UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Medicina
Tecnología Médica

VULNERABILIDAD DEPENDIENTE DE ASFIXIA PERINATAL DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS A INSULTOS METABÓLICOS POSTNATALES

Unidad de investigación.

Presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Título de Tecnólogo Médico con especialidad en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico.

Autor: Marcos Felipe Sehrt Uribe.

Profesor Guía: Mario Herrera-Marschitz.

Santiago de Chile, 2015.

Contenidos

Resumen 3
Introducción 4
Hipótesis 10
Objetivo general 10
4.1 Objetivo específico 10
Metodología 11
5.1 Protocolo de la asfixia perinatal 11
5.2 Protocolo de cultivos organotípicos 12
5.3 Segundo insulto metabólico in vitro 13
5.4 Prueba de viabilidad 13
5.5 Fijación de cultivos 13
5.6 Anticuerpos 14
5.7 Detección inmunocitoquímica 14
5.8 Microscopia confocal y cuantificación estereológica 16
5.9 Datos estadísticos 18
Resultados 19
Discusión 32
Limitantes 35
Proyecciones de estudio 36
Conclusiones 37
Referencias 38

Índice de figuras

Figura 1: Asfixia perinatal conduce a vulnerabilidad en sustancia nigra. 8
Figura 2: Modelo de asfixia perinatal en ratas. 12
Figura 3: Diseño experimental 16
Figura 4: Neuronas dopaminérgicas en cultivos organotípicos 17
Figura 5: Un insulto recurrente aumenta la muerte celular en cultivos organotípicos, de animales sometidos a asfixia perinatal y controles. 20
Figura 6: Asfixia Perinatal induce muerte celular tras un segundo insulto metabólico en sustancia nigra. 21
Figura 7: Asfixia perinatal induce cambios en la expresión de proteínas pro-apoptóticas en SN de cultivos organotipicos expuestos a un segundo insulto metabólico. 22
Figura 8: Asfixia perinatal induce cambios en la expresión de proteínas pro-apoptóticas en Cx de cultivos organotipicos expuestos a un segundo insulto metabólico. 24
Figura 9: Asfixia perinatal induce cambios en la expresión de proteínas pro-apoptóticas en Str de cultivos organotipicos expuestos a un segundo insulto metabólico. 26
Figura 10: Comparación porcentual de células caspasa 3 positivas en SN, Str y Cx. 28
Figura 11: Comparación porcentual de neuronas dopaminérgicas positivas a caspasa 3. 29
Figura 12: Número de células por mm3 en SN, Str y Cx. 30
Figura 13: Comparación porcentual de cuerpos apoptóticos en SN. 31

Anexo 1: Autorización comité de Bioética. 45
Anexo 2: Abstract aceptado para presentación en congreso. 47

Resumen

Asfixia perinatal implica interrupción del intercambio de gases al momento de nacer, resultando en muerte si la biodisponibilidad de oxígeno no es reestablecida. A pesar de que la pronta re-oxigenación permite revivir al neonato, el insulto produce muerte neuronal y alteraciones neurológicas a largo plazo. Se ha discutido si estas consecuencias a largo plazo de la asfixia perinatal dependen de la duración del insulto, o de cambios en las vías metabólicas que determinan una vulnerabilidad selectiva a insultos metabólicos postnatales que puedan ocurrir a lo largo del desarrollo, limitando la capacidad del sistema nervioso central para responder a factores de estrés metabólicos y/o ambientales. Los mecanismos por los que la asfixia perinatal produciría esta vulnerabilidad no están dilucidados.

Por otra parte, se ha observado que la asfixia perinatal no afecta todas las regiones cerebrales por igual, ya que existen regiones privilegiadas en cuanto a reservas energéticas y mecanismos anti-stress, y otras, como los ganglios basales, especialmente vulnerables al daño y malfuncionamiento. Las neuronas dopaminérgicas, que constituyen el sistema pivotal de los ganglios basales, han demostrado ser muy susceptibles a la asfixia perinatal. Los mecanismos de esta susceptibilidad selectiva tampoco están dilucidados.

