluídas en todas ellas,

respuestas de vías metabólicas (Hochachka, 1986; Brahim-Horn et al., 2007) y moleculares (Schuster et al., 1989; Semenza y Wang, 1992; Shweiki et al., 1992). La mayoría de los modelos utiliza mamíferos, pero se pueden encontrar estudios en caimanes (Warburton et al., 1995) y tortugas acuáticas resistentes a la anoxia (Storey y Hochachka, 1974) y peces del género *Carassius* (Nilsson, 2001).

Nuestro modelo de hipoxia aguda en embriones de pollo, posee una ventaja sobre los más utilizados (los mamíferos), debido a la independencia que se logra sobre variables maternas que pueden llegar a ser difíciles o imposibles de controlar. A su vez, la manipulación y el acceso al embrión son relativamente sencillos. A esto se le suma el hecho de que el pollo ha sido exhaustivamente estudiado y utilizado como modelo de desarrollo (Hamburger y Hamilton, 1951; Levi-Montalcini, 1987; Stern, 2004).

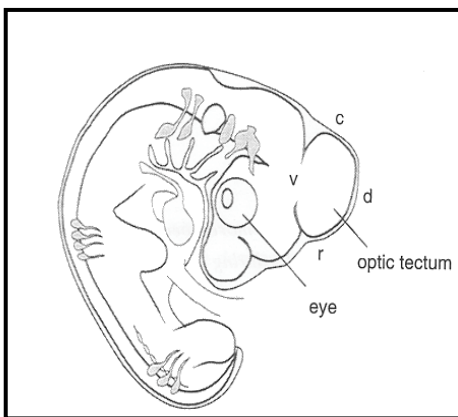


Fig.1- Representación del tectum óptico en un embrión de pollo en DE 4.5. c- caudal; d- dorsal; r- rostral; v- ventral.

Existen varios modelos de hipoxia en embriones de aves, desde hipoxias hipobáricas (Giussani et al., 2007) a normobáricas, sellando porciones variables de la cáscara con papel 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 se encuentra el modelo utilizado en nuestro laboratorio, el cual representa una hipoxia aguda global normobárica, en la cual se modifica únicamente la concentración de O₂ ambiental, mientras que la presión, temperatura y humedad, se mantienen constantes.

El libre intercambio gaseoso es asegurado por el flujo continuo del aire dentro de la cámara.

I.3. Eventos puramente hipóxicos

Varios estudios de hipoxia perinatal en ratas muestran que los efectos de eventos puramente hipóxicos 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 disminuído (Rehn et al., 2004).

II. Muerte celular

II.1. Tipos

Existen varios criterios de clasificación para la muerte celular, que tienen en cuenta, entre otras cosas, la morfología, regulación, participación de vías moleculares específicas, si se produce en condiciones fisiológicas o patológicas, etc. De manera muy general, las formas de muerte celular pueden clasificarse en apoptótica, cuando es regulada, programada y fisiológica, y necrótica cuando es accidental, no programada o patológica.

La apoptosis se caracteriza por un fenotipo celular distintivo: la cromatina se condensa en masas densas con bordes bien definidos; el citoplasma se condensa, tornando oscura a la célula y disminuyendo su tamaño, mientras que la membrana plasmática, se mantiene intacta. Durante el curso de estos eventos, las mitocondrias no sufren cambios (Kerr y Harmon, 1991) y son requeridas para la apoptosis. Luego, la membrana nuclear y la plasmática, presentan convulsiones y la célula sufre un proceso

denominado “budding”: 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 núcleos, rodeados de citoplasma, en general con organelas. Estos cuerpos luego son fagocitados por células cercanas o fagocitos.

Este tipo de muerte es regulada, ya que depende de caspasas o factores liberados por las mitocondrias. Es además dependiente de ATP y puede ocurrir por medio de dos vías moleculares independientes, denominadas “vía extrínseca” (sin intervención de la mitocondria) y “vía intrínseca” (con intervención mitocondrial). En ambas vías los principales reguladores de la apoptosis lo constituyen las caspasas, una familia de cisteín-aspartato proteasas, cuya activación se produce por diversos estímulos tanto intra como extracelulares (Kurokawa et al., 2009) (Fig.2).

Bajo determinados estímulos apoptóticos, las células activan caspasas iniciadoras (por ejemplo caspasa 8 y 9) que a su vez clivan y activan a las llamadas caspasas efectoras (por ejemplo caspasa-3). Una vez activas, éstas últimas clavan proteolíticamente un amplio grupo de sustratos, conduciendo al desmantelamiento celular (Fischer et al., 2003).

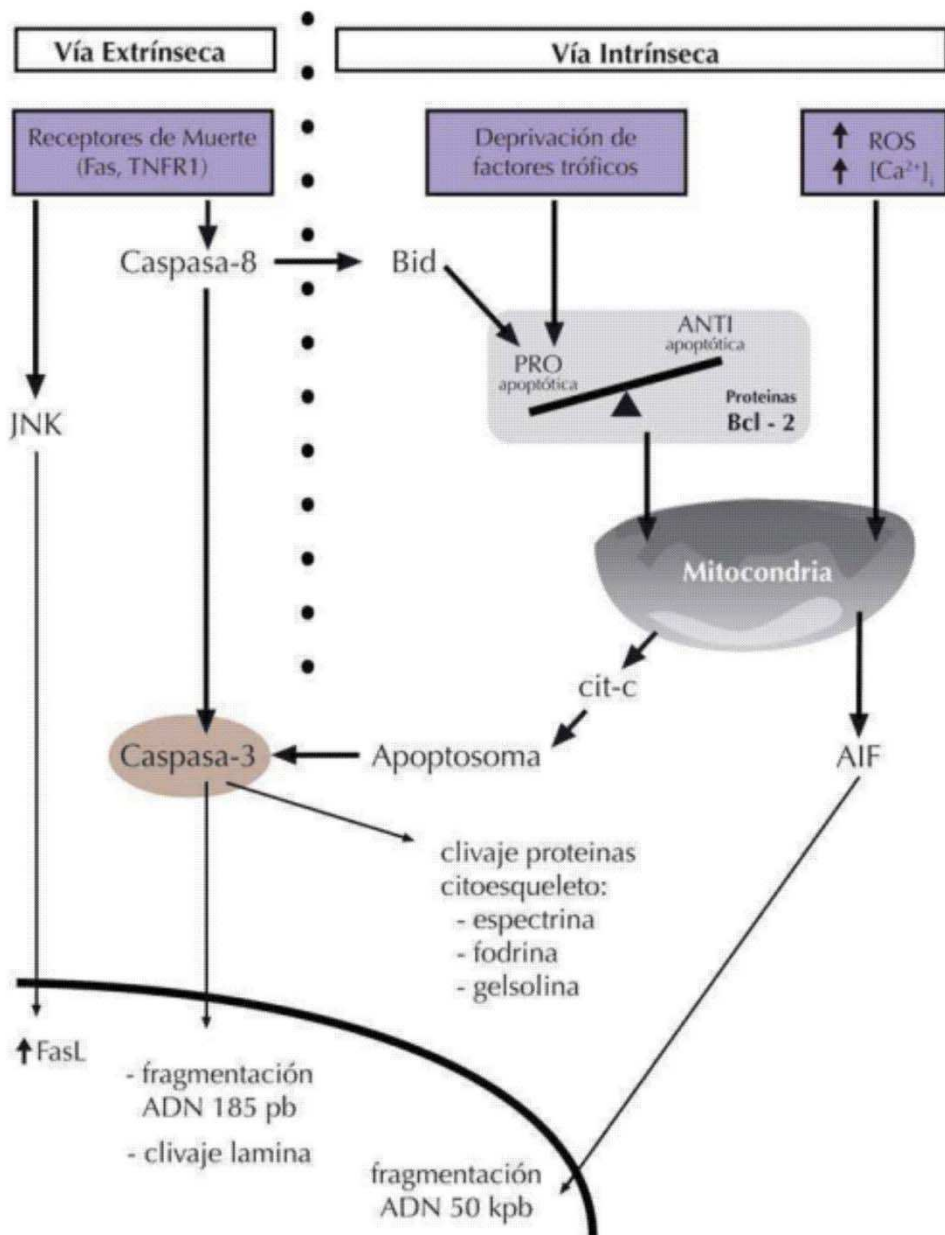


Fig.2- Vías de ejecución clásicas de las apoptosis. La vía extrínseca se inicia a partir de la activación de FAS o TNFR, los cuales a partir de moléculas adaptadoras, pueden activar a JNK o caspasa 8. JNK por medio de c-jun regula la transcripción de genes pro-apoptóticos como FasL. Caspasa-8 tiene como sustrato a caspasa-3 quien produce el clivaje de proteínas del citoesqueleto, fragmentación nucleosomal del ADN y el desarmado de la envoltura nuclear (lamina). La vía intrínseca puede ser activada por deprivación de factores tróficos o en eventos propios de la HI como producción de ROS y aumento de calcio intracelular. esto produce la liberación desde la mitocondria de citocromo c y AIF entre otros. El citocromo c junto con Apaf-1, c-9 y ATP forman el apoptosoma el cual activa a caspasa-3. Ambas vías se cruzan por medio del clivaje de Bid, la cual inclina la balanza hacia las proteínas pro-apoptóticas o por medio del clivaje de caspasa-3 por caspasa-8 (Pozo Devoto V.M., 2012).

La necrosis se caracteriza por cambios nucleares y alteraciones de la membrana plasmática u organelas. En el núcleo, la cromatina se condensa (picnosis) en múltiples agregados de distinta densidad y forma irregular (Kerr et al., 1995). Luego la célula tiende a hincharse (edema) y las organelas a presentar daño estructural. Se produce la contracción de la membrana interna mitocondrial, agregados y desintegración (Trump et al., 1965). Los ribosomas aparecen libres en el citosol, dando a la matriz citosólica un aspecto denso y granuloso. La membrana plasmática puede desintegrarse o sufrir un proceso de “blebbing” en el cual se forman protrusiones circulares de membrana plasmática de tamaño pequeño que no contienen organelas, las cuales pueden separarse de la célula o estallar (Majno y Joris, 1995).

A diferencia de la apoptosis, que es un mecanismo de muerte regulado por caspasas o factores mitocondriales, la necrosis suele ser accidental, aunque existen ciertos casos de muerte con morfología necrótica que son regulados (Vandenabeele et al., 2010).

La relación patológica-necrosis, fisiológica-apoptosis no es del todo cierta, ya que por ejemplo en isquemia, es común ver ambos fenotipos o una mezcla de ellos (Lipton, 1999), 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. Apoptosis y necrosis en el SNC inducidas por Hipoxia-Isquemia

La evidencia acumulada hasta el momento, indica que la muerte celular luego de una HI puede ser de tipo necrótica y/o apoptótica dependiendo de la intensidad del daño y su localización (Martin et al., 1998). La muerte celular que se produce de manera temprana luego de una HI suele ser necrótica (daño primario) (Northington et al., 2001b), mientras que la muerte neuronal retrasada en el tiempo (daño secundario), que ocurre horas o días después, y por medio de una serie compleja de eventos bioquímicos y moleculares altamente regulados, conducen a la apoptosis (Leist y Nicotera, 1998).

Cuando la hipoxia global o la isquemia son prolongadas, la muerte celular tiende a ser necrótica (Petito et al., 1997). Sin embargo se ha observado en varios paradigmas experimentales, que la apoptosis es la responsable de una proporción significativa de pérdida celular luego de un evento de HI (Delivoria-Papadopoulos & Mishra, 2000; Russell et al., 2006).

La apoptosis puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, y muchas de las condiciones que se presentan en una HI, son capaces de provocarla en diversos tipos celulares (Nakajima et al., 2000). Estas condiciones incluyen la generación de radicales libres del oxígeno (Ratan et al., 1994) y del nitrógeno (Nicotera et al., 1995), actividad mitocondrial reducida y despolarización de la membrana (Wolvetang et al., 1994; Zamzami et al., 1996), incremento de Ca^{++} intracelular (Kataoka et al., 1995) y activación de calpaína (Squier et al., 1994).

II.3. Muerte Celular Programada

Este término ha traído confusión, ya que habitualmente se lo utiliza como sinónimo de apoptosis. Apoptosis se refiere a un **mecanismo** de muerte celular, mientras que muerte celular programada (MCP) se refiere al **proceso** de muerte que ocurre en un momento dado del desarrollo o de la homeostasis tisular (Alles et al., 1991; Majno y Joris, 1995). Si bien la mayoría de la MCP ocurre por mecanismos apoptóticos, existen casos en el que no es éste el mecanismo de muerte por el que se produce. Oligodendrocitos murinos deprivados de factores neurotróficos, motoneuronas de médula espinal de embriones de pollo, células salivales de insectos en desarrollo y células intermusculares de larvas de polilla son ejemplos de MCP que poseen características morfológicas inconsistentes con el mecanismo de apoptosis (Schwartz et al., 1993).

Durante el desarrollo del SNC tanto en vertebrados como invertebrados, se produce un exceso de células nerviosas, que será finamente ajustado hacia el final de este

proceso. Prácticamente la mitad de ellas será eliminada a través de un mecanismo de muerte celular programada, por el cual permanecerán sólo aquellas neuronas que se hayan diferenciado y hayan establecido correctamente sus conexiones sinápticas. El exceso de células asegura una adecuada inervación disponible. Este fenómeno ocurre en dos períodos u oleadas: el primero de ellos se produce en zonas ventriculares y subventriculares del SN en desarrollo, donde las stem cells neuronales y progenitoras se diferencian para producir neuronas y células gliales que migrarán hacia el cerebro y la médula espinal. En este período se eliminan aquellos progenitores que no se han diferenciado apropiadamente. La segunda ola de muerte tiene lugar en neuronas recientemente formadas que han migrado a sus destinos finales, extendido sus axones y establecido correctamente sus conexiones (Miller y Kaplan, 2001). La muerte neuronal durante el desarrollo tiene características apoptóticas en la mayoría de los casos, aunque se ha observado que tanto la autofagocitosis como la necrosis pueden también estar presentes (Schweichel y Merker, 1973).

Si bien los mecanismos que controlan la muerte neuronal durante el primer período de MCP son desconocidos, se atribuye a las Neurotrofinas (NTF) un rol fundamental en mediar la segunda oleada de apoptosis (Oppenheim, 1991). De hecho, la muerte producida en esta segunda etapa, es conocida como “neurotrófica” ya que la disponibilidad de estas moléculas por parte de las neuronas sería clave en su supervivencia.

III. Neurotrofinas

III. 1. Generalidades

Las neurotrofinas (NTF) son una familia de proteínas relacionadas estructuralmente, originalmente identificadas como factores de supervivencia neuronales (Purves et al., 1988; Oppenheim, 1988). Hoy en día se sabe además, que participan en procesos de crecimiento axonal, sinaptogénesis, desarrollo y plasticidad neuronal de vertebrados

tanto en el SN en desarrollo como en el maduro (Rydén et al., 1997). Son sintetizadas en forma de precursores glicosilados denominados pro neurotrofinas (los cuales poseen funciones biológicas en sí), que son clivados para su procesamiento tanto en el medio intra como extracelular por acción de enzimas proteolíticas como furina, plasmina y metaloproteasas (Lee et al., 2001). Actúan formando homodímeros. Cuatro miembros de esta familia han sido caracterizados en mamíferos: Nerve Growth Factor (NGF), Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), NT-3 y NT-4. Se cree que han evolucionado por medio de sucesivas duplicaciones del genoma de un cordado ancestral (Hallbook, 1999). Comparten ciertas características, que incluyen el peso molecular (13.2-15.9 kDa), punto isoeléctrico (en el rango de 9-10), presentarse como dímeros unidos no covalentemente en solución y compartir cerca del 50% de su estructura primaria (Mowla et al., 2001). Cada una de ellas actúa sobre poblaciones neuronales diferentes tanto en el SNC como en el periférico, incluyendo neuronas sensoriales y simpáticas, hipocampales, motoneuronas, células ganglionares de la retina, neuronas colinérgicas septales y estriatales, células cerebelosas de Purkinje y neuronas de la sustancia nigra (Rydén et al., 1997; Korsching, 1993).

Inicialmente se consideraba que los tejidos target eran los únicos encargados de la síntesis de estos factores tróficos, los cuales son secretados en forma soluble en el espacio extracelular, captados por receptores de membrana seguido de endocitosis, y transportados desde el axón en forma retrógrada hasta el soma celular de la neurona receptora, en donde estimulan la expresión de genes que se relacionan con las múltiples funciones de estos factores tróficos (Seiler et al., 1984; Ernfors et al., 1990b; Huang et al., 2001; Segal, 2003). Sin embargo la evidencia acumulada permitió ver que las neuronas no solamente tenían soporte trófico a través de sus tejidos inervados (mecanismo retrógrado), sino también de células aferentes (transporte anterógrado), y de sí mismas (mecanismo autócrino,) (Korsching, 1993; Wang et al, 2007; Ng, 2007), (Fig.3).

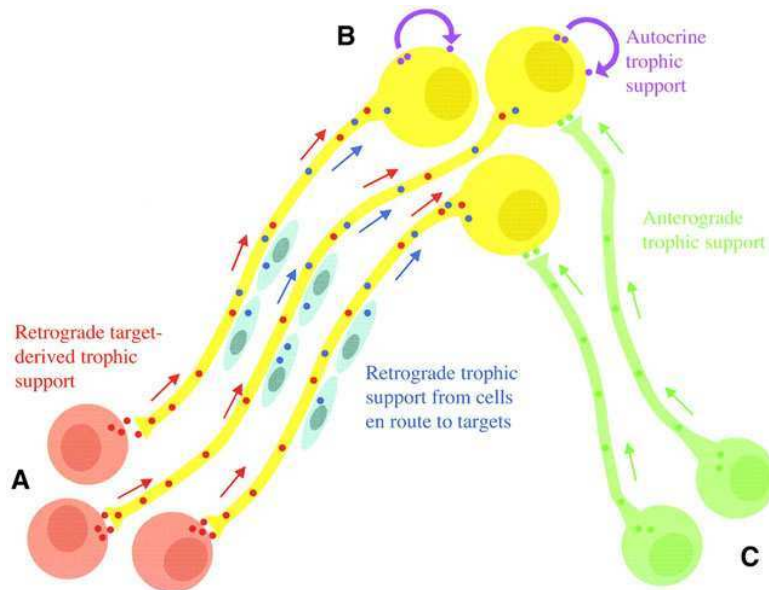


Fig.3 - Esquema que ilustra las rutas de transporte neurotrófico. Se muestran 3 poblaciones interconectadas de neuronas, A, B y C. El grupo neuronal B obtiene soporte trófico de diversas fuentes: (i) de sus células target (grupo A, puntos rojos) quienes al liberar neurotrofinas, éstas se unen a receptores de las terminaciones axónicas de las neuronas B para ser anterógradamente transportadas (flechas rojas) hacia el soma; (ii) de células intermedias o gliales asociadas a los axones de las neuronas B (puntos azules), los cuales son transportados retrógradamente (flechas azules); (iii) de células aferentes: el tejido C sintetiza en su soma factores tróficos que son transportados a través de los axones anterógradamente (flechas verdes) para ser liberados desde sus terminales y unirse a receptores de los cuerpos celulares o dendritas del grupo B de neuronas; y (iv) por una ruta autócrina (puntos y flechas púrpuras). (Davies A.M., 2003).

En principio se creía que este transporte anterógrado, no aplicaba para NGF (Altara & DiStefano, 1998), aunque trabajos más recientes demostraron que sí existe un efecto de éste factor mediante señalización anterógrada (Acsády et al., 2000; Guo et al., 2012). De hecho, se considera que éste tipo de transporte para algunas neurotrofinas, constituye la forma predominante en el SNC adulto (Conner et al.; 1997).

La expresión de neurotrofinas y sus correspondientes receptores en el SNC del embrión de pollo, han sido detectados en estadíos de desarrollo muy temprano (DE6 al

DE11), lo cual sugiere su importante rol en el desarrollo y maduración del sistema nervioso (Escandón et al.; 1994).

Las neurotrofinas no sólo actúan en el SN en desarrollo, sino también sobre neuronas maduras saludables, regulando su plasticidad como respuesta a cambios adaptativos en la morfología neuronal adulta (Mc Allister 2000; Conner et al., 2009), o injuriadas e implicadas en enfermedades neurodegenerativas (Lindvall et al., 1994; Tuszynski and Gage, 1995).

Estos factores neurotróficos pueden actuar además sobre tejidos no nerviosos. NGF posee acción mitogénica, promotora de supervivencia y de diferenciación en una amplia variedad de células sanguíneas, incluyendo mastocitos (Matsuda et al., 1991; Horigome et al., 1993), linfocitos (Thorpe & Perez-Polo, 1987), monocitos (Ehrhard et al., 1993), neutrófilos (Kannan et al., 1991) y basófilos (Bischoff & Dahinden, 1992). Otras células que se encuentran bajo la influencia del NGF y de otras neurotrofinas, incluyen músculo liso y esquelético (Brodie & Sampson 1990), queratinocitos (Di Marco et al., 1993) y células epiteliales de la córnea (Woost et al., 1992).