En el presente proyecto, se propone estudiar la vulnerabilidad a un segundo insulto metabólico de las neuronas dopaminérgicas de ratas expuestas a asfixia perinatal, evaluado en cultivos organotípicos, monitoreando los componentes esenciales de los ganglios basales, substantia nigra, neostriado y neocortex, midiendo muerte celular, fenotipo celular y neuroquímico, cuantificando parámetros morfológicos y celulares con microscopia confocal y estereología.

Esta investigación determinó que el efecto de un segundo insulto se supedita a las condiciones, grado y tiempo de hipoxia al cual se sometan al nacer.

Introducción

Los insultos metabólicos durante el nacimiento, en especial aquellos que involucran asfixia perinatal (AP), son la mayor causa de muerte y desórdenes neurológicos en recién nacidos (ver Herrera-Marschitz et al. 2011; Golubnitschaja et al. 2011).

Asfixia se refiere a la interrupción del intercambio de dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2) y es el insulto clínico más común en el periodo perinatal, lo que puede producir daño cerebral (Miller et al. 2002). AP es la consecuencia de un parto prolongado o dificultoso, con interrupción parcial o total del intercambio de gases al recién nacido, culminando en muerte si no se restaura a tiempo (Foley et al. 2005). Durante el preparto y parto el intercambio de gases lo realiza la madre, entregando O_2 y extrayendo CO_2 a través del cordón umbilical, hasta que esta interacción se interrumpe y el recién nacido inicia la ventilación pulmonar, que debe mantenerse de por vida. Si ocurre un retardo en la ventilación pulmonar rápidamente disminuye la pO_2 con aumento concomitante de la pCO_2, interrumpiendo el metabolismo oxidativo y las reservas de ATP, la principal fuente energética para mantener el intercambio iónico de membrana y el conjunto de cascadas metabólicas dependientes de energía, afectando primariamente a los sistemas con mayor avidez energética, incluyendo la actividad neuronal (ver Van Handel et al. 2007). Se ha descrito muchos mecanismos por los cuales AP puede conducir a desórdenes neurológicos (ver Barkovich and Truwit, 1990), tanto en recién nacidos, como en adultos (González de Dios et al. 1996), con selectividad regional (ver Herrera-Marschitz et al. 2011), afectando en particular a neurocircuitos de los ganglios basales e hipocampo (Pasternak et al. 1991).

Utilizando cultivos organotípicos (Morales et al. 2003; Klawitter et al. 2005, 2007), se demostró que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN) son vulnerables a AP, sugiriendo a estas células como objeto de estudio, ya que constituyen el sistema pivotal de los ganglios basales, una red neuronal compleja que modula e integra la función de la

corteza cerebral (Herrera-Marschitz et al. 1994), interconectando corteza cerebral, tálamo y corteza motora y pre motora (Onn et al. 2000; ver Neugebauer et al. 2006).

La síntesis de dopamina (DA) depende de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima marcapaso para todas las catecolaminas biogénicas, requiere de O_2, Fe^{2+} y *tetrahydropteridine* como factor (Dix et al. 1987; Rostrup et al. 2008). La interrupción del suministro de O_2 modifica además la expresión y traducción génica (Chiappe - Gutierrez et al. 1998; Taylor et al. 1999; Ikonomidou et al. 2010), incluyendo mecanismos reguladores complejos, tales como autofagia (Ginet et al.2009).

La re-oxigenación es un requisito para re-establecer los parámetros homeostáticos de la célula, tales como activación de la Na^+/K^+-ATPasa (aumento del consumo de ATP), acumulación de lactato (Fenichel et al. 1983; Leth et al. 2008), liberación de glutamato (Chen et al. 1997), aumento de la conductancia de Ca^{+2} (Bickler et al. 2004), y finalmente estrés oxidativo con todas sus implicancias (Kumar et al. 2007), incluyendo liberación de citoquinas y señales pro-inflamatorias, aumentando la vulnerabilidad metabólica de las regiones afectadas (ver McAdams et al. 2012).

La muerte celular apoptótica es un importante *end-point* de la AP, proceso activo que requiere de ATP (Morales et al. 2005, 2008; Edwards et al. 2008), e involucra un número importante de enzimas citoplasmáticas y mitocondriales, siendo caspasa-3 (CASP-3) un importante marcador de apoptosis (Karahashi H & Amano F 1999).