III.2. Las pre-pro-Neurotrofinas

Todas las neurotrofinas son generadas como pre-pro-neurotrofinas (de aproximadamente 240-260 aa) que son luego procesadas hasta ser eventualmente secretadas como homodímeros (cada uno de ellos con un largo de 118-129 aa) en el espacio extracelular (Lessmann et al, 2003).

Como toda proteína comienza su síntesis en ribosomas libres del citosol. Allí, el pre-pro ARNm es traducido hasta la aparición de un péptido señal que lo dirige hacia el retículo endoplasmático rugoso donde es clivado. La pro neurotrofina resultante puede formar de manera espontánea homo o heterodímeros unidos no covalentemente. En este punto, las pro-neurotrofinas se dirigen al aparato de Golgi transportadas por vesículas (se cree que sin clatrina) para ser finalmente acumuladas allí (Rothman,

1992). Luego de esto pueden ser procesadas por furín proteasas en la región trans del aparato de Golgi (Mouri, 2007) o en el espacio extracelular (Lee, 2001) para dar lugar a las neurotrofinas maduras.

III. 3. NGF

Fue el primero de los factores tróficos en ser descubierto, a comienzos de los '50, por Rita Levi-Montalcini y Victor Hamburger (Ebendal, 1992). Estos investigadores fueron pioneros en demostrar que el Sistema Nervioso requiere un adecuado suministro de neurotrofinas para la supervivencia y el desarrollo. Estos estudios fueron, además, los primeros en comenzar a delinear el concepto de su rol en la determinación del tamaño y la morfología de las inervaciones periféricas, ya que las neurotrofinas se presentan en cantidades muy limitadas, por lo tanto disponibles sólo en aquellas neuronas que pudieron haber establecido la cantidad y calidad necesarias de conexiones con sus tejidos target (Berry, 2012).

Ha sido una de las neurotrofinas más estudiadas, debido a su papel esencial en el desarrollo, supervivencia y mantenimiento fenotípico tanto del SNP como del SNC (Aloe, 1997).

Al igual que el resto de las neurotrofinas, es sintetizado como un pre-proNGF, que es procesado en el RER para dar lugar a la forma inmadura proNGF. En el aparato de Golgi es sustrato de proteasas que reconocen sus sitios de clivaje, para dar lugar a la forma madura del NGF (de aproximadamente 13 kD), también conocido como bNGF o 2.5 sNGF, dependiendo del método de aislamiento (Mobley et al., 1976). Modificaciones adicionales del proNGF, entre las que se encuentran diferentes sitios de glicosilación, dan lugar a varias formas intermedias de alto peso molecular, cuyas funciones no se encuentran del todo claras (Seidah et al., 1996; Yardley et al., 2000).

Se considera que el proNGF es la forma predominante y detectable del NGF en muchos tejidos sanos del SNC en varias especies (rata, ratón, humano), y que

probablemente sea el responsable de funciones que se le atribuyen a la forma madura (Fahnestock et al. 2001). Posee actividad neurotrófica y se lo relaciona fundamentalmente con vías apoptóticas debido a su alta afinidad por el receptor de membrana p75, aunque también puede intervenir en cascadas de señalización provida, pero de manera menos efectiva que el NGF maduro (Fahnestock et al., 2004). Algunos autores consideran que las diferencias en la actividad de NGF y proNGF no son sólo cuantitativas sino cualitativas al actuar sobre conjuntos de genes diferentes y que los efectos biológicos producidos por estas dos formas, son el resultado de un complejo balance entre sus programas específicos de señalización y transcripción (D'Onofrio et al., 2011).

En principio, NGF fue descrito como una proteína que actuaba exclusivamente en neuronas periféricas simpáticas, aunque mucho más tarde fue encontrándose también su actividad en neuronas del sistema nervioso central y en una variedad de células del sistema inmune (Black, 1986).

Sus conocidas funciones sobre células del tejido nervioso fueron ampliándose con el descubrimiento de otros tipos celulares en los cuales posee efectos, como ser áreas límbicas que se relacionan con el estado anímico y el conocimiento, la orquestación de respuestas neuroendócrinas y actividades circadianas, funciones sobre sistemas inmunes y endócrino, lo que indica que esta neurotrofina podría funcionar como un mensajero intercelular o aún un factor humoral que ayuda a regular respuestas ante el stress (Aloe, 1997; Levi-Montalcini, 1990; Smith, 1995; Marketon, 2008). Se lo ha propuesto también como un factor clave en la denervación que sufre el miometrio durante la gestación en lo mamíferos, que impide la contractibilidad y el trabajo de parto prematuro (Lobos, 2005).

Actúa tanto en el desarrollo como en el SN adulto, participando en la plasticidad neuronal que permite al sistema nervioso maduro modificar su estructura y funciones en respuesta a estímulos. De hecho, la síntesis constitutiva de NGF en los tejidos adultos se correlaciona con características fenotípicas de las neuronas del SNP tales

como densidad, tamaño de cuerpo celular, arborización dendrítica, inducción o inhibición de neuropéptidos y neurotransmisores y de las enzimas que los sintetizan (Otten, 1977; Mearowa, 1995).

III. 4. Receptores de Neurotrofinas

La búsqueda de receptores para NGF, resultó en el descubrimiento de una proteína de 75-80 kDa, llamado simplemente p75. Inicialmente se creyó que éste receptor unía con baja afinidad al NGF, pero luego se demostró que la afinidad era la misma para todas las NTF (Rodríguez-Tébar et al., 1991).

El dominio citoplasmático de este receptor contiene un “dominio de muerte” que media interacciones con otros componentes celulares, permitiéndole su intervención en caminos de señalización.

No posee actividad enzimática intrínseca y su actividad depende de la asociación con proteínas citoplasmáticas adaptadoras (Roux, 2002).

El aumento en su expresión ha sido relacionado con injuria del sistema nervioso en una amplia variedad de tejidos, y en muchos casos, ha sido correlacionada con la inducción de apoptosis (Ernfors et al., 1989; Armstrong et al., 1991; Dusart et al., 1994; Kokaia et al., 1998; Oh et al., 2000).

Luego fueron descriptos tres proteínas pertenecientes a la familia de los receptores tirosina-kinasa, llamados Trk (tropomyosin-related kinase), como la segunda clase de receptores de neurotrofinas (Bothwell, 1995). La unión de las NTF produce la dimerización de estos receptores y la autofosforilación de tirosinas presentes en su dominio citoplasmático (Kaplan et al., 1991; Klein et al, 1991 b.; Marsh et al., 1993). La secuencia proteica de este dominio con actividad tirosina kinasa, se encuentra altamente conservada en los tres receptores. NGF es específico para TrkA, BDNF y NT-4 para TrkB y NT-3 activa a TrkC y menos eficientemente al resto de los Trk's.

El splicing alternativo de los ARNm de estos tres receptores, puede dar lugar a la expresión de proteínas con diferencias en el dominio extracelular, afectando la unión con sus ligandos (Clary & Reichardt, 1994; Shelton et al., 1995). Cuando estas diferencias se producen a nivel de los dominios citoplasmáticos, se generan las formas “truncadas” de los receptores (descritos para TrkB y TrkC), las cuales carecen de actividad catalítica tirosina-kinasa. Se cree que la función de estas isoformas en células no neuronales, podría ser la de la presentación de NTF a las neuronas (Huang & Reichardt, 2001). En las neuronas, estos mismos receptores podrían inhibir la dimerización de los receptores completos, atenuando así la respuesta a las NTF, como una forma de regulación de vías de señalización intracelulares (Eide et al., 1996).

La autofosforilación de determinados residuos tirosina presentes en el dominio citoplasmático de los Trk's, conduce a su activación. La fosforilación de otras tirosinas, crea sitios que sirven de base para la unión de proteínas adaptadoras que poseen motivos de unión a fosfo tirosinas (Pawson & Nash, 2000).

Estas proteínas adaptadoras, acoplan estos receptores a cascadas de señalización intracelular que incluyen el camino de Ras/ERK (extracellular signal-regulated kinase), fosfatidilinositol-3-kinase (PI-3 kinasa)/Akt, y fosfolipasa C (PLC) (Reichardt & Fariña, 1997; Kaplan & Miller, 2000) (Fig.4).

El camino Ras/ERK

Comienza con la fosforilación por parte del receptor Trk, de la proteína Shc, quien recluta un complejo de proteínas adaptadoras (Grb2 y SOS). SOS activa a Ras con varias consecuencias río abajo, incluyendo la activación de la ruta del ERK, quien actúa sobre factores de transcripción reguladores de genes esenciales para la supervivencia neuronal asociada a neurotrofinas (Bonni et al., 1999; Riccio et al., 1999).

La vía PI3K/Akt

Con la activación del receptor Trk, es reclutado un complejo de proteínas adaptadoras que median la activación de PI3K, quien fosforila al fosfolípido PIP₂ a PIP₃, ambos ubicados en la membrana interna (Rodgers y Theibert, 2002). PIP₃ sirve como anclaje para la fosforilación de Akt. Akt es una Ser/Treo kinasa que actúa sobre una gran variedad de sustratos, favoreciendo la supervivencia neuronal (Datta et al., 1999; Yuan & Yankner, 2000). Entre estos sustratos se encuentra BAD, un miembro de la familia Bcl-2 que promueve apoptosis al unirse a Bcl-xL. La fosforilación de BAD permite su asociación a proteínas a quienes impide que promuevan apoptosis (Datta et al., 1997). Activa también a NFκB, quien promueve supervivencia neuronal (Middleton, 2000).

Fosfolipasa C

Es una proteína implicada en una variedad de procesos y señalizaciones intracelulares incluyendo mitogénesis y movimiento de calcio. De las relacionadas con las neurotrofinas, puede nombrarse su intervención en la regulación del camino de MAPK inducido por NGF (Rong et al., 2003).

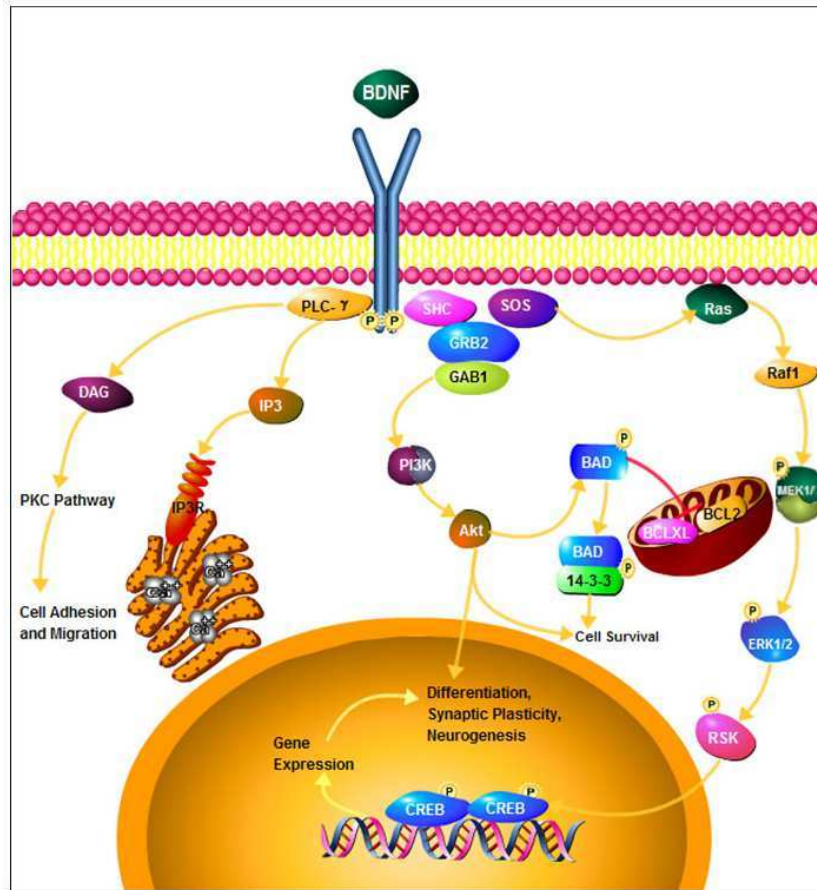


Fig.4- Rutas de señalización de las neurotrofinas por activación del receptor Trk. Luego de la unión de las neurotrofinas (representadas en el esquema por el BDNF) al dominio extracelular de su receptor Trk, se produce la dimerización del mismo y la consecuente activación de su dominio intracelular tirosin-kinasa. Esto conduce a la autofosforilación de residuos tirosinas, que sirven como sitios de interacción a proteínas adaptadoras y la activación de cascadas de señalización intracelular. La fosforilación del receptor Trk conduce al reclutamiento de la proteína Shc, quien por medio de la proteína SOS activa la ruta del ERK, que se relaciona con la expresión de genes involucrados en diferenciación, plasticidad sináptica y neurogénesis. Shc también contribuye con la activación de la vía PI3K/Akt, favoreciendo la supervivencia neuronal. La fosforilación de los Trk resulta en el reclutamiento de la proteína PLC la cual conduce a la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), relacionados con plasticidad, adhesión y migración celular. (Wong J., 2013).

Clásicamente, tanto *in vivo* como *in vitro*, los receptores Trk han sido asociados a transducción de señales positivas como crecimiento y supervivencia, mientras que p75 lo ha sido a señales apoptóticas.

Sin embargo, investigaciones sobre éste último receptor, han aportado evidencia sobre otros roles de p75, que vuelven más complejo el escenario. Los datos sugieren, que bajo determinadas condiciones, p75 puede facilitar la supervivencia, más que la muerte celular (Shimohama et al., 1993; Kume et al., 2000). De hecho se considera que, cuando los receptores son coexpresados, p75 aumenta la habilidad de los Trk para unirse y responder a cantidades limitadas de NTF (Barker, 2004). Se ha descubierto además que el proNGF forma un complejo de señalización al unirse con el receptor p75 y el receptor sortilina: éste sirve como un co-receptor que permite a las neuronas que expresan Trk y p75, responder a una proneurotrofina e iniciar acciones pro apoptóticas. En ausencia de sortilina, la actividad regulada de ciertas proteasas puede clivar proNGF a su forma madura promoviendo señales de supervivencia mediadas por Trk (Nykjaer et al., 2003) (Fig.5).

Clásicamente, tanto *in vivo* como *in vitro*, los receptores Trk han sido asociados a transducción de señales positivas como crecimiento y supervivencia, mientras que p75 lo ha sido a señales apoptóticas.

De hecho, se considera que la activación de Trk silencia la señal apoptótica de p75 y que la función de este último receptor varía considerablemente dependiendo del contexto celular en el cual se expresa. En general podría decirse que las NTF pueden inducir MCP a través de p75 en células que no expresen receptores Trk (Bibel, 2000). Existen datos que sugieren, por ejemplo, que NGF causa la muerte de neuronas retinales que expresan p75 pero no TrkA en estadios tempranos del desarrollo (Frade et al., 1996). Es decir que en ausencia de expresión de TrkA, NGF actúa como un inductor de muerte celular por medio de p75 (Kume et al., 2000).

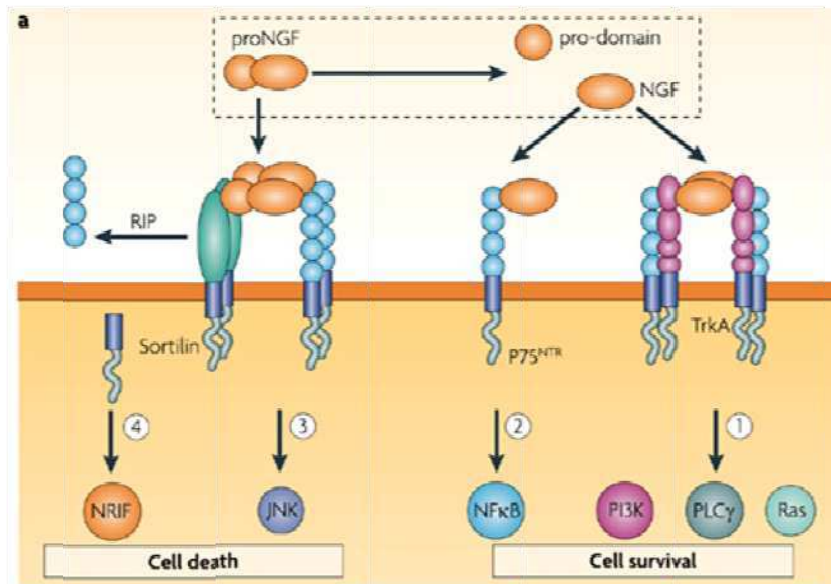


Fig. 5- Esquema de las principales rutas de señalización reguladas por neurotrofinas y sus receptores. Las formas maduras de las NTF (representadas en este caso por NGF) pueden unirse tanto a los complejos Trk-p75 (en rosa y celeste, respectivamente), como a p75. En ambos casos las vías que resultan, promueven supervivencia celular. La presencia de p75 en el complejo formado junto a Trk, facilita y estimula la unión de las neurotrofinas a éstos reforzando la acción de MAPK, PI3/Akt y PLC (1). P75 activa la vía $\text{NF}\kappa\text{B}$, independiente de Trk (2). P75 puede formar un complejo de señalización al unirse al co-expresor sortilina (representado en verde). A este complejo se unen las formas inmaduras de las NTF, ya que el receptor sortilina posee un sitio de unión a la región pro de las mismas. De ésta unión se desencadenan vías de muerte celular a través de la activación de JNK (3) o la proteólisis de p75 seguido de la translocación nuclear de NRIF (neurotrophin receptor interacting factor) (4) (Willnow et al., 2008).

III. 5. El NGF en nuestro modelo

Durante el desarrollo embrionario del pollo, el NGF es requerido para la formación y mantenimiento de poblaciones neuronales específicas desde estadíos muy tempranos. Su secuencia posee alta homología con la de ratón (Scott et al, 1983) y otras especies mamíferas (Harper et al., 1982), sugiriendo que las demandas funcionales de esta proteína han permitido pocos cambios a lo largo de la evolución.

El estudio de los ARNm tanto de NGF como de p75 y TrkA, revela que éstos son encontrados mucho antes de que sus neuronas target hayan sido especificadas (Baig, 1996; Cotrina, 2000), lo que pone de manifiesto las numerosas y en algunos casos desconocidas funciones de este factor neurotrófico. La mayoría de los datos que se conocen sobre NGF, p75 y TrkA corresponde a sus mensajeros, y poco se sabe de las proteínas que resultan de su expresión (Bhargava, 2002; Bhargava, 2007). Se ha sugerido que la presencia de NGF en estadíos de desarrollo tan tempranos, podría estar vinculado, entre otros roles, con la formación del tubo neural y del patrón “derecha-izquierda” responsable del plan corporal de un organismo (Manca, 2012).

El tectum óptico en pollo, a diferencia de su estructura equivalente en mamíferos (colículos superiores), constituye una de las zonas del SNC con mayores niveles de ARNm correspondientes a NGF (Ebendal et al., 1986).

IV. Neuroprotección y Neurotrofinas

La neuroprotección es el mecanismo que protege el tejido nervioso del daño provocado por diversos tipos de injurias.

Al producirse una disminución en la concentración de O₂, disminuye también la producción de ATP, lo que conduce a una despolarización de la membrana por desbalance iónico. Entre los iones que ingresan a la neurona se encuentra el Ca⁺⁺, que se suma al que se libera de los depósitos intracelulares (Torregrosa et al., 2007).

Éste aumento en la concentración intracelular de calcio ha demostrado ser decisivo en el proceso de daño celular pues induce liberación de neurotransmisores como el glutamato (responsable en gran parte de los fenómenos de excitotoxicidad, con síntesis y liberación de radicales libres), inhibición de la síntesis de ATP y degradación de macromoléculas (Siesjo, 2006).

Se ha propuesto que la inflamación y excesiva producción de radicales libres que caracterizan al tejido nervioso luego de un proceso de hipoxia-isquemia, estaría relacionado con una disminución en la síntesis de neurotrofinas y ésta con la de neurogénesis (Fan et al., 2010)

Es conocido el rol neuroprotector de las neurotrofinas (en particular del NGF y el BDNF), ante diversas formas de daño, como excitotoxicidad (Nguyen, 2010), privación de glucosa (Cheng, 1991), isquemia (Shigeno et al., 1991) e hipoxia (Zhu et al., 2007; Ishitsuka et al., 2012) tanto *in vivo* como *in vitro*.

Existen numerosas investigaciones que han caracterizado el efecto de la administración directa de NTF (particularmente del NGF y BDNF) *in vivo* en diversos modelos y para diversas formas de injuria neuronal, demostrando efectos positivos sobre la excitotoxicidad, pérdida de memoria espacial y muerte neuronal que caracteriza a las enfermedades neurodegenerativas (Zhang et al., 2013).

La administración intracerebral de NGF ha demostrado efectos benéficos en pacientes con Parkinson y Alzheimer (Olson et al., 1991; Seiger, 1993) y en modelos animales de glaucoma, la administración de NGF mostró inhibir la degeneración de las células ganglionales de la retina, afectadas por la injuria (Carmignoto et al., 1989; Siliprandi et al., 1993).

Debido a la dificultad de las NTF de acumularse en el cerebro a causa de su corta vida media en sangre y pobre estabilidad proteica, se han ensayado varias estrategias que permiten mejorar la llegada de NTF a los sitios injuriados, como ser trasplante de células genéticamente modificadas productoras de dichas moléculas (Bakshi et al., 2006), dispositivos implantables (Eriksdotter, 2012), vectores celulares (Li et al., 2008), etc.