Como ya expuesto, las neuronas de los neurocircuitos de los ganglios basales son susceptibles a insultos metabólicos, por razones aún no elucidadas. Se han propuesto muchas hipótesis para explicar esta susceptibilidad, incluyendo altos requerimientos energéticos (Chan et al. 1994; Zeevalk et al. 2002; Liss et al. 2005; Sulzer et al. 2007), inmadurez selectiva de las defensas antioxidantes (ver Delivoria-Papadopoulos et al. 1998), y factores de desarrollo en general (ver Herrera-Marschitz et al. 2014).

Una característica de las neuronas dopaminérgicas es que la producción de DA en las terminales sinápticas puede contener de 50 a 150 veces más DA que en el cuerpo celular (Andén et al. 1966) con una alta tasa de recambio y consumo de energía (Farnebo 1971).

A nivel celular, tanto *in vitro* como *ex vivo*, se ha demostrado que las neuronas del sistema nervioso central (SNC) son muy susceptibles a cambios homeostáticos, tales como variaciones osmóticas, hipoglicemia, y estrés oxidativo (Singh et al. 2004; Auer et al. 2004). En modelos de cultivos de neuronas mesencefálicas de ratas neonatas, se observó que las células responden a desbalance energético inducido por hipoglicemia, primero con hiperpolarización de membrana por apertura de canales K+, que se considera un sensor del estado metabólico celular, para detectar el rango ATP/ADP (Guatteo et al. 2005; Geracitano et al. 2005). Si no existe un restablecimiento apropiado de las condiciones homeostáticas, se mantienen abiertos los canales de K^+, generando despolarización, activando otros canales catiónicos de la membrana plasmática, agravando la crisis energética, resultando en muerte celular (ver Shieh et al. 2000).

La alteración de la homeostasis de glucosa está asociada a daño celular y a muchos desórdenes neurológicos y sistémicos (Farroqui et al. 2012). Existe una delgada línea entre el metabolismo de la glucosa y la producción de radicales libres. Tras episodios de hipoglicemia, se produce un descenso significativo de catalasa, manganeso superoxidodismutasa (Mn-SOD) y glutatión (GSH) en la mitocondria (Papadopolous et al. 1997; ver Bains et al. 1997; Loose et al. 2008).

La hipoglicemia y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados, resultando en peroxidación lipídica, daño al DNA y muerte celular (Singh et al. 2004). Los insultos metabólicos que incluyen hipoglicemia y estrés oxidativo actúan de manera sinérgica, regulando negativamente los sistemas de neutralización (*scavenger*) de radicales libres, con el consecuente daño asociado a este proceso.

En general los insultos metabólicos producen estrés oxidativo, a través de múltiples vías (Freidovich 1999; Yun-Zhong et al. 2002). *In vitro,* la exposición neuronal a altas

concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gatilla muerte celular retardada de tipo apoptótico (Whittemore et al. 1994). Este efecto de H_2O_2 se produce por stress oxidativo y disminución de la biodisponibilidad de ATP, contingente al alto requerimiento energético inherente a la expresión y activación enzimática, particularmente glutatión peroxidasa (Azbill et al. 1997). Otro mecanismo implica la homeostasis del Ca^{2+}, ya que los canales de Ca^{+2}-voltaje dependientes se activan por la despolarización celular (Geracitano et al. 2005).

Se ha demostrado que altas concentraciones citosólicas de Ca^{2+} son tóxicas, conduciendo a muerte celular y necrosis (Zipfel et al. 2009). Los mecanismos mediante los cuales el Ca^{2+} ejecuta este efecto tóxico están relacionados con disfunción mitocondrial y liberación de citocromo *c*, lo que se conoce como vía apoptótica inducida por condiciones hipóxicas (Budd et al. 1998). En conjunto, estos datos demuestran que existe una relación entre insultos metabólicos, estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno (ROS), metabolismo mitocondrial y muerte celular.

Se ha descrito que AP induce daño por reactividad celular, neuroinflamación y apoptosis (Bains J, Shaw C, 1997; Papadopoulos et al. 1997; ver Delivoria-Papadopoulos et al. 1998, Neira-Peña et al 2015) en distintas regiones del cerebro (Morales et al. 2005).. A lo largo de la vida del individuo, otros insultos metabólicos ejercen efectos sinérgicos, alterando permanentemente el metabolismo neuronal y su funcionalidad.