La neuroprotección en el desarrollo constituye un escenario un tanto diferente, y de buenas oportunidades de intervención clínica ya que la inmadurez del cerebro posee una mayor plasticidad que favorece la reorganización de patrones de conexión capaces de compensar lesiones durante éste período (Kitagawa et al., 2001). Por esto

se considera plausible que los recién nacidos presenten patrones de reorganización de las conexiones neuronales cuando éstas se encuentran aún en refinamiento.

Los mecanismos moleculares específicos por los cuales las NTF brindan un efecto neuroprotector, se relacionan con la estabilización de la homeostasis iónica (particularmente del Ca^{++}) y la activación de los sistemas antioxidantes (Mattson, 1997). Estos mecanismos pueden ser a largo plazo (como aquellos que tienen que ver con la modulación en la expresión génica de enzimas antioxidantes) o a corto plazo, como la modulación de proteínas involucradas en la homeostasis iónica intracelular. Se considera que el NGF bloquearía la producción de ROS pero no por propiedades antioxidantes en sí sino por medio de su receptor TrkA y de la vía MAPK (Dugan et al., 1997).

Una de las moléculas intervinientes en el proceso de neuroprotección por NGF, sería la de su receptor TrkA en su forma activa, P-TrkA. Aquellas poblaciones de células neuronales y no neuronales tratadas con diversos compuestos neuroprotectores previamente a la injuria, presentan un rescate de la pérdida celular debido al daño, y un aumento en la fosforilación del receptor TrkA (Bai et al., 2010; Lu et al., 2013). Si a estas mismas células, se las trata además con inhibidores de TrkA (como k252a, quien inhibe competitivamente su fosforilación), el efecto neuroprotector es abolido con la consecuente pérdida celular (Pincelli, 1997; Arien-Zakay, 2008; Nguyen 2009; Nguyen, 2010)

V. El Tectum Óptico en las Aves

Las aves sea quizá 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 alimento, 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 desarrollan en el ojo y el tectum óptico (Mey and Thanos, 2000).

En todos los amniotas (reptiles, aves y mamíferos) la información proveniente de la retina, llega al telencéfalo por dos vías diferentes. Una, viaja de la retina directamente a un grupo de células en el tálamo, y de ahí al telencéfalo. Esta ruta se la denomina “talamofugal” en aves y reptiles y equivale a la vía genículoestriada de 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 en aves, se conoce como “tectofugal” y corresponde posiblemente a la vía colículotalamocortical en mamíferos (Shimizu y Karten, 1993).

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 procesamientos de información visual. Desempeña un rol significativo en una variedad de procesos visuales como discriminación de colores, brillo, tamaño y patrones así como agudeza visual y transferencia intraocular de aprendizaje de discriminación visual (Karten, 1979). Por otro lado, la vía talamofugal, se encuentra involucrada en funciones relacionadas con la resolución espacial, cumpliendo un rol importante en la superposición binocular.

V. 1. Estructura y función.

A diferencia de los mamíferos, los nervios ópticos de las aves se encuentran completamente cruzados y en su gran mayoría las fibras provenientes de la retina proyectan topográficamente al tectum óptico (TO) contralateral, vía tectofugal (Mey y Thanos, 2000). El tectum óptico es una estructura mesencefálica bilateral que junto con el tegmentum y el pretectum, forman el lóbulo óptico (Fig.6). Dada su ubicación

como primer estación de relevo en la vía tectofugal, tiene un rol fundamental con el procesamiento de la información visual.

Como modelo experimental el TO no sólo es utilizado en disciplinas de neurociencias, sino también en biología del desarrollo (De Long y Coulombre, 1965; Puelles y Bendala, 1978).

De acuerdo a la terminología de Cowan, pueden distinguirse en el TO de aves, seis estratos principales, uno de los cuales deriva en diez láminas celulares y plexiformes alternantes (Cowan, 1971).

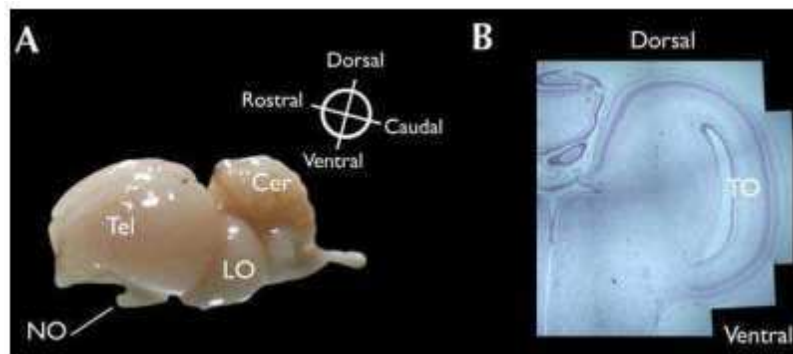


Fig.6- A. Vista lateral del encéfalo de pollo en día postnatal 6. Se grafican los ejes Dorso-ventral y Rostro-Caudal del LO. Tel: telencéfalo, Cer: cerebelo, LO: lóbulos ópticos, NO: nervios ópticos. B. Corte coronal a la altura de los LO de un embrión en DE12, teñido con Nissl donde se observa la estructura laminada correspondiente al TO (Pozo Devoto V.M., 2012).

V. 2. Desarrollo

El desarrollo del LO se produce simultáneamente, pero en principio, de forma independiente con el de los ojos (Mey and Thanos, 2000). Esta independencia finaliza cuando los axones de las células ganglionares de la retina arriban al tectum óptico.

Su desarrollo puede dividirse en tres fases principales (La Vail JH y Cowan WM, 1971). Durante la primera fase (3 a 6 días de incubación) se produce el período de máxima proliferación celular, con un pico en el DE 5. La segunda fase (6 a 12 días de

incubación) se caracteriza por el desarrollo del proceso de estratificación que comienza a medida que un gran número de células diferenciadas migran verticalmente del neuroepitelio hacia las meninges. En particular, a partir del día embrionario 12 (DE 12) no aparecen nuevos elementos celulares y comienza el proceso de sinaptogénesis (Mey & Thanos, 2000). Durante la tercer fase (12 a 18 días de incubación) se completa la diferenciación citoarquitectónica del LO.

Se considera que a partir del DE7, ocurren las primeras sinapsis, registrándose actividad espontánea en los axones de las células ganglionares de la retina (la principal vía aferente del TO) (Catsicas et al., 1998; Wong et al., 1998). 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).

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis fue el estudio del daño celular y de la expresión, activación y modulación del NGF y de sus receptores de membrana, ante un evento de injuria hipóxica aguda en embriones de aves, y estudiar el fenómeno de neuroprotección sobre el Tectum óptico en desarrollo.

Para ello, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- * Determinar la segunda ola o período de Muerte celular programada en el tectum óptico durante el desarrollo embrionario dada la importancia que en éste período poseen los factores neurotróficos (estableciendo además ese período como el de trabajo subsiguiente).
- * Evaluar en dicho período el efecto de la hipoxia sobre el tectum óptico, mediante la cuantificación de la muerte celular.
- * Determinar la expresión y modulación del NGF en respuesta a un daño hipóxico.
- * Estudiar la expresión y activación ante un proceso de hipoxia, de los receptores de membrana TrkA y p75.
- * Evaluar el rol de la vía del Akt en el daño hipóxico.
- * Evaluar un supuesto rol neuroprotector del NGF ante este tipo de daño neuronal.
- * Caracterizar las vías moleculares implicadas en el fenómeno de neuroprotección por hipoxia.

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 de 18°C, los huevos fértiles fueron colocados en una incubadora (Franken) a temperatura constante de 38.5 °C y una humedad ambiente de aproximadamente 60%. El volteo automático de los huevos, se produjo cada hora, a fin de impedir la alteración en el intercambio normal de O_2 y el desarrollo de las membranas extraembrionarias (Tazawa, 1980).

II. Tratamiento hipóxico

Los huevos fértiles en DE15 fueron colocados en una cámara plástica con 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 la incubación de los animales controles. Durante un minuto se profundió la cámara con un flujo de 20 l/min de una mezcla gaseosa conteniendo 8% de O_2 y 92% N_2 , permitiendo la salida del aire normóxico existente en la misma. A continuación se redujo el flujo a 4 l/min, se cerró la válvula de escape y se mantuvieron las condiciones hipóxicas por el lapso de una hora. Un depósito de agua destilada en la base de la cámara se utilizó para mantener la humedad relativa en 60%. Fue utilizado un reservorio de CaO_2H_2 dentro para absorber el CO_2 formado durante el tratamiento y así impedir su acumulación.

Luego del tratamiento hipóxico los animales fueron devueltos a la incubadora y/o procesados según el estudio realizado.

III. Preparación de tejidos

Los embriones fueron decapitados e inmediatamente se procedió a disecar el encéfalo. Éstos fueron fijados mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS durante 12 horas a 4°C. A continuación se separaron los LO del prosencéfalo, se lavaron con PBS y se procedió a su deshidratación con pasajes sucesivos por una serie de alcoholes de concentración creciente, seguido de inmersión en xilol. A continuación, se los sumergió en una solución de xilol/parafina 1:1 y se los colocó en estufa a 58 °C durante una hora, seguido de tres pasajes por 100% parafina de 40 minutos cada uno. Los tacos de parafina armados fueron cortados en micrótopo, en secciones de 5 µm y se montaron en portaobjetos xilenizados. Las muestras fueron mantenidas en heladera hasta su utilización.

IV. Tinción de Hoechst

Luego de su desparafinización y de la técnica de inmunofluorescencia o ensayo de TUNEL, los cortes fueron contrateñidos con la incubación en oscuridad de una solución de Hoechst (2µg/ml) en PBS durante 10 minutos. Se lavó con PBS y se montó con medio de montaje para fluorescencia de Dako.

V. Inmunomarcación

V.I. Inmunofluorescencia

Luego de la desparafinización, los cortes fueron sometidos a un proceso de recuperación antigénica que se realizó mediante la incubación a 95 °C en buffer citrato (citrato de sodio 10mM/PBS, pH 6.0/Tween 20 0.05%) durante 40 minutos. La unión

inespecífica del anticuerpo fue bloqueada incubando con suero normal de cabra al 5% en PBS-TX (PBS 0.1M pH 7.4/Tritón X-100, 0.03%) durante 30 minutos. El anticuerpo primario se diluyó en PBS/TX y se incubaron los cortes toda la noche a 4 °C. Luego se incubó con anticuerpo secundario diluido en PBS-TX conjugado con Cy2, durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizó la tinción de Hoechst y se montaron con medio de montaje.

V.II. Inmunohistoquímica

El protocolo siguió los mismos pasos que la técnica de inmunofluorescencia hasta la incubación con el anticuerpo primario. Éste fue diluido en PBS-TX y se incubaron los cortes toda la noche a una temperatura de 4 °C. Luego fue bloqueada la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% en PBS por 10 minutos. El anticuerpo diluido en PBS-TX y conjugado con biotina, fue incubado durante dos horas a 37 °C. Esto fue seguido de una incubación con streptavidina/HRP (1:400) durante 30 minutos. Los cortes fueron luego incubados con una solución DAB (DAB 0.05% en PBS/H₂O₂ 0.015%) durante dos minutos y finalmente las secciones deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá.

VI. Técnica de TUNEL

Para este ensayo se utilizó un kit fluorométrico y se siguieron las indicaciones del fabricante (Promega). Los cortes fueron incubados luego de su desparafinización en una solución de proteínasa K (TrisHCl 0.1M/EDTA 50mM/proteínasa K 20µg/ml) durante 15 minutos para exponer el ADN enrollado en los nucleosomas. Luego se incubaron en buffer de equilibrio durante 10 minutos y posteriormente se incubó con buffer de reacción (cada corte recibió 50µl de buffer de equilibrio/ 5 µl de mezcla de nucleótidos conjugados con fluoresceína y ATP/1 µl de deoxinucleotidil transferasa terminal)

durante una hora a 37 °C. La reacción se detuvo con la solución del kit SSC 2X, incubada por 15 minutos. Luego de la contratinción, se procedió al montaje con medio de montaje específico para fluorescencia.

VII. Western Blot

VII. 1. Obtención de fracción total

A partir de la remoción de los lóbulos ópticos embrionarios, se procedió a la separación del TO del LO con la ayuda de una lupa y en hielo. Luego, los TO fueron homogeneizados en un potter con buffer de homogenización (Tris-HCl 20mM pH8, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, Tritón-x100 1%, glicerol 10%) con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Las muestras fueron centrifugadas a 12500 g por 30 minutos y el sobrenadante (fracción total) fue alicuotado y mantenido a -20 °C. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry, utilizando albúmina bovina como estándar.

VII. 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 minutos y sembradas en geles de poliacrilamida-bisacrilamida en volúmenes conteniendo 40 μ g de proteína/calle durante dos horas aproximadamente (20 mA/30 minutos para gel concentrador y 25 mA durante el resto del tiempo para gel separador). Las proteínas fueron electroforéticamente transferidas desde el gel a membranas de PVDF a 100V durante 90 minutos.

VII. 3. Blotting y Revelado

Se realizó el bloqueo con una solución de PBS-T al 5% de leche descremada y 1% de glicina durante 1 hora en agitación. Luego, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (anti Akt, 1:1000; anti pAkt, 1:700; anti-actina, 1:1000) en PBS/BSA 1% toda la noche a 4 °C en agitación. Luego las membranas fueron lavadas en PBS-T e incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (1:1000) diluïdos en PBS/BSA 1% durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

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 radiográficas, reveladas y fijadas con soluciones apropiadas. Finalmente fueron scaneadas y cuantificadas densitométricamente.

VIII. Cultivo neuronal primario

Placas plásticas 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 dos horas. Posteriormente fueron lavadas para ser luego mantenidas en la estufa de cultivo hasta el momento de la siembra.

A partir de embriones en DE15, se disecaron los LO, se separaron con ayuda de un bisturí los TO y éstos fueron separados en pequeños fragmentos que fueron sumergidos en una solución de Hanks y glucosa (90 µg/ml), la que fue trasvasada a un eppendorf para dejarla decantar. El sobrenadante fue retirado, y reemplazado por una solución conteniendo DMEM, tripsina 0.125X y glucosa (90 µg/ml). Se llevó a un baño térmico a 37°C durante 30 minutos. Para lograr una acción homogénea de la tripsina sobre todo el tejido, cada dos minutos se procedió a agitación. Luego se agregó 25 µl

de DNAsa (2mg/ml) manteniéndola en el baño térmico dejándola actuar por dos minutos. Se agregó 50% del volumen de SFB que inhibe la acción de la tripsina, centrifugando a 200g por 2 minutos. El sobrenadante resultante se descartó y reemplazó por una solución conteniendo Hanks, glucosa (90 µg/ml) y 25 µl de DNAsa (2mg/ml). Con la ayuda de una micropipeta, se disoció mecánicamente aún más el tejido. Se centrifugó 5 minutos a 200g y se retiró el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en medio de cultivo (DMEM, N₂, glutamina 2 mM y Penicilina/Streptomicina). El conteo del número de células se realizó en una cámara de Neubauer y se sembraron aproximadamente 30 millones de células por placa.

El medio de cultivo fue reemplazado al 50% de su volumen cada dos días. Las células fueron mantenidas en cultivo durante dos días previo a cualquier tratamiento.

IX. Tratamiento hipóxico en cultivo

Luego de dos días de cultivo, las placas sembradas fueron puestas en una cámara plástica herméticamente cerrada de aproximadamente 2.5 l de capacidad, dentro de un baño termostático mantenido a 37 °C. Los cultivos fueron sujetos a una atmósfera gaseosa de 0.5% de O₂ y 99.5% N₂ por 4 horas. La presencia de válvulas de retención permitieron el escape del gas acumulado, mientras se impedía la mezcla con aire atmosférico, lo que aseguró una atmósfera hipóxica constante. El hidróxido de calcio presente en la base de la cámara, absorbió el CO₂ formado durante el tratamiento. La concentración de O₂ fue monitoreada cada 30 minutos por medio de un oxímetro digital. Luego del tratamiento hipóxico, las placas fueron regresadas a condiciones normóxicas en la estufa de cultivo.

X. Cuantificación celular

Teniendo en cuenta la variabilidad que impone el desarrollo, realizamos las cuantificaciones en cortes de LO correspondientes a la región media de ambos ejes (rostro-caudal y dorso-ventral) para cortes histológicos y de puntos preestablecidos en las placas en el caso de cultivo. Cada unidad experimental surge de la media de al menos 10 imágenes independientes.

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) mediante una cámara CCD. Las cuantificaciones se realizaron utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

XI. Análisis estadístico

Los mismos se explicitan en los epígrafes de cada una de las figuras. Brevemente, para comparar tres o más grupos se realizaron estudios de ANOVA de una o dos vías en caso de ser dos los factores presentes. Las pruebas de Dunnet o Bonferroni a posteriori se realizaron para detectar significancias entre los grupos. Los supuestos de normalidad y homocedancia fueron comprobados.

La significancia estadística fue establecida para $p < 0.05$.

XII. Programas

Todos los análisis cuantitativos (incluidos los densitométricos) así como 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.

XIII. Anticuerpos e Insumos

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

Hoechst 33258 / Sigma, USA

Anticuerpo contra NGF maduro / Millipore, USA

Anticuerpo contra TrkA y P-TrkA / Cell Signaling, USA

Anticuerpo contra p75 / Millipore, USA

Anticuerpo contra caspasa-3 activa / Cell Signaling, USA

Anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP / Millipore, USA

Anticuerpo anti-conejo conjugado con Cy2 / Millipore, USA

Anticuerpo anti-conejo conjugado con biotina / Dako, USA

Anticuerpo contra Akt/Cell Signaling, USA

Anticuerpo contra p-Akt (Ser 473)/Cell Signaling, USA

Anticuerpo contra actina/Chemicon USA

3,3'- Diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) / Sigma, USA

Streptavidina/HRP / Sigma, USA

TUNEL/ Promega, USA

DMEM/F-12 /Invitrogen, USA

HANKs / Sigma, USA

N2 supplement /Invitrogen, USA

L- Glutamina / Gibco, USA

Tripsina 0.25% / Sigma, USA

Poly-L-lisina / Sigma, USA

Penicilina/streptomycin / Gibco, USA

Laminina / Invitrogen, USA

Glucosa / Sigma, USA

Suero fetal bovino / Natocor, Argentina

DNAsa 1 / Sigma, USA

NGF 2.5s / Millipore, USA

K252a / abcam, USA

RESULTADOS

In Vivo

I. Determinación de la segunda ola de MCP en el tectum óptico

Dado que éste período se caracteriza por la participación de las neurotrofinas como moléculas limitantes y por lo tanto claves en la supervivencia neuronal, realizamos la técnica de TUNEL sobre cortes histológicos de TO de embriones en diferentes estadios de desarrollo, desde DE12 a DE18 (resultados previos en nuestro laboratorio, habían demostrado que hasta el DE12, éste segundo período de muerte celular no se producía). Posteriormente se cuantificó y comparó el número de células marcadas. Los resultados mostraron un aumento significativo en la cantidad de neuronas en proceso de apoptosis entre los DE13 y DE16 con un pico máximo en DE15, y en una dirección antero-posterior del lóbulo óptico (Fig.1).

De esta manera, determinamos el DE15 como día de trabajo representativo de la muerte neurotrófica para los ensayos subsiguientes.

II. Determinación de la susceptibilidad de este período del desarrollo a la injuria hipóxica

Con el objetivo de determinar la existencia de vulnerabilidad al daño hipóxico durante éste período de desarrollo, se realizó la técnica de TUNEL sobre cortes histológicos en parafina de TO de animales controles y en diferentes tiempos de reoxigenación post-hipoxia (0, 2, 4, 6 y 9 horas). La cuantificación de células en proceso de muerte demostró susceptibilidad neuronal, al producirse un aumento de la misma casi en un 60% comparado con el Control. Este aumento significativo fue observado luego de 6 horas de reoxigenación (H₆, Fig.2).

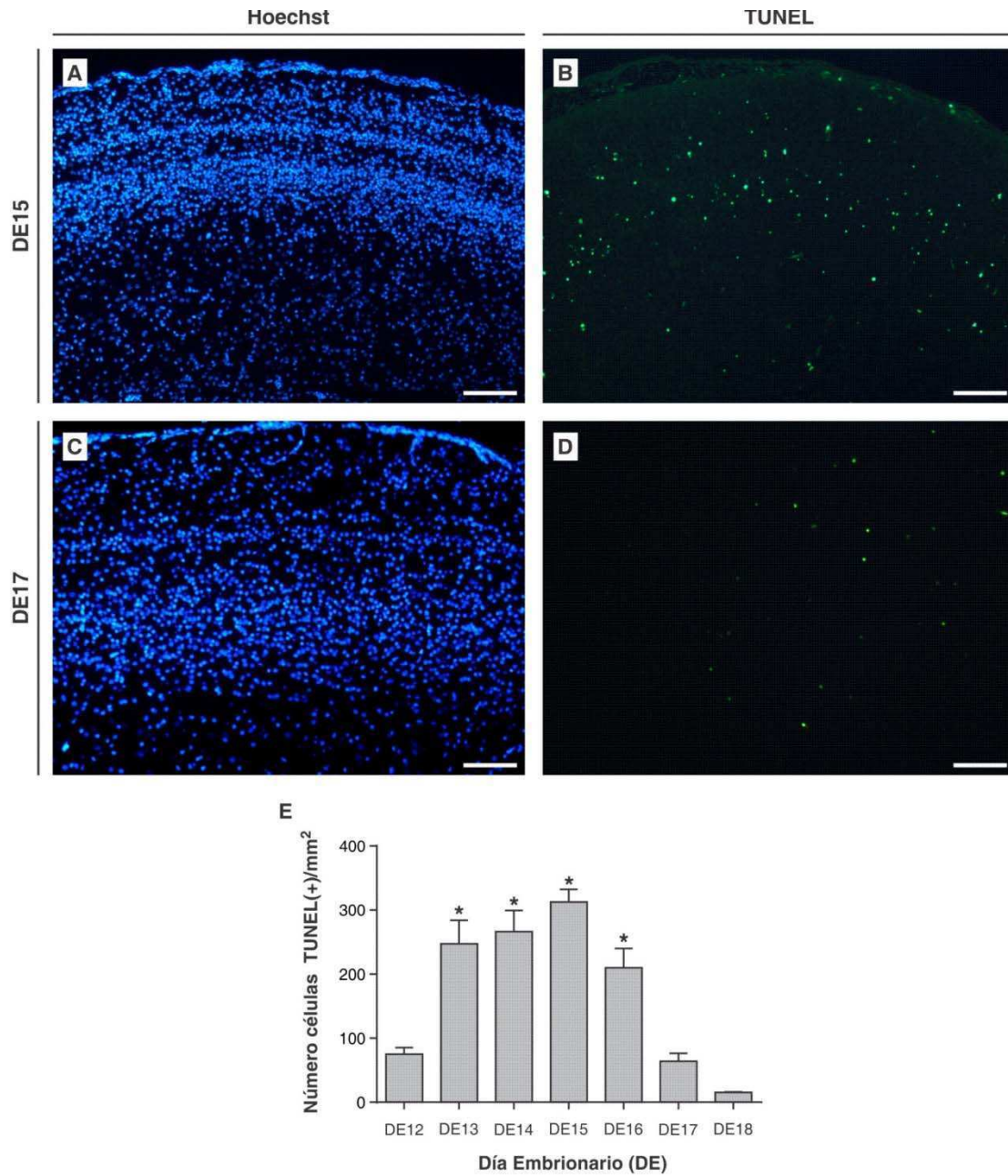


Fig.1- El segundo período de MCP ocurre cercano al DE15. Sobre cortes histológicos de TO provenientes de embriones de DE12 a DE15 se realizó tinción nuclear con Hoechst y la técnica de TUNEL. (A-D). Microfotografías mostrando los niveles de células TUNEL+ para DE15 y DE17. (E). Gráfico de barras para la cuantificación de células TUNEL +/mm² para cada DE. Los valores son expresados como la media \pm error estándar de la media (ESM) de cuatro experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnet, comparando cada DE con el DE12. Barra: 100 μ m. *, $p < 0.05$.

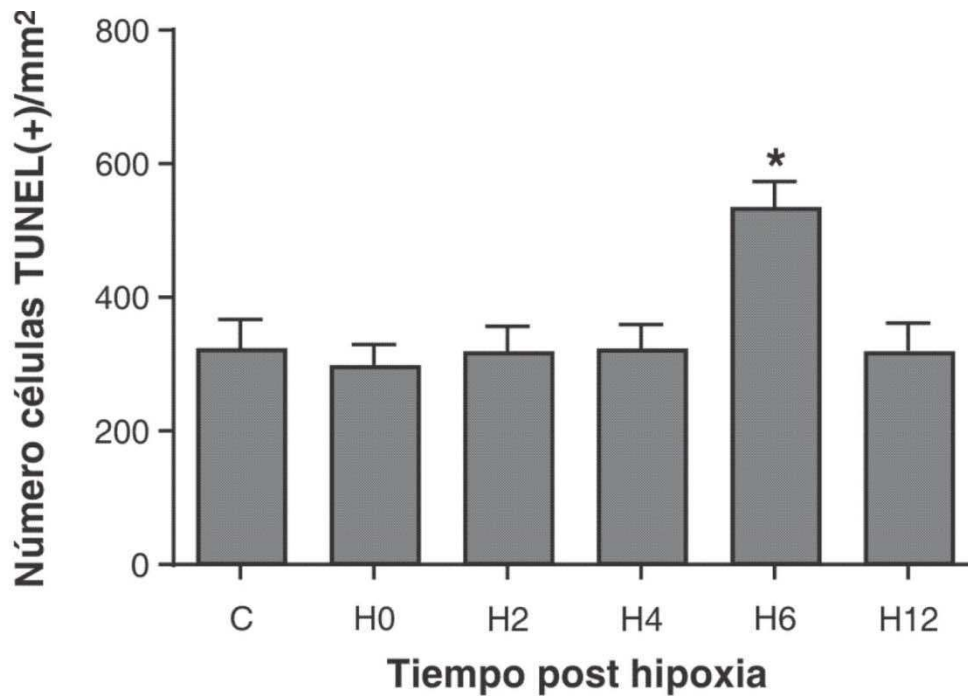


Fig.2- El tratamiento hipóxico *in vivo* incrementa la muerte celular a las 6 horas post-hipoxia. Embriones en DE15 fueron sujetos a hipoxia (8% O₂, 60 min) y devueltos a condiciones normóxicas en diferentes períodos de tiempo (0, 2, 4, 6 y 12 hs). Sobre éstos TO se realizó la técnica de TUNEL y se cuantificó la cantidad de células +/mm² para cada tiempo post-hipoxia. Un incremento significativo en la muerte celular fue observado a las 6 horas de reoxigenación, volviendo a valores controles luego. Los valores son expresados como la media ± el error estándar de la media de cuatro experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnet, comparando cada tiempo post-hipoxia con el tratamiento Control (normóxico). *, p<0.05.

III. Expresión de caspasa-3 activa luego del tratamiento hipóxico

La picnosis nuclear observada con Hoechst luego del daño hipóxico, constituye una evidencia morfológica de muerte celular, que en gran proporción es de tipo apoptótica (la caspasa-3 activa puede observarse en necrosis pero en células con evidente daño nuclear que no es lo que se observa con Hoechst). Para caracterizar aún más este proceso, la activación de caspasa-3 en respuesta a una hipoxia aguda sobre células del TO en DE15, fue evaluada por medio de la técnica de inmunofluorescencia en secciones

de TO tanto de embriones controles como a diferentes tiempos de reoxigenación (0, 2, 4, 6 y 9 horas).

Observamos un aumento significativo en la colocalización de núcleos apoptóticos y presencia de caspasa-3 activa, a las 6 horas de reoxigenación (Fig. 3) con respecto al grupo control, lo que estaría apoyando la teoría de la apoptosis como mecanismo de muerte celular prevalente a consecuencia de la hipoxia.

IV. Expresión y modulación de NGF, P-TrkA y p75 en respuesta a una Hipoxia

La presencia y disponibilidad de neurotrofinas caracteriza el segundo período de MCP en el desarrollo, dada su participación en procesos de supervivencia y mantenimiento neuronal. La expresión y modulación de NGF fue evaluada junto con la de sus receptores de membrana p75 y TrkA. En el caso de éste último, se consideró además los posibles cambios en su activación como consecuencia del daño hipóxico. Para ello realizamos una inmunohistoquímica para cada uno de los marcadores sobre cortes histológicos de lóbulo óptico en embriones en DE15 tanto controles como en diferentes tiempos de reoxigenación (0, 2, 4, 6 y 12 horas post-hipoxia, Fig.4). El anticuerpo utilizado para la detección de NGF, reconoce únicamente la forma madura de ésta neurotrofina. La cuantificación de las células marcadas con NGF mostró un aumento significativo en su expresión a partir de las 2 horas de finalizada la hipoxia, que se mantuvo a las 4 y 6 horas de reoxigenación, para volver luego a valores controles. La forma activa del receptor de NGF, P-TrkA, reveló una significativa disminución en su activación en el momento de finalizada la hipoxia (H_0), que se vio aumentada a partir de las dos horas de reoxigenación (para hacerse significativa a partir de las 4 horas), y volviendo a valores controles luego de dicho período. Para el receptor p75, se observó un aumento significativo entre las 2 y 4 horas de finalizado el daño, que regresa a valores controles a las 6 horas posteriores al tratamiento.

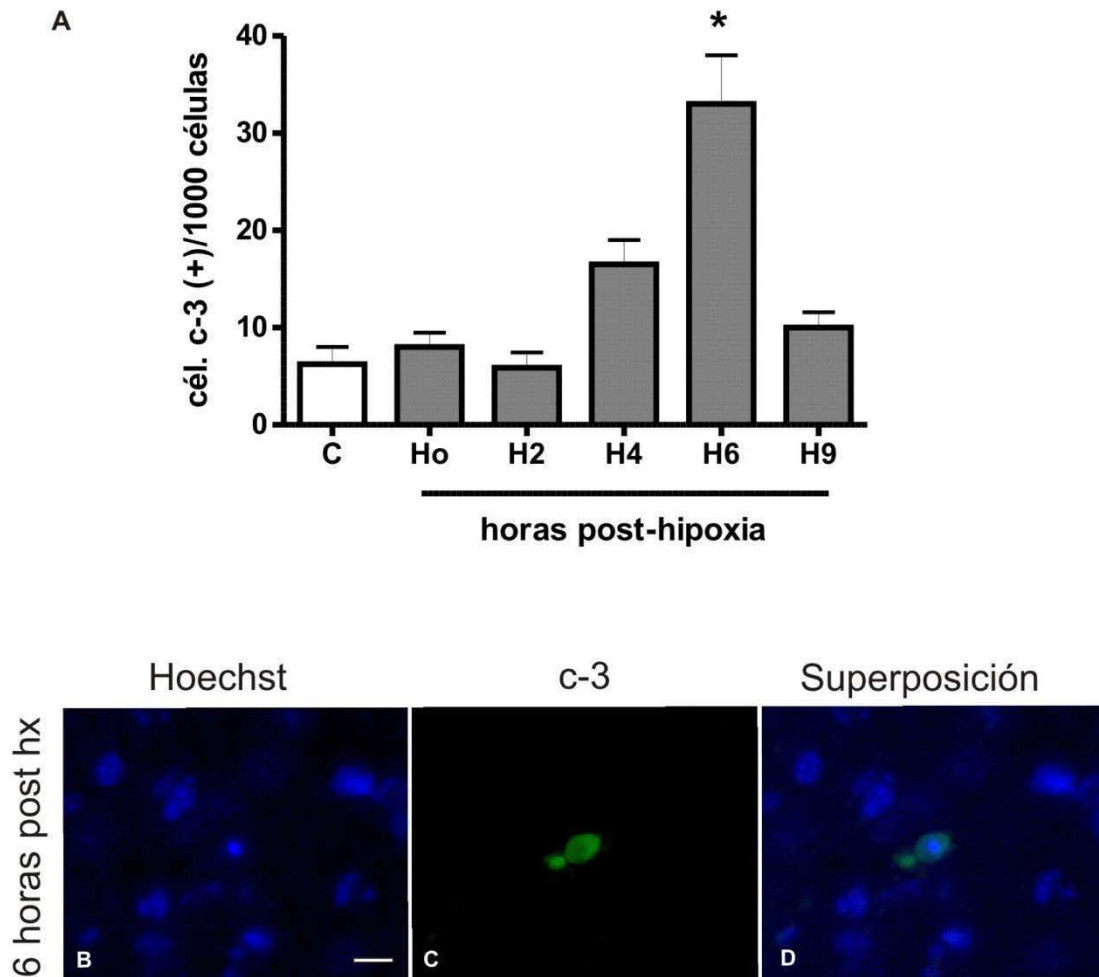


Fig.3- Expresión de caspasa 3 clivada luego del tratamiento hipóxico. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti caspasa 3 activa en cortes de TO de embriones en DE15 tanto controles como a distintos tiempos de reoxigenación, contrateñidos con Hoechst. A. Se produce un aumento significativo en la cantidad de células expresando caspasa 3 clivada únicamente luego de 6 horas de reoxigenación. Las barras representan el ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de 1 vía y test de Dunnet para cada tiempo seleccionado. *, $P < 0.05$. B, C y D. Microfotografías para 6 horas post-hipoxia en la que se observa la marca de caspasa activa y su colocalización con un núcleo apoptótico. Barra= 10 μ m.

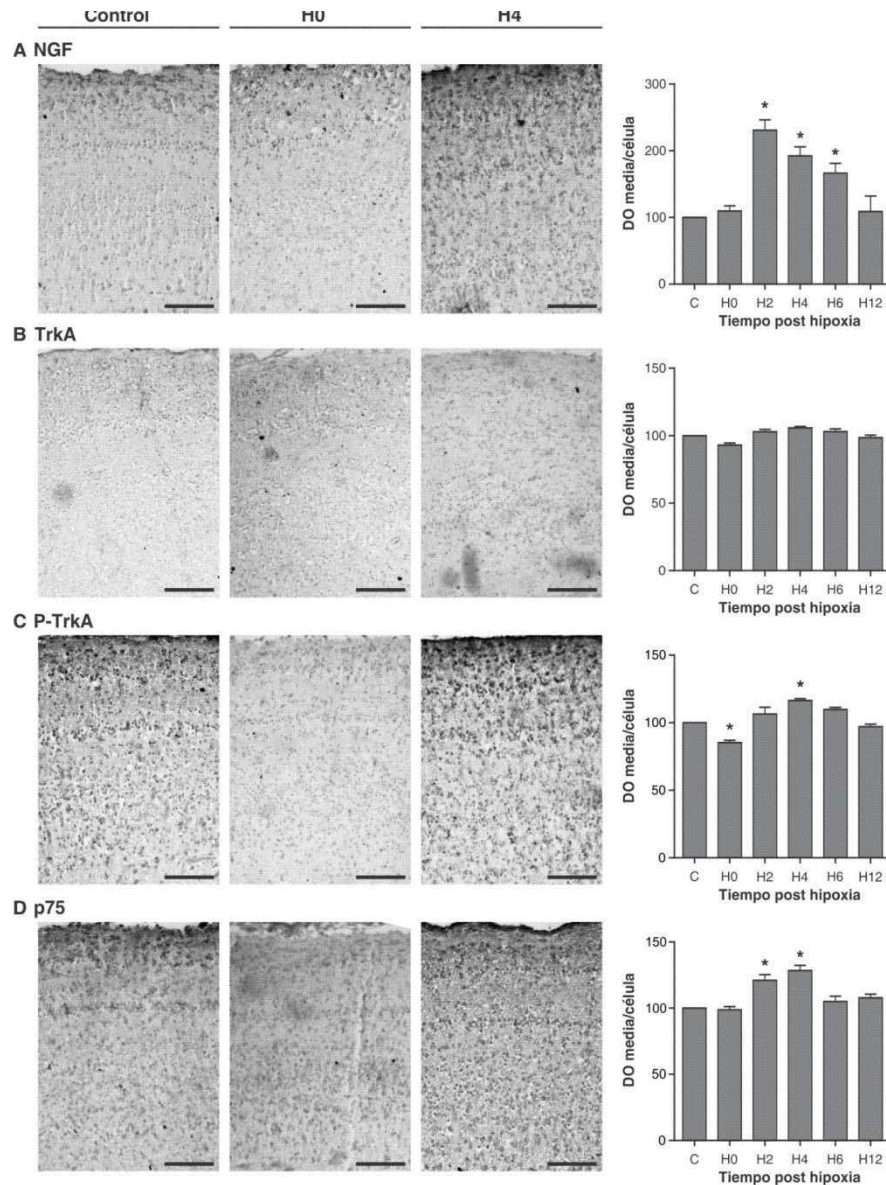


Fig.4- El tratamiento hipóxico *in vivo* produce el incremento en la expresión de NGF y p75, y la disminución en la activación de TrkA. Se realizó una inmunohistoquímica para NGF (A), TrkA total (B), p-TrkA (C) y p75 (D) sobre cortes histológicos de TO pertenecientes a embriones en DE15 tanto normóxicos como a diferentes tiempos post-hipoxia. Las microfotografías muestran la expresión de cada uno de los marcadores en normoxia (control), inmediatamente después de la hipoxia (H₀) y 4 horas posteriores a la misma (H₄). Los gráficos de barras muestran la densidad óptica media celular presente en cada tratamiento y para cada marcador normalizado a niveles normóxicos. La expresión de NGF se incrementó significativamente a las 2 horas post-hipoxia manteniéndose en estos niveles hasta las 6 horas (A). La expresión del receptor TrkA se mantuvo sin cambios significativos para los tiempos estudiados (B), mientras que su activación decreció inmediatamente después del tratamiento hipóxico, para aumentar a las 4 horas de reoxigenación (C). El receptor p75 mostró un incremento en su expresión a las 2 y 4 horas post-injuria (D). Los valores son expresados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnett. Barra: 100 μ m. *, $p < 0.05$.

De acuerdo a estos resultados, existe una modulación en la expresión de NGF como consecuencia de la hipoxia, que podría interpretarse como un intento de “rescate” por parte de la neurona ante la injuria que produce la disminución de oxígeno. La activación del receptor TrkA se ve afectada en el momento de finalización de la hipoxia, mientras que el receptor p75, permanece sin cambios en ese tiempo evaluado. Más adelante se discutirá las implicancias de éstos resultados.

V. Modulación de Akt en la MCHx

Dado el conocido rol de Akt en la supervivencia neuronal fisiológica y su participación en las vías de señalización que se inician con la activación de TrkA, evaluamos su posible activación tras un evento de hipoxia y el efecto que ello pueda producir en la muerte debido a esta injuria. Akt tiene acciones rápidas y no genómicas sobre la regulación de la integridad de la mitocondria, por lo que buscamos posibles variaciones en su activación en tiempos cortos post hipoxia: 0, 30 y 90 minutos de reoxigenación.

Los resultados obtenidos muestran que la activación de Akt disminuye en el momento de finalización de la hipoxia, volviendo rápidamente a valores controles (y sin superarlos) hasta los tiempos estudiados (Fig.5), indicando que en nuestro modelo, Akt no tendría una función de rescate por lo menos en tiempos cortos post daño.

Este resultado presenta coherencia con la disminución en la activación de TrkA presentada en el punto anterior; si se tiene en cuenta el papel regulador de P-TrkA sobre P-Akt, podría pensarse esta modulación como uno de los factores determinantes de la aparición de muerte celular observada luego de las 6 horas de reoxigenación, al producirse la disminución de dos moléculas claves en la activación de mecanismos de supervivencia celular.

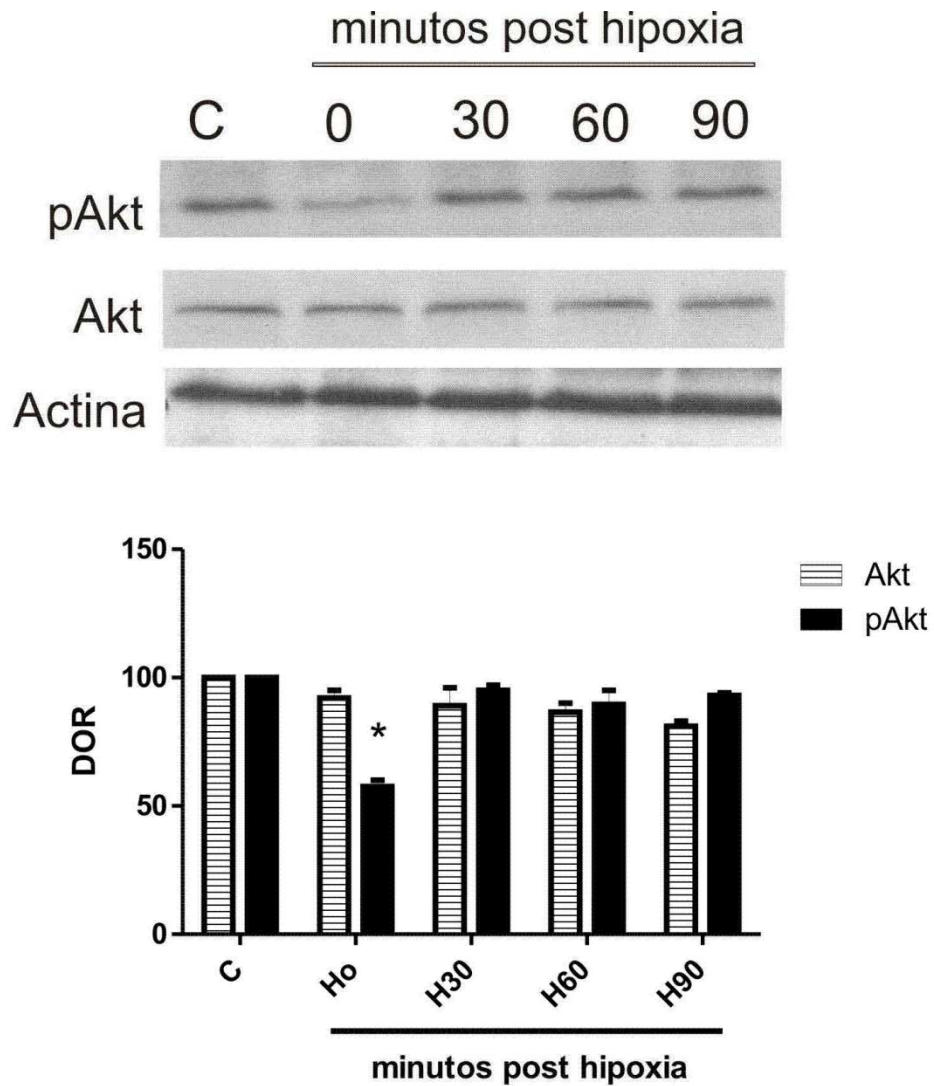


Fig.5- La activación de Akt disminuye durante la hipoxia. Sobre homogenatos totales de TO de embriones en DE15 tanto controles como a diferentes tiempos de reoxigenación (0, 30, 60 y 90 minutos), se realizó Western Blot. El revelado se realizó con anticuerpos para Akt total, fosforilado y actina. Las placas muestran los resultados para los anticuerpos y tiempos mencionados. El gráfico de barras muestra la cuantificación de la densidad óptica relativizada a su respectivo control para Akt y P-Akt. La expresión de Akt no varía significativamente en los tiempos estudiados, mientras que la de Akt activado disminuye en forma significativa en el momento de finalizada la hipoxia. Las barras representan la media + ESM de tres experimentos diferentes. Determinado con ANOVA de una vía independiente para Akt, P-Akt y actina. Post test de Dunnet comparando cada tratamiento con el control

In Vitro

VI. Puesta a punto de la técnica de cultivo neuronal primario. Seguimiento y caracterización de viabilidad celular.

A partir de embriones en día 15, fue puesta a punto la técnica de cultivo neuronal primario lo que nos permitió evaluar el efecto en las neuronas del TO de diversas drogas, tarea que se dificulta realizarla in vivo, dado que para el DE15, la barrera hematoencefálica ya está consolidada, y su aplicación en los vasos de la membrana corio-alantoidea no permite difundir dicha sustancia hacia el interior del sistema nervioso central.