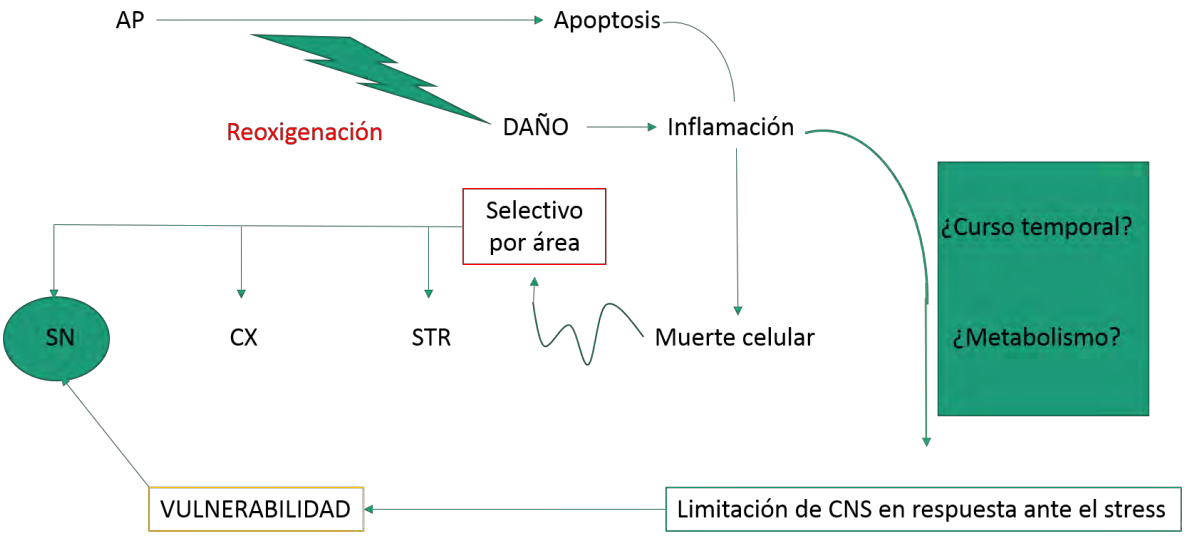


Figura 1: Asfixia perinatal conduce a vulnerabilidad en sustancia nigra.

AP puede conducir a muerte neuronal y/o neuroinflamación, con una vulnerabilidad que es selectiva. Las neuronas del mesencéfalo (sustancia nigra, SN, y área ventral tegmental, VTA) son vulnerables a insultos metabólicos, también las neuronas en los blancos de la proyección dopaminérgica (neocorteza, Cx) y neostriado, Str).

La vulnerabilidad regional a AP implica que el SNC responde con especificidad a sucesivos insultos metabólicos, afectando diferencialmente a neuronas (monitoreadas con anticuerpo contra *proteína asociada a microtúbulo 2,* MAP-2, proteína localizada a lo largo del soma, axón y dendritas). La hipotermia se ha propuesto como alternativa terapéutica por reducir el metabolismo del SNC y las cascadas concomitantes que resultan en una alteración de la función cerebral (Engidawork et al. 2001; Compagnoni et al. 2002).

Hipotermia se define como la disminución de la temperatura corporal conduciendo a disminución del metabolismo y, actualmente, es la única terapia actual con efectividad demostrada en humanos tras periodos de AP, reduciendo la encefalopatía asociada al insulto hipóxico (Azzopardi et al. 2009). La ventana terapéutica para la hipertermia es, sin embargo, estrecha (Engidawork et al. 2001; ver Wassink et al. 2014), por lo que se necesitan estrategias con mayor espectro temporal y especificidad celular.
Con el fin de investigar el efecto se un segundo insulto en la vulnerabilidad del SNC, en esta propuesta utiliza deprivación de glucosa y elevación de H_2O_2 en cultivos organotípicos

de ratas con AP. Se ha demostrado que H_2O_2 desregula los patrones de descarga neuronales (Avshalumov et al., 2005), y puede inducir apoptosis en neuronas dopaminérgicas (Langeweld et al. 1995), regulando la dinámica y metabolismo mitocondrial en astrocitos y neuronas. Así, H_2O_2 simula un insulto metabólico a las células en el SNC. Por otra parte, se ha demostrado que hipoglicemia constituye también un insulto al SNC, asociada a muchos desórdenes neurológicos (Messier et al. 1996; Gibson, 1999; Zhou et al. 2008), afectando la dinámica mitocondrial (McBride et al. 2006).