Para poder determinar la ventana temporal en la que resultara conveniente la aplicación de los diversos tratamientos, cultivos neuronales primarios de animales controles fueron seguidos en el tiempo, observando cantidad, morfología y aspecto celular general a partir del primer día de cultivo. La adhesión de las células a la base de las placas de cultivo, se produjo al segundo día de siembra, día en el que también comienzan a establecer uniones entre ellas. Las observaciones realizadas mediante la coloración de núcleos con Hoechst, mostraron que las células mantuvieron su número promedio durante siete días a partir de ser sembradas, momento en el cual se produce un marcado cuello de botella, que reduce en forma drástica y significativa su número a la tercera parte aproximadamente con respecto a la cantidad inicial (Fig.6).

Para conocer el tipo celular sobre el cual se estaba trabajando, se realizó sobre cultivos primarios obtenidos a partir de embriones controles en día 15 del desarrollo, una inmunohistoquímica contra el marcador neuronal MAP-2. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que en el TO en desarrollo, el tipo celular predominante lo constituyen las neuronas hasta el DE14, día a partir del cual comienzan a aparecer astrocitos diferenciados en un gradiente ventral-dorsal (Pozo Devoto, 2006).

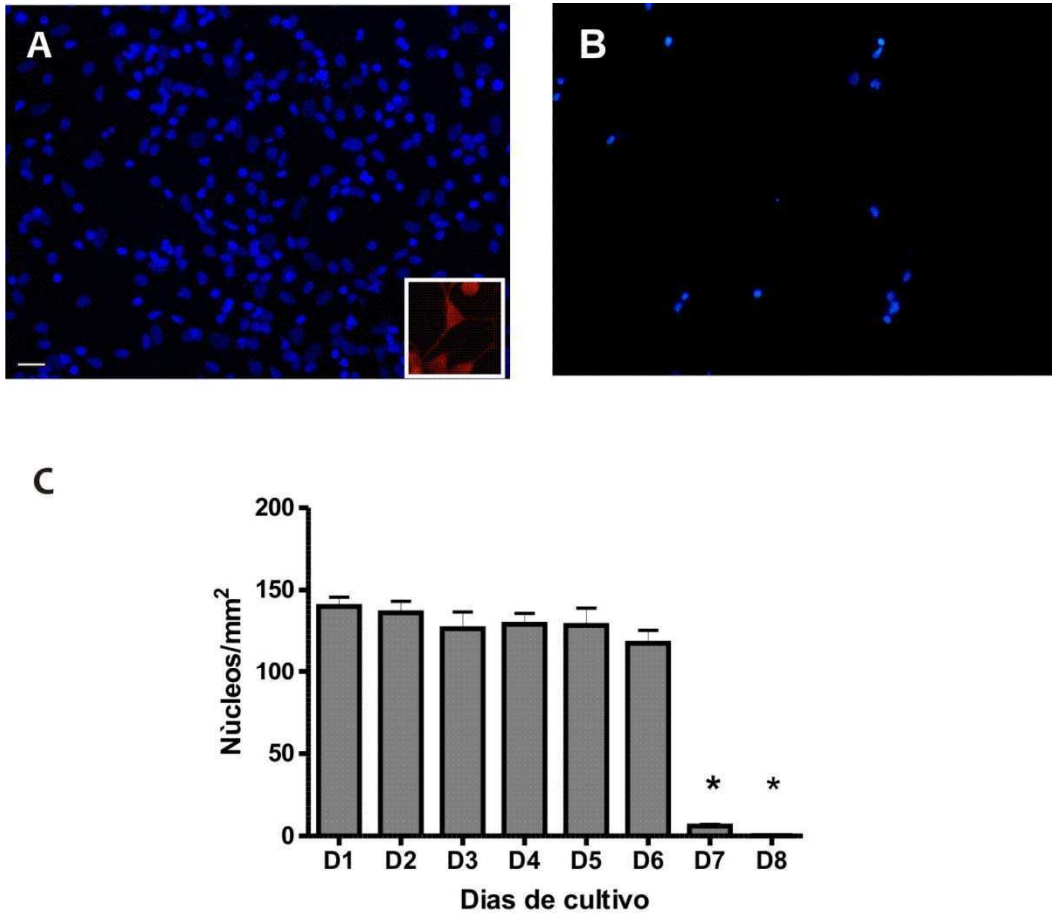


Fig.6- Viabilidad celular en cultivos neuronales primarios. El seguimiento a través del tiempo de la cantidad de células presentes en el cultivo, mostró una drástica y significativa reducción en su número a partir del día 7 de siembra, cercano al 70% (C). A, B. Tinción con Hoechst de núcleos celulares para el día 2 de cultivo (A) y 7 (B) en el que se observa la marcada diferencia cuantitativa. La inmuno histoquímica contra MAP-2 (inserto en A) mostró una abundante marca de ésta proteína, lo cual permite determinar a las neuronas como el tipo celular mayoritario en el cultivo primario. Los valores son expresados como la media \pm error estándar de la media (ESM) de cuatro experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnet, comparando cada día de cultivo con el día 1 (D1). Barra: 10 μ m. *, $p < 0.05$.

Teniendo en cuenta que el día embrionario seleccionado en este trabajo es muy cercano a este inicio y a la abundante expresión del marcador neuronal MAP-2 obtenido en los cultivos neuronales primarios, podemos sugerir que las neuronas son el tipo celular mayoritario involucrado, sin descartar una posible participación de precursores gliales.

VII. Determinación del requerimiento de NGF endógeno para la supervivencia neuronal en cultivo.

Con el objetivo de determinar el requerimiento por parte de las neuronas de NGF endógeno, cultivos neuronales de TO de animales controles fueron tratados con diferentes concentraciones de anticuerpo anti NGF en el medio de cultivo, durante 48 hs, con el objetivo de bloquear la acción de ésta neurotrofina (sintetizada y liberada al exterior en su forma madura) y observar su efecto (Fig.7). Para descartar un “efecto anticuerpo”, el cultivo control fue tratado con las mismas concentraciones de anticuerpo anti IgG. No se encontraron diferencias cuantitativas en los cultivos por la presencia de ésta inmunoglobulina.

De las cantidades de anticuerpo anti NGF utilizadas (0.2ug, 0.1ug y 0.05 ug), las dos mayores mostraron tener un efecto sobre el número de neuronas, disminuyendo su cantidad en forma significativa (cerca al 50%) luego de dos días de cultivo. A partir de estos resultados puede concluirse que el NGF constituye una molécula necesaria para la supervivencia neuronal durante ésta etapa del desarrollo, caracterizada por la presencia de neurotrofinas y competencia por su disponibilidad.

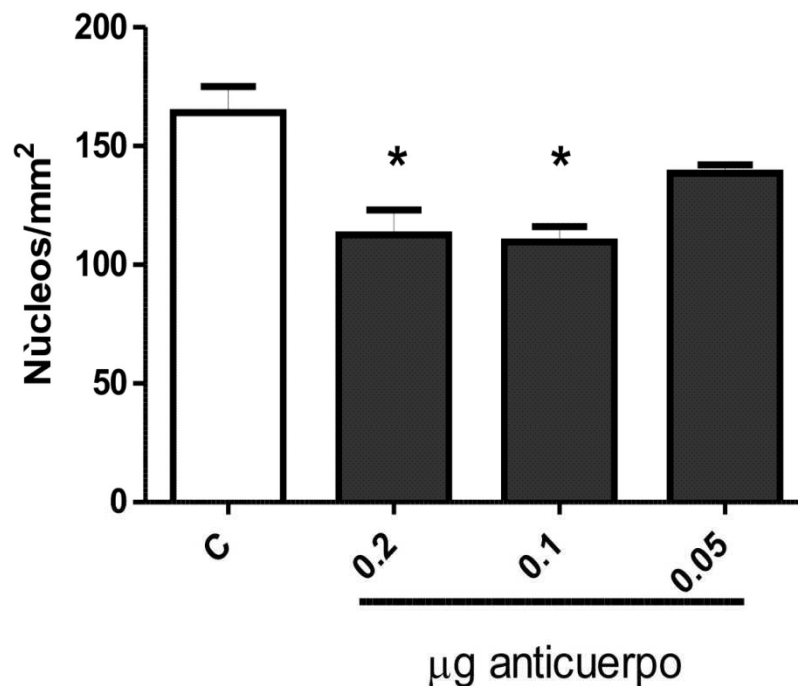


Fig.7- El NGF endógeno es requerido para la supervivencia celular de cultivos neuronales primarios. Cultivos neuronales provenientes de embriones controles en DE15 fueron tratados con diversas cantidades de anticuerpo anti NGF maduro con el objetivo de lograr su bloqueo en el medio extracelular donde es secretado. Se obtuvo una reducción estadísticamente significativa en la supervivencia neuronal para las dos cantidades mayores de anticuerpo (0.2 y 0.5 µg) . Los valores son expresados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnet, comparando las distintas cantidades de anti NGF con el tratamiento control.. *, $p < 0.05$.

VIII. Puesta a punto de la técnica de hipoxia en cultivo. Evaluación de la vulnerabilidad neuronal frente al daño hipóxico *in vitro*.

Dado que la hipoxia produjo una disminución significativa en el número de neuronas del tectum óptico *in vivo*, se buscó determinar si este mismo efecto se producía sobre neuronas en cultivo a partir de neuronas disociadas de lóbulo óptico de embriones de

pollo en día 15. De acuerdo a la bibliografía, las concentraciones de O₂ utilizadas en cultivos neuronales en general, se encuentran entre 0 y 1 % siendo los tiempos de permanencia de los cultivos en estas condiciones, muy variable también.

Se determinó que 4 horas de tratamiento hipóxico a una concentración de 0.5% de O₂, en una cámara diseñada especialmente para tal fin (que provee una atmósfera hipóxica normobárica y temperatura constante durante todo el tratamiento), produjeron una reducción significativa en el número de neuronas cuando se las comparaba con cultivos controles. Esta disminución, entre 55-70%, comenzó a ser significativa a partir de las 24 horas de reoxigenación (Fig.8). Para la cuantificación neuronal, los núcleos fueron teñidos con Hoechst y observados en microscopio de fluorescencia.

IX. Rol neuroprotector del NGF

Una vez validado el daño hipóxico en nuestro modelo *in vitro*, procedimos a evaluar si el NGF podía tener algún efecto protector ante éste tipo de daño sobre las neuronas en cultivo, evitando o disminuyendo la tasa de muerte celular observada en el punto anterior. Para ello se realizó una curva en la que fueron testeadas distintas concentraciones de NGF en el medio de cultivo (10, 50, 100 y 150 ng/ul) a diferentes tiempos pre-hipoxia (0, 30, 60 y 90 minutos) para evaluar luego los efectos cuantitativos del daño sobre los cultivos celulares. La menor concentración de NGF que presentó un efecto protector fue la de 50 ng/ul y el menor tiempo el de 30 minutos, combinación que fue elegida como parámetro de trabajo para evitar posibles efectos tóxicos o no deseados sobre las células. Se evaluó además si la presencia de NGF en el cultivo, más allá del tratamiento hipóxico, poseía un efecto sobre la cantidad de células en cultivo (“efecto NGF), hecho que fue descartado por lo menos para los tiempos estudiados.

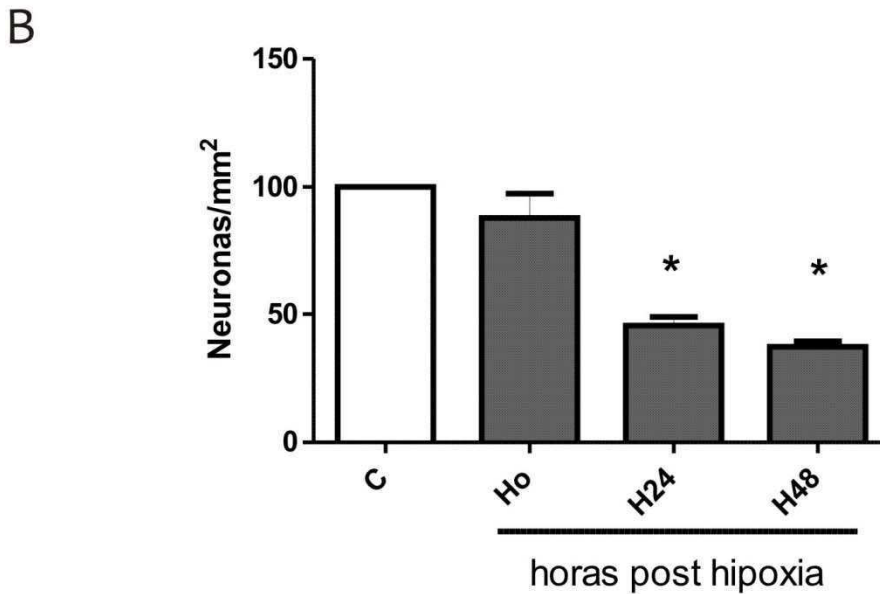
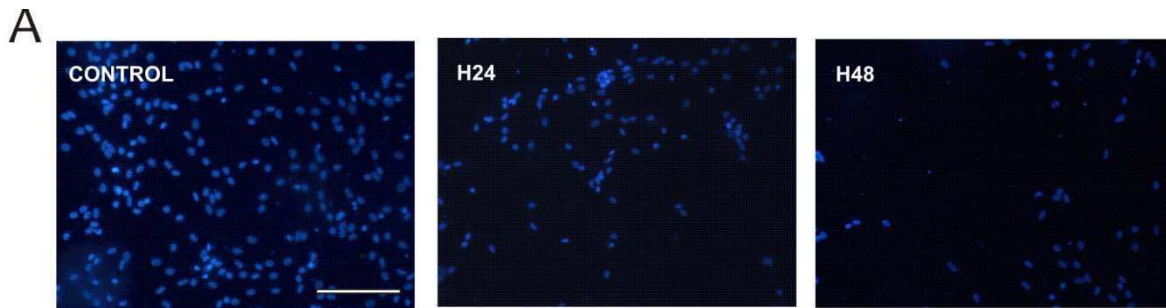


Fig.8- La hipoxia in vitro incrementa la muerte celular luego de 24 horas de finalizado el tratamiento hipóxico. Cultivos neuronales primarios provenientes de TO de embriones en DE15 fueron sujetos a hipoxia (0.5% O₂, 4hs) y retornados a condiciones normóxicas. A diferentes tiempos de reoxigenación se cuantificó el número de células. Microfotografías de cultivos neuronales para control, 24 y 48 horas post hipoxia (A). Los núcleos neuronales marcados con Hoechst fueron cuantificados y normalizados a 1 mm² para los diferentes tiempos estudiados (B). Un significativo decrecimiento en la densidad neuronal fue observado a partir de las 24 horas de reoxigenación. Los valores son expresados como la media ± el error estándar de la media (ESM) de cuatro experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnet. Barra: 100 μm. *, p<0.05.

Aquellos cultivos que fueron tratados con 50 ng/ml de NGF 30 minutos antes de iniciada la hipoxia, no mostraron disminución significativa en el número de neuronas a partir de las 24 horas de reoxigenación con respecto a los controles, como ocurrió en aquellos cultivos que recibieron tratamiento hipóxico únicamente (Fig.9), demostrando así el rol neuroprotector del NGF para esta población neuronal durante el período de desarrollo estudiado.

X. Activación del receptor de NGF, TrkA, en respuesta a la injuria hipóxica y a un evento de neuroprotección.

La activación y participación en el fenómeno de neuroprotección del receptor de NGF, TrkA, fue evaluada en cultivos neuronales primarios de lóbulos ópticos en DE15, mediante la técnica de inmunocitoquímica. Los tratamientos utilizados fueron controles, hipóxicos (fijados a las 0, 12, 24 y 48 horas de regresados a condiciones normóxicas) y pretratados con NGF en las “condiciones neuroprotectoras” determinadas anteriormente (50 ng/ul de NGF 30 minutos antes de iniciarse la hipoxia). La marca citoquímica de este receptor se caracterizó por su apariencia puntuada o granular, ubicada tanto en neuritas, como soma y núcleo neuronal (Fig.10). Los cultivos mostraron, en concordancia con los cortes histológicos presentados en el punto 4, una disminución significativa en la activación de este receptor (tomando como unidad a cuantificar, la cantidad de gránulos conteniendo receptor en cada célula) en el momento de finalizada la hipoxia (H_0) con respecto a las células no injuriadas, que es recuperada a partir de las 12 horas post hipoxia volviendo a valores controles a partir de las 24 horas. Sin embargo, esta disminución no se observa en aquellos cultivos tratados previamente con NGF, lo cual unido a valores de apoptosis similares a los controles a pesar de la hipoxia, sugerirían que el TrkA en su forma activa sería un elemento participante de la ruta de neuroprotección que se desencadena ante la presencia de NGF previo al comienzo de la hipoxia.

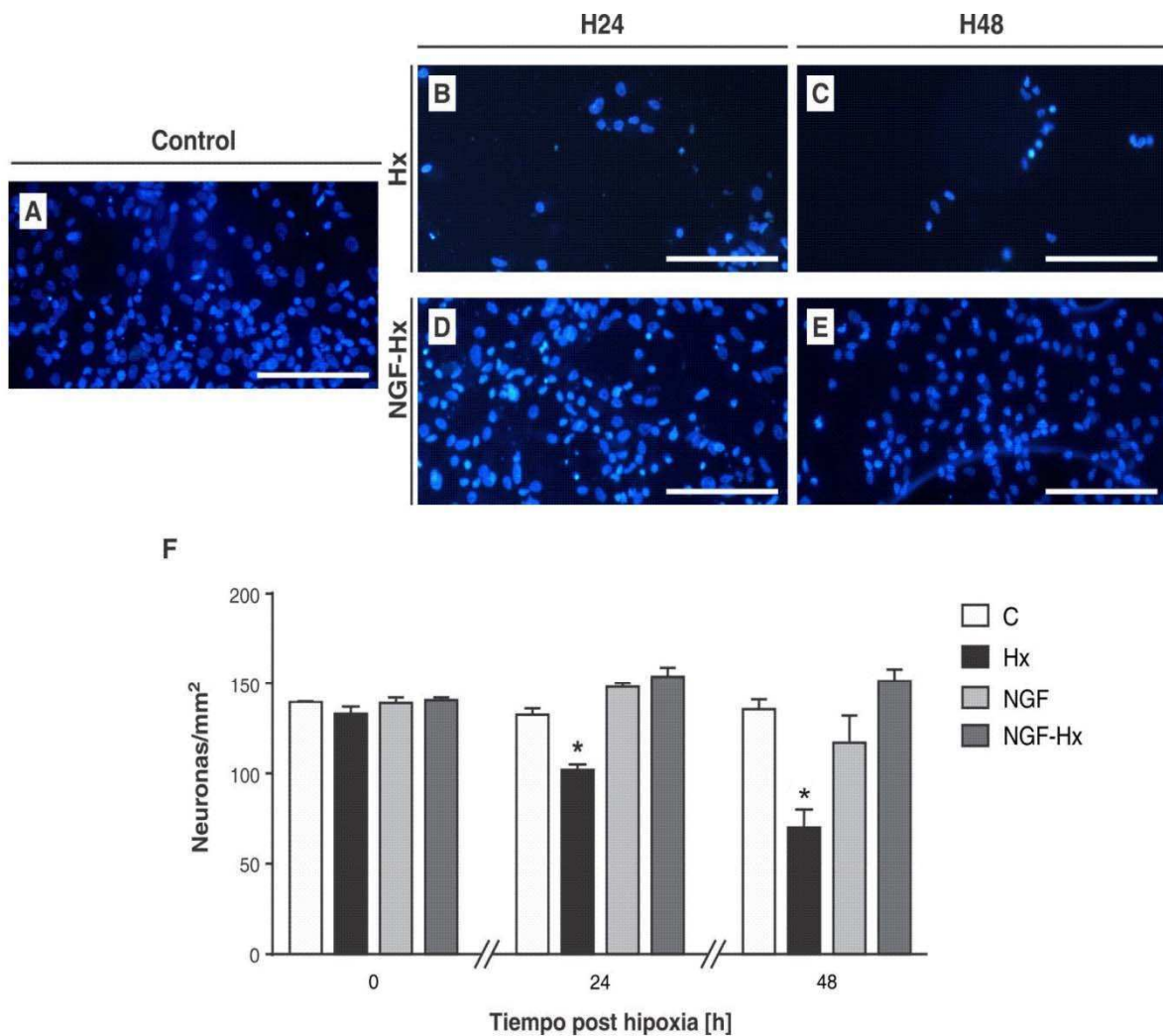


Fig.9- NGF produce un efecto neuroprotector frente a la muerte celular inducida por hipoxia. Cultivos neuronales primarios fueron sujetos a tratamiento hipóxico en presencia o ausencia de NGF (50 ng/ul, 30 min antes de la hipoxia). Microfotografías representativas de neuronas teñidas con Hoechst en las que se observa la densidad celular para cultivos controles (A), hipóxicos (B,C) e incubados previamente con NGF (D,E). La cuantificación de dicha densidad reveló que los cultivos tratados con NGF no son vulnerables a la hipoxia (F). Los valores son expresados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de post test de Dunnet comparando cada tratamiento con el Control. Barra: 100 μ m. *, $p < 0.05$.

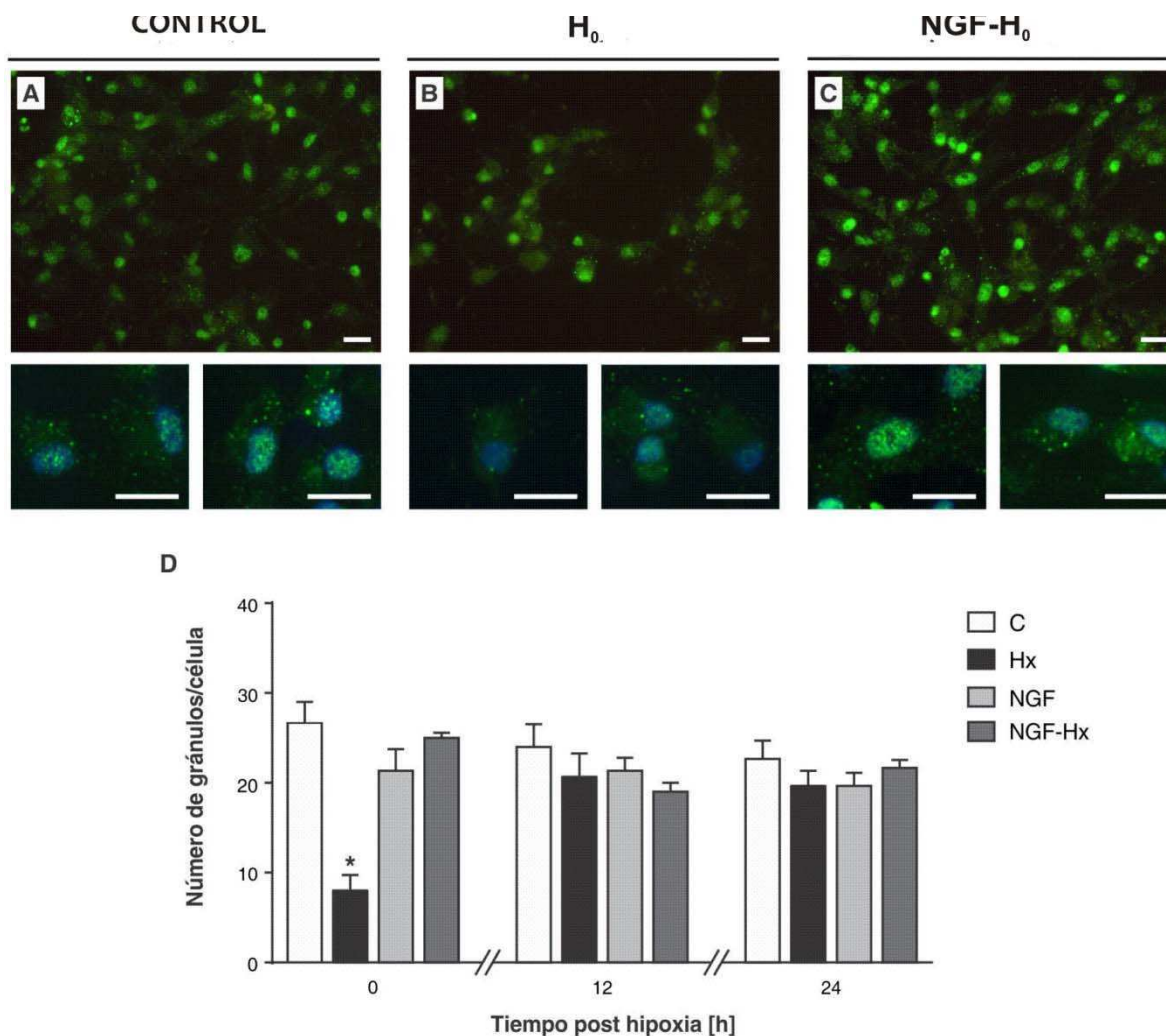


Fig.10- La disminución en la activación de TrkA debido a la hipoxia, es abolida por el NGF. Sobre cultivos neuronales primarios se realizó una inmunofluorescencia contra pTrkA en presencia o ausencia de NGF. Microfotografías mostrando una superposición de imágenes de tinción con Hoechst (núcleos azules) y gránulos marcados con pTrkA (verde) para cultivos normóxicos, hipóxicos e hipóxicos pre tratados con NGF (A,B,C). Para cada tratamiento fue cuantificado el número de gránulos por neurona a las 0, 12 y 24 horas post-hipoxia (D). La hipoxia disminuyó significativamente el número de gránulos inmediatamente después de la reoxigenación (H₀) retornando a valores controles después de las 12 horas. La presencia de NGF en el medio de cultivo, impidió dicha disminución en los gránulos de pTrkA(B vs C).). Los valores son expresados como la media ± el error estándar de la media (ESM) de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de dos vías seguido de post-test de Dunnet. Barra: 25 μm. *, p<0.05.

XI. Inhibición de la activación del receptor TrkA sobre el mecanismo de neuroprotección frente al daño hipóxico en cultivo.

Con el objetivo de evaluar una posible intervención del receptor de NGF en la neuroprotección, se procedió a inhibir la activación de TrkA y ver su efecto sobre la muerte neuronal por hipoxia. Para ello se utilizó el inhibidor específico k252a a concentraciones que fueron entre los 50 y 500 nM. Se realizó tinción de núcleos mediante coloración con Hoechst con el fin de determinar el número de neuronas luego del tratamiento hipóxico. Las tres concentraciones más altas de inhibidor mostraron un efecto de anulación de la neuroprotección ejercida por el NGF a las 24 horas post hipoxia, ya que dichos cultivos presentaron valores de muerte celular, similares a los que solo recibieron hipoxia (Fig11). Paralelamente se realizó sobre los cultivos una inmunocitoquímica contra P-TrkA con el fin de evaluar si la activación de dicho receptor se vio afectada por la presencia del inhibidor que se encontraba en el medio de cultivo. Aquellas concentraciones de inhibidor que produjeron una disminución en la cantidad de neuronas luego de la hipoxia a pesar de la presencia de NGF, produjeron en estas mismas condiciones, una disminución significativa en la activación del receptor TrkA.

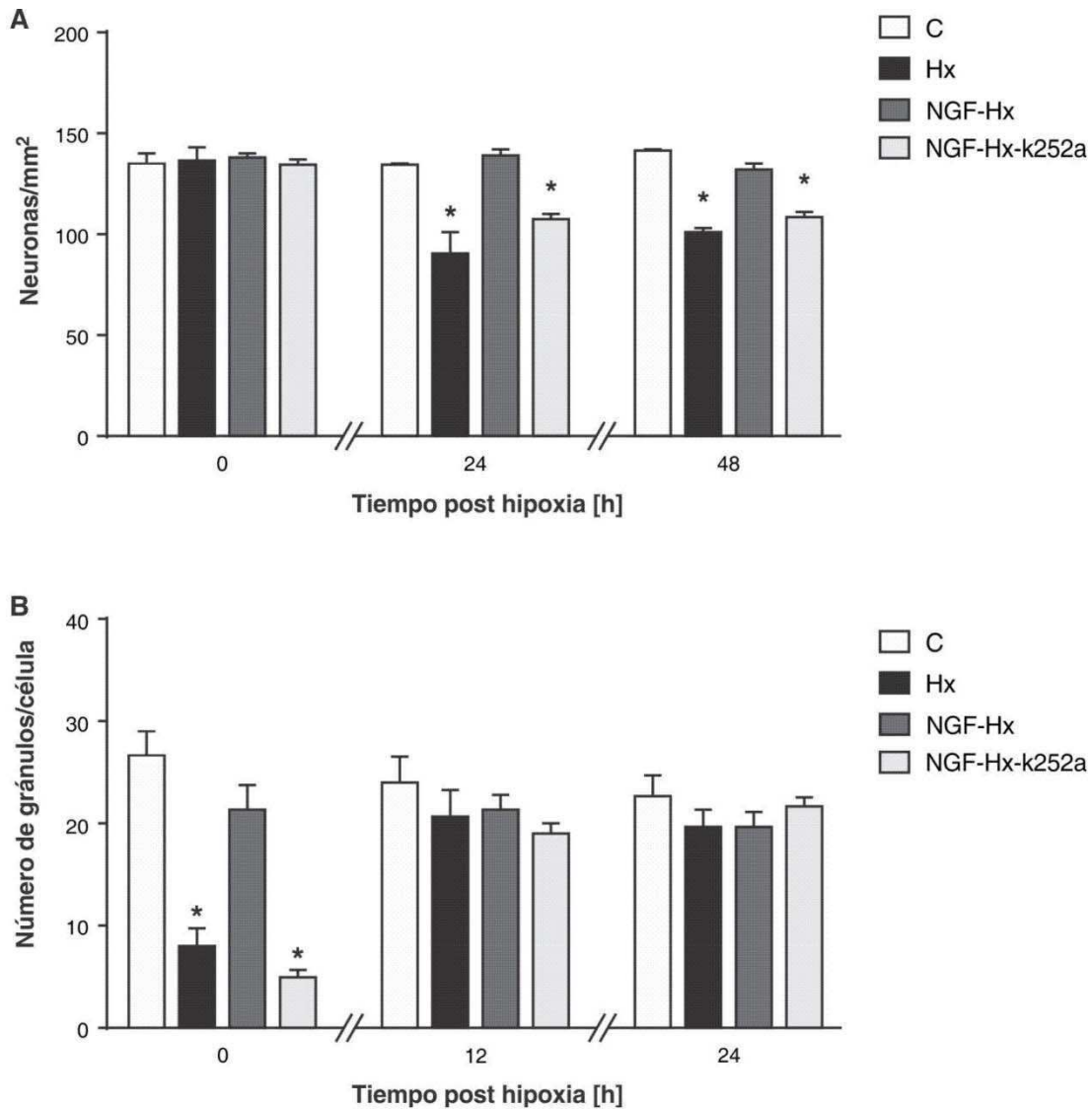


Fig.11- La acción del inhibidor k252a sobre la activación de TrkA, neutraliza el efecto neuroprotector del NGF. Cultivos neuronales primarios fueron sujetos a hipoxia e incubados con NGF o NGF y k252a (100 nm), un inhibidor específico de la fosforiación de TrkA. **A.** Ensayo de supervivencia: mediante tinción con Hoechst, se cuantificó la densidad celular. La disminución en la supervivencia neuronal a consecuencia de la hipoxia (24 y 48 hs de reoxigenación), fue contrarrestada cuando el NGF se agregó al medio, pero la adición de k252a abolió el efecto neuroprotector, conduciendo a valores similares a los del tratamiento hipóxico. **B.** Efecto sobre la activación del receptor TrkA. Mediante una inmunofluorescencia contra la forma activa de TrkA, se cuantificó la cantidad de gránulos/neurona en los tiempos 0, 12 y 24 horas post-hipoxia. La disminución en la cantidad de gránulos conteniendo la forma activa del receptor que se produce al finalizar el tratamiento hipóxico, es contrarrestada por la presencia de NGF, pero la adición de k252a al medio de cultivo, vuelve dichos valores similares a los obtenidos durante la hipoxia. Los valores son expresados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de dos vías seguido de post-test de Dunnett *, $p < 0.05$.

DISCUSSION

I. MCP del desarrollo en el TO

El TO como la mayoría de las estructuras nerviosas en desarrollo, se halla sujeto a períodos u “oleadas” de MCP: la primera de ellas es cercana al DE7 (Zhang y Galileo, 1998), y ocurre sobre neuroblastos y células postmitóticas jóvenes. La segunda, es dependiente de neurotrofinas, lo cual ha sido descrito en una variedad de especies (Jacobson et al., 1997).

En el presente trabajo hemos descrito el curso de la Muerte Celular que caracteriza al Desarrollo en el TO de embriones de pollo en estadios avanzados, completando la caracterización de la dinámica de uno de los procesos que controla el número de células final al momento de la eclosión.

II. Muerte celular hipóxica en el TO en desarrollo

Nuestro modelo de hipoxia representa uno de los componentes de la isquemia, la disminución en la concentración de O₂ en los tejidos. En este sentido, los daños generados por la hipoxia corresponden exclusivamente a esta disminución, y si bien el modelo hipóxico es reduccionista, es más transparente a la hora de reconocer las causas de daño.

Nuestros resultados muestran que existe vulnerabilidad por parte de las neuronas del tectum óptico al tratamiento hipóxico agudo durante esta etapa del desarrollo.

Una característica de la muerte hipóxica observada en nuestro modelo, es el poco tiempo en el que aparece manifestación de la misma una vez finalizado el daño, y el escaso tiempo en el que se mantiene esta manifestación. No se observa muerte celular hipóxica hasta las 6 horas, y a las 9 horas de reoxigenación las tasas de muerte están reestablecidas a valores del desarrollo. Esta rapidez en la manifestación de muerte celular por hipoxia puede deberse a que los mecanismos de muerte se encuentran en un grado de disponibilidad más alto por tratarse de individuos en desarrollo.

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.

La muerte celular observada en animales controles (muerte natural del desarrollo) y la que resulta del daño hipóxico (muerte hipóxica), comparten la presencia de condensaciones nucleares (observado mediante coloración con Hoechst) y marca TUNEL positiva. La abundante expresión de caspasa-3 activa en el momento en el que se produce el desmantelamiento nuclear (H_6), nos habla de ésta proteína como participante en la ejecución de la muerte observada. Estos resultados son coherentes con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio para el DE12 en los que se observó activación de citocromo-c a las 4 horas post-hipoxia y de caspasa-3 a las 6 horas, existiendo una correlación temporal entre la activación de los indicadores de muerte y el momento de mayor expresión de MCP (es decir, una sucesión temporal entre la liberación de citocromo c, la activación de caspasa-3 y la fragmentación del ADN) (Pozo Devoto et al 2008).

Todos estos elementos nos permiten hablar de apoptosis como mecanismo altamente probable de muerte celular programada, tanto para la muerte neuronal del desarrollo, como la muerte por hipoxia. Podría pensarse un umbral a partir del cual las células mueren, determinado por un equilibrio en la relación supervivencia/muerte. La presencia de ciertos factores (como la hipoxia), desequilibrarían el sistema, disminuyendo temporalmente ese umbral, y conduciendo a las células a una muerte mayor (Pozo Devoto V.M., 2012).

III. NGF y viabilidad neuronal

El efecto negativo sobre la supervivencia neuronal en cultivo que produjo el bloqueo de NGF mediante el uso de anticuerpo, proveyó evidencia acerca de la participación en nuestro modelo del NGF como molécula clave en la viabilidad celular. Existe amplia bibliografía en la que éste efecto se repite y en la que se da cuenta además de los

daños morfológicos y fisiológicos que la ausencia de NGF produce sobre diversas zonas del cerebro en desarrollo y adulto (Nabeshima et al, 1991; Ruit et al., 1992; Van der Zee et al, 1995; Nitta et al, 1997).

IV. NGF y sus receptores tras un evento hipóxico

Como se mencionaba anteriormente en otra sección, si bien el NGF se expresa desde etapas tempranas en la ontogenia del embrión de aves con funciones no esclarecidas del todo y con funciones relacionadas con mantenimiento y supervivencia neuronal en estadíos más avanzados del desarrollo, la menor proporción de su forma madura en relación con sus abundantes pro formas, hace de su cuantificación, un problema a la hora de la elección de la técnica utilizada. Por medio de la inmunohistoquímica se reveló un aumento en los niveles de NGF dos horas después de finalizada la injuria. Esta tendencia se mantiene dentro de los tiempos evaluados, hasta las 6 horas para retornar luego a valores de expresión similares a los controles. Si bien existen en la literatura resultados que demuestran una disminución en los niveles de NGF y de su mensajero en cerebro post natal luego de una injuria (Popic et al., 2012), en la mayoría de los modelos estudiados, su expresión aumenta tanto a nivel de proteína como de ARN. Este hecho ha sido reportado para tejido nervioso y no nervioso. En el primer caso podemos mencionar aumento en los niveles de NGF y su mensajero en lesiones hipocampales (Gasser et al., 1986), decorticación bilateral (Lorez et al., 1988), hipoxia cerebral (Lorez et al., 1989) y regeneración de nervio vago post axotomía (Lee et al., 2001), todo ello en rata. En tejido no nervioso se reportan aumentos en el proceso de reinervación del área dañada por injuria miocárdica en modelo murino (Oh et al., 2006), luego del daño por cirugía corneal refractiva en conejos (Wu et al., 2009), etc., por citar sólo algunos ejemplos. Las referencias para modelos de aves son escasas, particularmente durante el desarrollo (Sliwinska-Kowalska et al., 2005). Lo mencionado anteriormente junto con nuestros resultados, nos llevan a reforzar la

hipótesis por la cual consideramos el aumento en la expresión del NGF como una estrategia de protección de los tejidos que responden a diversas formas de daño, en este caso, la hipoxia.

Qué ocurre con TrkA? La inmunomarca del receptor P-TrkA fue visualizada en forma de pequeñas vesículas tanto en citoplasma como neuritas y núcleo. Si bien la nuclear no pareciera en un principio ser la localización esperada para un receptor de membrana (del cual se conoce muy bien su internalización endocítica y posterior degradación dentro de lisosomas o su reciclaje hacia la membrana plasmática), se conoce desde hace algunos años que puede encontrarse tanto en núcleo como en mitocondrias, donde constituyen elementos de señalización con la superficie celular (Carpenter et al., 2009). Se especula que en el núcleo tendrían función en la regulación de la expresión génica, transporte de moléculas y hasta actividad de topoisomerasa (Carpenter, 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que tanto *in vivo* como *in vitro*, se produjo una disminución en la activación de TrkA en el momento en el que finalizó la hipoxia. La disminución en la expresión de éste receptor y su relación con la pérdida o disfunción neuronal luego del daño, es encontrada en diversos trabajos y para otros modelos de estudio. La expresión del ARNm de TrkA (y del resto de los Trk's) se vio afectada, por ejemplo, en un modelo de contusión medular en ratas, en el que se produjo una disminución inmediata de la transcripción de estos receptores. Los autores sugieren que esta menor expresión se correlacionaría con la pérdida neuronal progresiva, observada en la zona y los alrededores del daño (Liebl et al., 2001). Se ha relacionado también la pérdida de TrkA en ratones knock outs condicionales para esta proteína, con la disfunción de neuronas colinérgicas de cerebro anterior y con una declinación en sus capacidades cognitivas, características fisiológicas que se encuentran en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Sánchez-Ortiz et al., 2012;). Nuestros resultados mostraron que como consecuencia de la hipoxia, se produjeron cambios en la activación (fosforilación) de TrkA, pero no en su expresión total, lo que

contribuye a comprender algo más de la vía de supervivencia que éste receptor inicia, ya que la mayoría de los trabajos se refiere a la modulación en su expresión y no a los posibles cambios en su activación como consecuencia del daño.