Hipótesis

Asfixia perinatal aumenta la vulnerabilidad de neuronas dopaminérgicas a insultos metabólicos post natales, resultando en muerte específica de neuronas con este fenotipo neuroquímico.

Objetivo general

Estudiar la vulnerabilidad de neuronas dopaminérgicas a un segundo insulto metabólico analizando: (i) viabilidad celular (ii) fenotipo celular (neurona); y (iii) fenotipo neuroquímico (neuronas dopaminérgicas), utilizando cultivos organotípicos de cerebro de ratas.

4.1 Objetivo específico

Estudiar el efecto de un segundo insulto (elevación de H_2O_2 y deprivación de glucosa) en cultivos organotípicos (Cx-Str-SN) procedentes de ratas expuestas a AP y controles, utilizando inmunofluorecencia y microscopia confocal, evaluando:

1 Viabilidad celular mediante la expresión de caspasa 3 (CASP-3) como indicador de apoptosis.

2 Fenotipo celular con marcadores neuronales y gliales (MAP-2, GFAP).

3 Fenotipo neuroquímico utilizando tirosina hidroxilasa (TH), enzima marcapaso de la síntesis de dopamina.

Observar el comportamiento de las células y su respuesta a un segundo insulto metabólico, cuantificación neuronal estereológica en SN, Cx y Str.

Metodología

5.1 Protocolo de la asfixia perinatal

Ratas Wistar preñadas en su último día de gestación son eutanizadas por dislocación cervical, para realizar una histerectomía con el objeto de extraer los cuerpos uterinos con sus fetos. Uno o dos fetos se liberan inmediatamente, para ser utilizados como neonatos control cesárea. Los fetos restantes, en sus cuernos uterinos, se sumergen en un baño de agua a 37°C durante 21 minutos. Tras la asfixia, se extraen las crías, se estimula la respiración pulmonar, y se mantienen en observación durante un periodo de aproximadamente una hora, evaluando el estatus fisiológico con una escala de Apgar. Posteriormente, se entregan los neonatos a una madre nodriza, hasta el momento en que se les utilice para efectuar cultivos organotípicos u otro experimento (ver Herrera-Marschitz et al. 2011) (ver Figura 2).