Dado que la señalización por parte de este receptor es crítica para la regulación de mecanismos como supervivencia, diferenciación y procesos sinápticos, interpretamos la disminución en su fosforilación como un factor crucial en la muerte neuronal que se produce luego de la hipoxia, y el aumento en su activación que se observa más tarde *in vivo* (a las 4 horas de reoxigenación), como una estrategia de protección o rescate celular que acompaña el aumento en la expresión del ligando NGF. La disminución en la fosforilación de TrkA podría estar relacionada con un desequilibrio entre las proteínas encargadas del dinámico proceso de fosforilación y desfosforilación (tirosina kinasas y tirosinas fosfatasas respectivamente), ya que el daño celular (en este caso la hipoxia), altera dicho equilibrio (Pei et al., 2000; Hwang et al., 2006). En nuestro laboratorio se han obtenido resultados que relacionan hipoxia con disminución generalizada de fosfotirosinas, lo cual acompañaría las observaciones antes mencionadas.

En un modelo de neuronas simpáticas de rata en cultivo, se ha identificado una proteína reguladora de la desfosforilación de P-TrkA, demostrando que cuando éste receptor se halla sostenidamente desfosforilado (y por lo tanto inactivo), se produce la disminución en la sobrevivencia de las neuronas, aún en presencia de NGF (Marsh et al., 2003).

Con respecto al receptor p75, su expresión luego del tratamiento hipóxico reveló valores similares al control apenas finalizada la hipoxia. Como se mencionaba anteriormente en este trabajo, las vías desencadenadas y los efectos fisiológicos que se ponen en marcha a partir de los receptores de neurotrofinas, dependen del contexto celular en el que éstos se encuentran. P75 promueve vías de supervivencia cuando se coexpresa con TrkA. De acuerdo a nuestros resultados, en el momento en el que la hipoxia finaliza, su expresión no se ve modificada con respecto al control,

mientras que su “contraparte” TrkA se encuentra significativamente disminuído en su activación, con lo cual actuaría como un factor promotor de la muerte celular que se observa horas más tarde. Si bien existe un aumento en la activación de TrkA posterior a Ho, ésta se produce a partir de las 4 horas de reoxigenación, cuando la activación de las rutas moleculares que conducen a la muerte celular, es irreversible.

V. Rol de Akt en la MCHx

La vía de señalización PI3k/Akt tiene un rol preponderante en la supervivencia neuronal fisiológica (Hetman et al; 1999). Los niveles de P-Akt se ven incrementados en diversos modelos de hipoxia/isquemia transitoria junto con el de células TUNEL positivas (Ouyang et al; 1999). Si se aplica un inhibidor de PI3K, los niveles de P-Akt permanecen estables y el número de células en apoptosis se ve incrementado (Kamada et al; 1997). Estos resultados darían cuenta de una actividad de “rescate celular” por parte del Akt. Sin embargo, existe gran cantidad de resultados que demuestran en cambio una disminución de P-Akt como consecuencia de diversos tipos de daño (tratamientos con glucocorticoides, toxinas, pro-oxidantes, daño nervioso, isquemia, etc) y el consecuente incremento de la muerte apoptótica (Poulsen et al., 2011; Spencer et al., 2003; Pasciu et al., 2009; Homma et al., 2007). Nuestros resultados luego de una hipoxia, concuerdan con estos últimos datos, ya que se observó una disminución en la expresión de P-Akt en el momento de finalizada la hipoxia (Ho) que se reestablece a valores controles a los 30 minutos de reoxigenación. Según lo observado, la respuesta de rescate del Akt no sólo está ausente sino que este hecho pareciera estar involucrado en la muerte hipóxica que se produce luego, en el sentido que su “apagado” transitorio conduciría a desbalances que activarían vías apoptóticas. Existe un estudio en múltiples sistemas celulares *in vitro* que describe que la sola desactivación de Akt es suficiente como para causar muerte celular (Luo et al, 2003).

Estos resultados disímiles encontrados en la literatura pueden ser consecuencia de diferencias regionales en la expresión/activación de Akt, no sólo entre modelos, sino dentro de un individuo (núcleo y periferia de una región isquémica, por ejemplo). La fosforilación de Akt podría depender ampliamente de la severidad del daño, lo que originaría diferencias en el perfil de P-Akt. (Noshita, 2001).

VI. NGF como molécula neuroprotectora del daño hipóxico

El agregado de NGF al medio de cultivo media hora antes de iniciada la hipoxia, impidió el aumento en la muerte neuronal asociada a la misma, confirmando para nuestro modelo, el rol neuroprotector de esta neurotrofina. Ya que observamos que en estas condiciones se produjo además la abolición de la caída en la fosforilación de TrkA en el punto Ho, hipotetizamos que dentro de los factores que convierten al NGF en una molécula neuroprotectora, la activación y desactivación de este receptor, constituye una pieza inicial clave.

Cuando este receptor fue inhibido en su fosforilación mediante el uso de k252a, los efectos en la supervivencia neuronal fueron similares a los producidos por la hipoxia.

Estos resultados, refuerzan nuestra hipótesis planteada sobre el papel del P-TrkA como molécula iniciadora clave del fenómeno de neuroprotección, y al momento de finalización de la hipoxia, como un período de susceptibilidad y regulación en el que el balance y estado de receptores, serían críticos en el destino de las células que sufren daño por hipoxia.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman el rol neuroprotector de NGF en el SNC en desarrollo, proceso que presenta como condición necesaria la activación de su receptor TrkA.

La hipoxia-isquemia perinatal es una de las causas más importantes de daño cerebral dadas las graves consecuencias sobre el desarrollo posterior, tanto cognitivo como motor. Teniendo en cuenta que el cerebro inmaduro es más vulnerable que el adulto a

eventos de hipoxia-isquemia (por su mayor requerimiento de O₂, susceptibilidad a hemorragia peri e intra ventricular, menor cantidad de mielina, entre otros), es necesario enfocarse en el período inmediato al evento hipóxico-isquémico donde las estrategias terapéuticas son más eficaces en reducir el daño cerebral posterior. Éste período es corto y puede variar entre las 2 y 6 horas (Celador, 2013).

La investigación en el estudio sobre injuria cerebral hipóxica-isquémica en períodos pre y perinatales continúa desarrollándose debido a la necesidad de mejora de puntos tanto prácticos como de conocimiento teórico en la búsqueda de estrategias terapéuticas. Es por ello que el estudio de las vías de neuroprotección, sus moléculas participantes y mecanismos de acción representan puntos claves en la búsqueda de la disminución o atenuación de las consecuencias que genera la disminución aguda de oxígeno sobre el tejido nervioso en desarrollo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de la presente Tesis demuestran que el Tectum Óptico de embriones de pollo durante el período comprendido entre los días 13 y 16 del desarrollo, es vulnerable a una hipoxia aguda, produciéndose una significativa muerte neuronal luego de las seis horas de reoxigenación. Ésta ventana temporal se caracteriza por la participación y rol clave de los factores neurotróficos (de ahí que esta segunda oleada de MCP se la conozca como “muerte neurotrófica”) en procesos de supervivencia y mantenimiento celular, entre otros.

Durante este fenómeno, la caspasa- 3 actúa como molécula ejecutora participante en el desmantelamiento nuclear.

El aumento en la expresión de NGF como resultado de esta injuria, es interpretado como una estrategia de rescate por parte de la célula en respuesta al daño recibido.

La injuria hipóxica produce una disminución de la fosforilación de su receptor TrkA. Éste hecho sumado a la no modificación en la expresión de p75 mientras su “contraparte” se encuentra afectado en su activación, son considerados claves en la puesta en marcha de vías de muerte celular programada que es observada a las 6 horas post hipoxia. Esta activación de rutas apoptóticas se vería favorecida además por el “apagado” temporal en la expresión de P-Akt al finalizar la hipoxia y al hecho de que su recuperación posterior no sobrepasa los valores controles.

Confirmamos también para nuestro modelo, el rol neuroprotector del NGF sobre neuronas sometidas a hipoxia. Éstas mantuvieron su número a pesar del daño y se produjo la anulación en la disminución de la activación de TrkA.

El inhibidor específico de la fosforilación de TrkA no permitió al NGF ejercer su papel neuroprotector, lo cual unido a los resultados antes mencionados, posicionan al receptor TrkA como una molécula clave en en la activación de rutas de señalización de supervivencia celular y en el fenómeno de neuroprotección.

El momento en el que el daño hipóxico finaliza, revistiría un papel clave (permitiendo crear una ventana temporal terapéutica) dada su susceptibilidad y regulación en el que

el balance y estado de sus receptores, entre otras moléculas, serían críticos en el destino de las células hipoxiadas.

María Eugenia Bogetti

Dra. Sara Fiszer

BIBLIO G RA FIA

Acsády L., Pascual M., Rocamora N., Soriano E., Freund T.F. (2000). *Nerve growth factor but not neurotrophin-3 is synthesized by hippocampal GABAergic neurons that project to the medial septum.* *Neuroscience* 98, 23-31.

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.* *FASEB J.* 5, 2127-8.

Aloe L., Bracci-Laudiero L., Bonini S., Manni L. (1997). *The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases.* *Allergy* 52, 883-894.

Altara C.A. and Distefano P.S. (1998). *Neurotrophin trafficking by anterograde transport.* *Trends in Neuroscience* 21, 433-37.

Arien-Zakay H., Lecht S., Bercu M., Tabakman R., Kohen ., Galski H., Nagler A., Lazarovici P. (2008). *Neuroprotection by cord blood neural progenitors involves antioxidants, neurotrophic and angiogenic factors.* *Experimental Neurology* 216, 83-94.

Armstrong D.M, Brady R, Hersh L.B, Hayes R.C, Wiley R.G (1991). *Expression of choline acetyltransferase and nerve growth factor receptor within hypoglossal motoneurons following nerve injury.* *J. Comp. Neurol.* 304, 596-607.

Bai Y., Dergham P., Nedev H., Galan A., Rivera J.C., ZhiHua S., Mehta H.M., Woo S.B., Sarunic M.V., Neet K.E., Saragovi H.U. (2010). *In chronic and in acute models of retinal neurodegeneration TrkA activity is neuroprotective while p75NTR activity is neurotoxic through a paracrine mechanism.* *J. Biol. Chem.*, 285 , 39392–39400.

Baig M.A., Khan M.A. (1996). *The induction of neurotrophin and TRK receptor mRNA expression during early avian embryogenesis.* *Int J Dev Neurosci.*,14, 55-60.

Bakshi A., Shimizu S., Keck C.A., Cho S., LeBold D.G., Morales D., Arenas E., Snyder E.Y., Watson D.J., McIntosh T.K. (2006). *Neural progenitor cells engineered to secrete GDNF show enhanced survival, neuronal differentiation and improve cognitive function following traumatic brain injury.* *Eur J Neurosci.* 23, 2119-34.

- Balduini W, Carloni S, Mazzoni E, Cimino M. (2004).** *New therapeutic strategies in perinatal stroke.* *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3, 315-23.
- Barker P.A. (2004).** *p75 NTR Is Positively Promiscuous: Novel Partners and New Insights.* *Neuron* 42, 529-533.
- 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.
- 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.
- Barker P.A. (2004).** *p75 NTR Is Positively Promiscuous: Novel Partners and New Insights.* *Neuron* 42, 529-533.
- Barks J.D., Silverstein F.S. (1992).** *Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury.* *Brain Pathol.* 2, 235-43.
- Berry A., Bindocci E., Alleva E. (2012).** *NGF, Brain and Behavioral Plasticity.* *Neural Plast.* Vol. 2012.
- Bhargava S., Modak S.P. (2002).** *Expression of nerve growth factor during the development of nervous system in early chick embryo.* *Brain Res Dev Brain Res.,* 136-43-9.
- Bhargava S. (2007).** *Role of nerve growth factor and its receptor in the morphogenesis of neural tube in early chick embryo.* *Gen Comp Endocrinol.,* 153, 141-6.
- Bibel M., Barde Y.A. (2000).** *Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system.* *Genes Dev.* 14, 2919-37.
- Bischoff S.C., Dahinden C.A. (1992).** *Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils.* *Blood* 79, 2662-69.
- Black I.B. (1986).** *Trophic molecules and evolution of the nervous system.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 21, 8249–8252.

- Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A., Greenberg M.E. (1999).** *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms.* *Science* 286, 1358-62.
- Bothwell M. (1995).** *Functional interactions of neurotrophins and neurotrophins receptors.* *Annu Rev Neurosci.* 180, 223-53.
- Brahimi- Horn M.C., Chiche J., and Pouysségur J. (2007).** *Hypoxia signaling controls metabolic demand.* *Curr Opin Cell Biol* 19, 223-9.
- Brodie C, Sampson C.R. (1990).** *Nerve growth factor and fibroblast growth factor influence post-fusion expression of Na-channels in culture rat skeletal muscle.* *J Cell Physiol.* 144, 492-97.
- 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.
- Catron T., Mendiola M.A., Smith S.M., Born J., and Walker M.K. (2001).** *Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1 alpha mRNA expression.* *Biochem Biophys Res Commun.* 282, 602-7.
- Catsicas M., Bonness V., Becker D., Mobbs P. (1998).** *Spontaneous Ca²⁺ transients and their transmission in the developing chick retina.* *Curr Biol.* 8, 283-6.
- Celador L., Goñi-de-Cerio F., Alvarez A., and Hilario E. (2013).** *Using the endocannabinoid system as a neuroprotective strategy in perinatal hypoxic-ischemic brain injury.* *Neural Regen Res.* 8, 731-744.
- Clary D.O., Reichardt L.F. (1994).** *An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers enhanced response to neurotrophin 3.* *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11133-7.
- Conner J.M., Lauterborn J.C., Yan Q., Gall C.M., Varon S. (1997).** *Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat brain: evidence for anterograde axonal transport.* *J Neurosci* 17, 2295-2313.

Conner J.M., Franks K.M., Titterness A.K., Russell K., Merrill D.A., Christie B.R., Sejnowski T.J., Tuszynski M.H. (2009). *NGF is essential for hippocampal plasticity and learning.* J. Neurosci. 29, 10883-10889.

Cotrina ML, González-Hoyuela M, Barbas JA, Rodríguez-Tébar A. (2000). *Programmed cell death in the developing somites is promoted by nerve growth factor via its p75 (NTR) receptor.* Dev Biol., 228, 326-36.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. (1997). *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.* Cell. 91, 31-41.

Datta S.R, Brunet A., Greenberg M.E. (1999). *Cellular survival: a play in three Acts.* Genes Dev. 13, 2905-27.

Delivoria-Papadopoulos M., Mishra O.P. (2000). *Mechanisms of perinatal cerebral injury in fetus and newborn.* Ann N Y Acad Sci. 900, 159-68.

De Long G.R., Coulombre A.J. (1965). *Development of the retinotectal topographic projection in the chick embryo.* Exp Neurol. 4, 351-63.

Di Marco E., Mathor M, Bondanza S., Cutuli N., Marchisio P.C. (1993). *Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop.* J Biol Chem. 268, 24290-95.

D'Onofrio M, Paoletti F, Arisi I, Brandi R, Malerba F, Fasulo L, Cattaneo A (2011). *NGF and proNGF regulate functionally distinct mRNAs in PC12 cells: an early gene expression profiling.* PLoS One. 6, e20839.

Dugan L.L., Douglas J.C., Johnson E.M., Holtzman D.M. (1997). *Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4086-4091.

Dusart I., Morel M.P., Sotelo C. (1994). *Parasagittal compartmentation of adult rat Purkinje cells expressing the low-affinity nerve growth factor receptor: changes of pattern expression after a traumatic lesion.* Neuroscience 351-356.

Ebendal T., Larhammar D., Persson H. (1986). *Structure and expression of the chicken beta nerve growth factor gene.* EMBO J. 5, 1483-7.

Ebendal T. (1992). *Function and evolution in the NGF family and its receptors.* J Neurosci Res. 32, 461-470.

Ehrhard P.B., Ganter U., Bauer J., Otten U. (1993). *Expression of functional trk protooncogene in human monocytes.* Proc Natl Acad Sci USA 90, 5423-27.

Eide F.F., Vining E.R., Eide B.L., Zang K., Wang X.Y., Reichardt L.F. (1996). *Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling.* J Neurosci. 16, 3123-9.

Eriksdotter-Jönhagen M., Linderöth B., Lind G., Aladellie L., Almqvist O., Andreasen N., Blenow K., Bogdanovic N., Jelic V., Kadir A., Nordberg A., Sundström E., Wahlund L.O., Wall A., Wiberg M., Winblad B., Seiger A., Almqvist P., Wahlberg L. (2012). *Encapsulated cell biodelivery of nerve growth factor to the Basal forebrain in patients with Alzheimer's disease.* Dement Geriatr Cogn Disord. 33, 18-28.

Ernfors P., Henschen A., Olson L., Persson H. (1989). *Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons.* Neuron 2 1605-1613.

Ernfors P., Wetmore C., Olson L., Persson H. (1990b). *Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family.* Neuron 5, 511-26.

Escandón E., Soppet D., Rosenthal A., Mendoza-Ramírez J.L., Szönyi E., Burton L.E., Henderson C.E., Parada L.F., Nikolics K. (1994). *Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development.* J Neurosci. 14, 2054-68.

Fahnestock M., Michalski B., Xu B., Coughlin M.D. (2001). *The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease.* Mol Cell Neurosci. 2, 210-20.

Fischer U., Janicke R.U., Schulze-Osthoff K. (2003). *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates.* Cell Death Differ 10, 76-100.

Fahnestock M., Yu G., Michalski B., Mathew S., Colquhoun A. (2004). *The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor.* J Neurochem 89, 581–592.

Xiyong Fan, Annemieke Kavelaars, Cobi J Heijnen, Floris Groenendaal, and Frank van Bel. (2010). *Pharmacological Neuroprotection after Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury.* Curr Neuropharmacol. 8, 324–334.

Frade J.M., Rodriguez-Tebar A., Brade Y.A. (1996). *Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor.* Nature 383, 166-168.

Gasser U.E., Weskamp G., Otten U., Dravid A.R. (1986). *Time course of the elevation of nerve growth factor (NGF) content in the hippocampus and septum following lesions of the septohippocampal pathway in rats.* Brain Res. 376:351-6.

Giussani D.A., Salinas C.E., Villena M, and Blanco C.E. (2007). *The role of oxygen in prenatal growth: studies in chick embryo.* J Physiol (Lond) 585, 911-7.

Guo L., Yeh M., Cuzon Carlson V.C., Johnson-Venkatesh E.M., Yeh H.H. (2012). *Nerve Growth Factor in the Hippocamptoseptal System: Evidence for Activity-Dependent Anterograde Delivery and Modulation of Synaptic Activity.* Journal of Neuroscience 32, 7701-7710.

Hallbook F. (1999). *Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families.* Curr Opin Neurobiol. 9, 616–21.

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.

Hamburger V. and Hamilton H.L. (1951). *A series of normal stages in the development of the chick embryo.* J Morphol. 88, 49-92.

Harper G.P., Glanville R.W., Thoenen H. (1982). *The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence.* J Biol Chem. 257, 8541-8.

- Hetman M., Kanning K., Cavanaugh J.E., 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.
- Heymach J.V., Jr and Barres B.A. (1997).** Developmental neurobiology Neurotrophins moving forward. *Nature* 389, 789-791.
- 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.
- Homma K, Koriyama Y, Mawatari K, Higuchi Y, Kosaka J, Kato S. (2007).** Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Neurochem Int.* 50, 741-8.
- Horigome K., Pryor J.C., Bullock E.D., Johnson E.M. Jr. (1993).** Mediators release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophins specificity and receptor mediation. *J Biol Chem.* 268, 14881-87.
- Huang E.J. and Reichardt F. (2001).** Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci.* 24, 677-736.
- Huang E.J. and Reichardt F. (2003).** TRK RECEPTORS: ROLES IN NEURONAL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry* 72, 609-642.
- Ishitsuka K., Ago T., Arimura K., Nakamura K., Tokami H., Makihara N., Kuroda J., Kamouchi M., Kitazono T. (2012).** Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvasc Res.* 83, 352-9.
- Jacobson M. D., Weil M., Raff M.C. (1997).** Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354

- Johnston M.V. (1997).** *Hypoxic and ischemic disorders of infants and children. Lecture for 38th meeting of Japanese Society of Child Neurology, Tokyo, Japan, July 1996.* Brain Dev. 19, 235-9.
- Johnston M.V. (2001).** *Excitotoxicity in neonatal hypoxia.* Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 7, 229-34.
- Kamada H., Nito C., Endo H., 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.
- Kannan Y., Ushio H., Koyama H., Okada M., Oijawa M. (1991).** *2.5s nerve growth factor enhances survival, phagocytosis and superoxide production of murine neutrophils.* Blood 77, 1320-25.
- Kaplan D.R., Martin-Zanca D., Parada L.F. (1991b).** *Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk induced by NGF.* Nature 350, 158-60.
- Kaplan D.R., Miller F.D. (2000).** *Neurotrophin signal transduction in the nervous system.* Curr Opin Neurobiol. 10, 381-91.
- Karten H. (1979).** *Visual Lemniscal Pathway in Birds. In Neural mechanism of behavior in the pigeon, A.M. Granda, and J.H. Maxell, eds. (Plenum Press), pp 409-30.*
- Kataoka A., Kubota M., Wakozono Y., Okuda A., Bessho R., Lin Y.W., Usami I., Akiyama Y., Furusho K. (1995).** *Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or non-apoptotic cell death induced by calcium ionophore.* FEBS Lett. 364, 264-7.
- 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., Gobé G., Winterford C., L.M. Schwartz, B.A. Osborne, and Harmon B. (1995).** *Anatomical methods in cell death. In Cell Deaths. (Academic Press), pp. 1-27.*
- Klabunde R. E. (2011).** *Cardiovascular Physiology Concepts- 2nd ed. Chapter 9. Wolters Kluwer Ed.*

Kitagawa K., Motsumoto M., Hari M. (2001). *Protective and regenerative responses endogenously induced in the ischemic brain.* Can J Physiol Pharmacol. 79, 262-5.

Klein R., Nanduri V., Jing S.A., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K.R., Reichardt L.F., Barbacid M. (1991b). *The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3.* Cell 66, 395-403.

Kokaia Z., Andsberg G., Martinez-Serrano A., Lindvall O. (1998). *Focal cerebral ischemia in rats induces expression of p75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons.* Neuroscience, 84 1113–1125.

Korshing S. (1993). *The neurotrophic factor concept: a reexamination.* J Neurosci. 13, 2739-48.

Kubota Y., and Suda T. (2009). *Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development.* Trends Cardiovasc Med. 19, 38-43.

Kume T., Nishikawa H., Tomioka H., Katsuki H., Akaike A., Kaneko S., Maeda T., Kihara T., Shimohama S. (2000). *p75 mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures.* Brain Res. 852, 279-89.

Kurokawa M., Kornbluth S. (2009). *Caspases and Kinases in a Death Grip.* Cell 138, 838-854.

LaManna J.C. (1997). *Hypoxia in the central nervous system.* Essays Biochem. 43, 139-51.

LaVail J.H., Cowan W.M. (1971). *The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development.* Brain Res. 28, 391-419.

Lee P., Zhuo H., Helke C.J. (2001). *Axotomy alters neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the vagus nerve and nodose ganglion of the rat.* Brain Res Mol Brain Res. 87, 31-41.

Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. (2001). *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science 294, 1945-8.

Leist M., Nicotera P. (1998). *Apoptosis, excitotoxicity, and neurophatology.* Exp Cell Res. 239, 183-201.

- Lessmann V., Gottmann K., Malsangio M. (2003).** *Neurotrophin secretion: current facts and future prospects.* Progress in Neurobiology 69, 341-374.
- Levi-Montalcini R. (1987).** *The nerve growth factor: thirty-five years later.* EMBO J. 6, 1145-54.
- Levi-Montalcini R., Aloe L., Alleva E. (1990).** *A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune systems.* Progress in Neuroendocrinology 3, 1-10.
- Li L.Y., Li J.T., Wu Q.Y., Li J., Feng Z.T., Liu S., Wang T.H. (2008).** *Transplantation of NGF-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of Alzheimer' disease.* J Mol Neurosci. 34, 157-63.
- Liebl D.J., Huang W., Young W., Parada L.F. (2001).** *Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord.* Exp Neurol. 167, 15-26.
- Lindholm D., Heumann R., Meyer M., and Thoenen H. (1987).** *Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve.* Nature 6149, 658-659.
- Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmer E., Kokaia M. (1994).** *Neurotrophins and brain insults.* Trends Neurosci. 17, 490-496.
- Lipton P. (1999).** *Ischemic cell death in brain neurons.* Physiol Rev. 79, 1431-568.
- Lobos E., Gebhardt C., Kluge A., Spanel-Borowski K. (2005).** *Expression of Nerve Growth Factor (NGF) isoforms in rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF.* Endocrinology 146, 1922-1929.
- Lorez H.P., von Frankenberg M., Weskamp G., Otten U. (1988).** *Effect of bilateral decortication on nerve growth factor content in basal nucleus and neostriatum of adult rat brain.* Brain Res. 454, 355-60.
- Lorez H., Keller F., Ruess G., Otten U. (1989).** *Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury.* Neurosci Lett. 98, 339-44.
- Lu J., Frerich J.M., Turtzo L.C., Li S., Chiang J., Yang C., Wang X., Zhang C., Wu C., Sun Z., Niu G., Zhuang Z., Brady R.O., Chen X. (2013).** *Histone deacetylase inhibitors are*

neuroprotective and preserve NGF-mediated cell survival following traumatic brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 10747-52.

Luo H.R., Hattori H., Hossain M.A., Hester L., Huang Y., Lee-Kwon W., Donowitz M., Nagata E., Snyder S.H. (2003). *Akt as a mediator of cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 11712-7.

Majno G. and Joris I. (1995). *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.* Am J Pathol. 146, 3-15.

Manca A, Capsoni S., Di Luzio A., Vignone D., Malerba F., Paoletti F., Brandi R., Arisi I., Cattaneo A., Levi-Montalcini R. (2012). *Nerve growth factor regulates axial rotation during early stages of chick embryo development.* Proc Natl Acad Sci U S A.109, 2009-14.

Marketon JIW, Glaser R. (2008). *Stress hormones and immune function.* Cellular Immunology 252(1-2):16–26.

Marsh H.N., Scholz W.K., Lamballe F. Klein R., Nanduri V. (1993). *Signal transduction events mediated by the BDNF receptor gp145trkB in primary hippocampal pyramidal cultures.* J Neurosci. 13, 4381-92.

Marsh H.N., Dubreuil C.I., Quevedo C., Lee A., Majdan M., Walsh G.S., Hausdorff S., Said F.A., Zoueva O., Kozlowski M., Siminovitch K., Neel B.G., Miller F.D., Kaplan D.R. (2003). *SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase.* J Cell Biol. 163, 999-1010.

Marti H.H., and Risau W. (1998). *Systemic hypoxia changes the organ-especific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors.* Proc Natl Acad Sci USA 95, 15809-14.

Martin L.J., Brambrink A, Koehler R.C., Traystman R.J. (1997). *Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain preferentially damaged by hypoxia-ischemia.* J Comp Neurol. 377, 262-85.

Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., Portera-Cailliau C. (1998). *Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target*

deprivation: A perspective on the contribution of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull.* 46, 281-309.

Matsuda H., Kannan Y., Ushio H., Kiso Y., Kanemoto T. (1991). Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med.* 174, 7-14.

Mattson M.P. (1997). *Trophics Factors and Brain Cell Survival.* Primer in Cerebrovascular Diseases, Cap.68, 237-239. Ed. K. Michael A. Welch.

Matusica D., Skeldal S., Sykes A.M., Palastra N., Sharma A., Coulson E.J. (2013). An intracellular domain fragment of the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)) enhances tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor function. *J Biol Chem.* 288, 11144-54.

Mey J., Thanos S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Rev.* 32, 343-79.

McAllister A.K. (2000). Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb. Cortex.* 10, 963-973.

Mearowa K.M., Kril Y. (1995). Anti-NGF treatment blocks the upregulation of NGF receptor mRNA expression associated with collateral sprouting of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 184, 55-58.

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.

Mey J., Thanos S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 32, 343-79.

Middleton G., Hamanoue M., Enokido Y., Wyatt S., Pennica D., Jaffray E., Hay R.T., Davies A.M. (2000). Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol.,* 148, 325-32.

Miller F.D and Kaplan D.R. (2001). Neurotrophin signaling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 58, 1045-1053.

Mobley W.C., Schenker A., Shooter E.M. (1976). *Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor.* *Biochemistry* 25, 5543-52.

Mouri A., Nomoto H., Furukawa S. (2007). *Processing of nerve growth factor: The role of basic amino acid clusters in the pro-region.* *Biochem Biophys Res Commun* 353, 1056–1062.

Mowla S.J., Farhadi H.F., Pareek S., Atwal J.K., Morris S.J., Seidah N.G., Murphy R.A. (2001). *Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor.* *J Biol Chem.* 276, 12660-6.

Nabeshima T., Ogawa S., Yamada K., Ishimaru H., Fuji K., Kameyama T., Fukuta T., Takeuchi R., Hayashi K. (1991). *Memory impairment and morphological changes in rats after continuous infusion of active fragment of anti-nerve growth factor-antibody.* *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 74, 141-52.

Nakajima W., Ishida A., Lange M.S., Gabrielson K.L., Wilson M.A., Martin L.J., Blue M.E., Johnston M.V. (2000). *Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat.* *J Neurosci.* 20, 7994-8004.

Ng B.K., Chen L., Mandemakers W., Cosgaya J.M., Chan J.R. (2007). *Anterograde transport and secretion of brain-derived neurotrophic factor along sensory axons promote Schwann cell myelination.* *J Neurosci* 27, 7597-603.

Nguyen N., Lee S.B., Lee Y.S., Lee KH, Ahn J.Y. (2009). *Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways.* *Neurochem Res.* 34, 942-51

Nguyen T.L., Kim C.K., Cho J.H., Lee K.H., Ahn J.Y. (2010). *Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR [corrected].* *Exp Mol Med.* 8, 583-95.

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.

Nicotera P, Bonfoco E, Brune B. (1995). *Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis.* *Adv Neuroimmunol.* 5, 411-20.

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.

Nitta A., Ogihara Y., Onishi J., Hasegawa T., Furukawa S., Nabeshima T. (1997). *Oral administration of propentofylline, a stimulator of nerve growth factor (NGF) synthesis, recovers cholinergic neuronal dysfunction induced by the infusion of anti-NGF antibody into the rat septum.* *Behav Brain Res.* 83, 201-4.

Nykjaer A., Lee R., Teng K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T., Hempstead B. & Petersen C. (2003). *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death.* *Nature* 427, 843-848.

Northington, F.J., Ferreira D.M., Flock D.L., Martin L.J. (2001a). *Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis.* *J Neurosci.* 21, 1931-8.

Northington F.J., Ferreira D.M., Graham E.M., Traystman R.J., Martin L.J. (2001b). *Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis.* *Neurobiol Dis.* 8, 207-19.

Noshita N., Lewén A., Sugawara T., Chan P.H. (2001). *Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice.* *J Cereb Blood Flow Metab.* 21, 1442-50.

Oh J.D., Chartisathian K, Chase T.N., Butcher L.L. (2000). Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res.*, 853 pp. 174–185.

Oh Y.S., Jong A.Y., Kim D.T., Li H., Wang C., Zemljic-Harpf A., Ross R.S., Fishbein M.C., Chen P.S., Chen L.S. (2006). Spatial distribution of nerve sprouting after myocardial infarction in mice. *Heart Rhythm* 3, 728-36.

Oppenheim R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Re Neurosci.* 14, 453-84.

Otten U., Schwab M., Gagnon C., Thoenen H. (1977). Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase by nerve growth factor: comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. *Brain Res.* 133, 291–303.

Ouyang Y.B., Tan Y., Comb M., Liu C.L., Martone M.E., Siesjö B.K., 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.

Pasciu V, Posadino AM, Cossu A, Sanna B, Tadolini B, Gaspa L, Marchisio A, Dessole S, Capobianco G, Pintus G. (2009). Akt downregulation by flavin oxidase-induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants. *Toxicol Sci.* 114,101-12.

Pawson T., Nash P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 14, 1027-47.

Petito C.K., Torres-Muñoz J., Roberts B., Olarte J.P., Nowak T.S. Jr, Pulsinelli W.A. (1997). DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17, 967-76.

Pei L., Li Y., Yan J.Z., Zhang G.Y., Cui Z.C., Zhu Z.M. (2000). Changes and mechanisms of protein-tyrosine kinase and protein-tyrosine phosphatase activities after brain ischemia/reperfusion. *Acta Pharmacol Sin.* 21, 715-20.

Pincelli C., Haake A.R., Benassi L., Grassilli E., Magnoni C., Ottani D., Polakowska R., Franceschi C., Giannetti A. (1997). *Autocrine nerve growth factor protects human keratinocytes from apoptosis through its high affinity receptor (TRK): a role for BCL-2.* *J Invest Dermatol.*, 109, 757-64.

Popic J., Pesic V., Milanovic D., Todorovic S., Kanazir S., Jevtovic-Todorovic V., Ruzdijic S. (2012). *Propofol-induced changes in neurotrophic signaling in the developing nervous system in vivo.* *PLoS One* 7:e34396.

Poulsen R.C., Carr A.J., Hulley P.A. (2011). *Protection against glucocorticoid-induced damage in human tenocytes by modulation of ERK, Akt, and forkhead signaling.* *Endocrinology*, 152, 503-14.

Pozo Devoto V.M., Chavez JC, Fiszler de Plazas S. (2006). *Acute hypoxia and programmed cell death in developing CNS: Differential vulnerability of chick optic tectum layers.* *Neuroscience* 142, 645-53.

Pozo Devoto V.M. (2012). *Estudio bioquímico y estructural de la muerte propia del desarrollo y la inducida por un evento hipóxico en el SNC en desarrollo.* Tesis Doctoral.

Puelles L., 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.

Purves D., Snider W.D., Voyvodic J.T. (1988). *Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system.* *Nature* 336, 123-128.

Ratan RR, Murphy T.H., Baraban J.M. (1994). *Macromolecular síntesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from proteína síntesis to glutathione.* *J Neurosci.* 14, 4385-92.

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 the neurodevelopmental disorders including schizophrenia.* *Neuroscience* 129, 381-91.

Reichardt L.F., Fariñas I. (1997). *Neurotrophic factors and their receptors. Roles in neuronal development and function. Molecular and Cellular Approaches to Neural Development.* Oxford Univ. Press. Pp. 220-63.

Riccio A., Ahn S., Davenport C.M., Blendy J.A., Ginty D.D. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286, 2358-61.

Rodgers E.E., Theibert A.B. (2002). *Function 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-Tébar A., Dechant G., Barde Y.A. (1991). *Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions.* *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 331, 255-8.

Rong Rong, Jee-Yin Ahn, Peng Chen, Pann-Ghill Suh and Keqiang Ye (2003). *Phospholipase Activity of Phospholipase C- γ 1 Is Required for Nerve Growth Factor-regulated MAP Kinase Signaling Cascade in PC12 Cells.* *The Journal of Biological Chemistry,* 278, 52497-52503.

Rothman J.E., Orci L. (1992). *Molecular dissection of the secretory pathway.* *Nature* 355, 409-15.

Roux P.P., Barker P.A. (2002). *Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor.* *Prog. Neurobiology* 67, 203-233.

Ruit K.G., Elliott J.L., Osborne P.A., Yan Q., Snider W.D. (1992). *Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth factor during embryonic development.* *Neuron.* 8, 573-87.

Russell J.C., Szufliata N., Khatri R., Laterra J., Hossain M.A. (2006). *Transgenic expression of human FGF-1 protects against hypoxic-ischemic injury in perinatal brain by intervening at caspase-XIAP signaling cascades.* *Neurobiol Dis.* 2, 677-90.

Rydén M., Hempstead B., Ibáñez C.F. (1997). *Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor.* J Biol Chem. 272, 16322-8.

Sanchez-Ortiz E., Yui D., Song D., Li Y., Rubenstein J.L., Reichardt L.F., Parada L.F. (2012). *TrkA gene ablation in basal forebrain results in dysfunction of the cholinergic circuitry.* J Neurosci. 32, 4065-79.

Scott J., Selby M., Urdea M., Quiroga M., Bell G.I., Rutter W.J. (1983). *Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor.* Nature 302, 538-40.

Shigeno T., Mima .T, Takakura K., Graham D.I., Kato G., Hashimoto Y., Furukawa S. (1991). *Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor.* J Neurosci. 9, 2914-9.

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.

Segal R.A. (2003). *Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations.* Annu Rev Neurosci. 26, 299-330.

Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Savaria D., Hamelin J., Goulet B., Laliberte J., Lazure C., Chrétien M., Murphy R.A. (1996). *Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases.* Biochem J. 314, 951-60.

Seiler M., Schwab M.E. (1984). *Specific retrograde transport of NGF from neocortex to nucleus basalis in the rat.* Brain Res. 300, 33-39.

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.

Shelton D.L., Sutherland J., Gripp J., Camerato T., Armanini M.P., Phillips H.S., Carroll K., Spencer S.D., Levinson A.D. (1995). *Human trks: molecular cloning, tissue*

distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci.* 15, 477-91.

Shimizu T., & Karten H.J. (1993). *The avian visual system and the evolution of the neocortex.* In *Vision, Brain, and Behavior in Birds*, H. P. Zeigler & H.-J. Bischof (Eds.), Cambridge, Massachusetts, London, England: MIT Press, pp 103-114.

Shimohama S., Ogawa N., Tamura Y., Akaike A., Tsukahara T., Iwata H., Kimura J. (1993). *Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons.* *Brain Res.* 632, 296–302

Schwartz L.M., Smith S.W., Jones M.E and Osborne, B.A. (1993). *Do all programmed cell death occur via apoptosis?.* *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 980-84.

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

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.

Siesjo, Bo K. (1996). *Cellular & Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage.* Lippincott- Raven, new York.

Sliwinska-Kowalska M, Rzdzińska A, Rajkowska E, Malczyk M. (2005). *Expression of bFGF and NGF and their receptors in chick's auditory organ following overexposure to noise.* *Hear Res.* 210, 93-103.

Smith M.A., Makino S., Kim S.Y., Kvetnansky R. (1995). *Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary.* *Endocrinology.* 136, 3743–3750.

Spencer J.P., Rice-Evans C., Williams R.J. (2003). *Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability.* *J Biol Chem.* 278, 34783-93.

Squier M.K., Miller A.C., Malkinson A.M., Cohen J.J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol.* 159, 229-37.

Stefanis L. (2005). *Caspase-dependent and-independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury.* *Neuroscientist* 11, 50-62.

Stern C.D. (2004). *The chick embryo: past, present and future as a model system in developmental biology.* *Mech Dev.* 121, 1011-13.

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.

Tazawa H. (1980). Adverse effect of failure to turn the avian egg on the embryo oxygen exchange. *Respir Physiol* 41, 137-42.

Taoufik E, Probert L. (2008). Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des.* 14, 3565-73.

Thorpe L.W., Perez-Polo Jr. (1987). The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res.* 18, 134-39.

Torregrosa E., Hernández Jaras J., Sastre J., Pons R., García Calvo H., Calvo Gordo C., Fenollosa M.A, Rius A., Sánchez-Canel J.J, Pin M., Tamarit E., Rico I. (2007). Oxidative stress analysis in patients on hemodiafiltration on-line. *Nefrologia.* 27, 612-8.

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.

Tuszynski M.H. and Gage F.H. (1995). Maintaining the neuronal phenotype after injury in the adult CNS. Neurotrophic factors, axonal growth substrates, and gene therapy. *Mol. Neurobiol.* 10, 151-167.

Van der Zee C.E., Rashid K., Le K., Moore K.A., Stanis J., Diamond J., Racine R.J., Fahnestock M. (1995). Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J Neurosci.* 15, 5316-23.

Vandenabeele P., Galluzi L., Vanden Berghe, T. and Kroemer G. (2010). *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion.* Nat Rev Mol Cell Biol. 11, 700-14.

Vexler, Z.S., and Ferreiro, D.M. (2001). *Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury.* Semin Neonatol. 6, 99-108.

Wang T.H., Meng Q.S., Qi J.G., Zhang W.M., Chen J., Wu L.F. (2007). *NT-3 expression in spared DRG and the associated spinal laminae as well as its anterograde transport in sensory neurons following removal of adjacent DRG in cats.* Neurochem Res. 33, 1-7.

Warburton S.J., Hastings D., and Wang T. (1995). *Responses to chronic hypoxia in embryonic alligators.* J Exp Zool. 273, 44-50.

Wolvetang E.J., Johnson K.L., Krauer K., Ralph S.J., Linnane A.W. (1994). *Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis.* FEBS Lett. 339, 40-4.

Wong W.T., Sanes J.R., Wong R.O. (1998). *Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina.* J Neurosci. 18, 8839-52.

Woost P.G., Jumblatt M.M, Eiferman R.A., Schultz G.S. (1992). *Growth factors and corneal endothelial cells: I. Stimulation of bovine corneal endothelial cell DNA synthesis by defined growth factor.* Cornea 11, 1-10.

Wu Y., Chu R., Zhou X., Dai J., Qu X. (2009). *Determination of the nerve growth factor level in the central cornea after LASIK and Epi-LASIK treatment in a rabbit model system.* Cornea 28, 1144-8.

Yardley G., Relf B., Lakshmanan J., Reinshagen M., Moore G.P. (2000). *Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle.* Exp Dermatol. 4, 283-9.

Yuan J, Yankner BA. (2000). *Apoptosis in the nervous system.* Nature 407, 802–9.

Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. (1996). *Mitochondrial control of nuclear apoptosis.* J Exp Med. 183, 1533-44.

Zhang H., Petit G.H., Gaughwin P.M., Hansen C., Ranganathan S., Zuo X., Smith R., Roybon L., Brundin P., Mobley W.C., Li J.Y. (2013). *NGF rescues hippocampal cholinergic*

neuronal markers, restores neurogenesis, and improves the spatial working memory in a mouse model of Huntington's Disease. J Huntingtons Dis. 2, 69-82.

Zhu L., Du F., Yang L., Wu X.M., Qian Z.M. (2007). Nerve growth factor protects the cortical neurons from chemical hypoxia-induced injury. Neurochem Res. 33, 784-9.

Zhang Z., Galileo D.S. (1998). Widespread programmed cell death in early developing chick optic tectum. Neuroreport. 9, 2797-801

Zong W.X. and Thompson C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. Genes Dev. 20, 1-15.