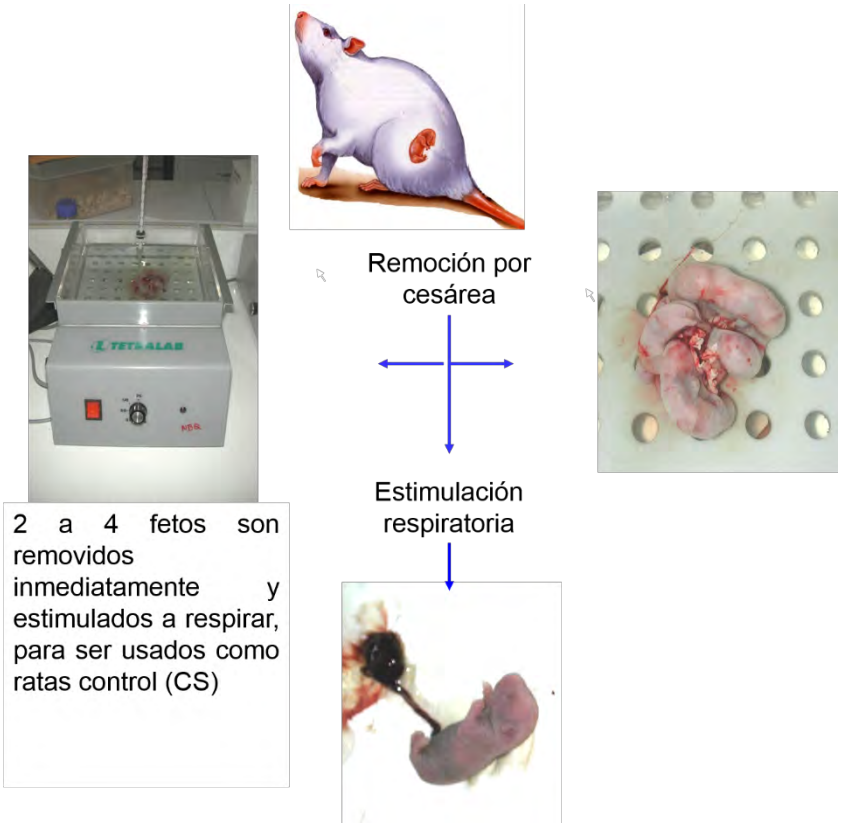


Figura 2: Modelo de asfixia perinatal en ratas.

Ratas Wistar preñadas dentro del último día de gestación (G22) son eutanizadas y sometidas a histerectomía. Dos a tres crías son inmediatamente removidas para ser utilizadas como controles cesárea (CS). El resto de los fetos, dentro del útero, se sumergen en un baño de agua a 37°C durante 21 minutos (AS). Tras la asfixia se les estimula la respiración y las crías se utilizan inmediatamente o se entregan a una madre nodriza en espera de futuros experimentos.

5.2 Protocolo de cultivos organotípicos

Diferentes series de ratas asfícticas y controles de uno a tres días después del nacimiento se utilizan para preparar los cultivos organotípicos. Se extraen los cerebros en el ambiente estéril de una sala de cultivo. Mediante un vibrátomo se obtienen los cortes coronales de mesencéfalo y telencéfalo (300 µm) para disecar SN, Str, y Cx. El tejido disectado se coloca en un cubreobjetos con una capa de plasma de pollo (25 µL, Sigma), que coagula

con trombina bovina (20 µL, Sigma). Los cubreobjetos se transfieren a tubos estériles con fondo plano (*Nunc*), con 0.75 ml medio estándar (Basal Medio Eagle 50%, solución balanceada de sales Hanks 25%, suero de caballo 25% (GIBCO BRL), glucosa 0.5%, L-glutamina 0.5 mM (Sigma), y penicilina/estreptomicina 1% (GIBCO BRL). Los tubos con los cultivos se mantienen a 35°C, CO_2 10% en un incubador celular (Modelo TC2323, ShelLab, USA), con un dispositivo rotador (*Roller*), con cribas para los tubos, exponiendo los cultivos a una fase gaseosa y acuosa cada minuto. Al día de cultivo 3 in vitro (DIV) 3, el medio se cambia por uno libre de suero (neurobasal-A, suplementado con glucosa y B27). El medio se cambia cada 3-4 días (Klavitter et al. 2007).

5.3 Segundo insulto metabólico in vitro

Al DIV 21 los cultivos organotípicos (SN/STR/CX), de ratas asfícticas y control se tratan con H_2O_2 45mM en medio neurobasal-A libre de glucosa durante 18 horas, mantenidos en el *Roller,* dentro de la incubadora, a 35ºC. Posteriormente, se retorna al medio de cultivo estándar por 48 horas.

5.4 Prueba de viabilidad

La prueba de viabilidad se aplica a los cultivos sin fijar. Primero se realiza un lavado con PBS 1X frío. Luego se incuban con kit de citotoxicidad LIVE/DEAD que contiene 1 uL de calceina (2.5 uM) y 4 uL de etidio homodímero (10 uM) diluido en 95 uL de PBS 1X frío. Se incuban los cultivos durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego se lavan durante 3 veces por 2 minutos en PBS 1X frío y se examinan inmediatamente en el campo de un microscopio de epifluorescencia con luz de excitación UV.

5.5 Fijación de cultivos

Los cultivos se fijan en formalina (PF, 4% en PBS) a 4ºC durante 30 minutos y luego de 3 lavados con tampón PBS, se almacenan a 4ºC en PBS.

5.6 Anticuerpos

Anti-MAP-2 (ratón, Sigma, 1:200); anti TH (oveja, Abcam, 1:1000); anti CASP-3 (conejo, Invitrogen Molecular Probes, 1:500)

Como anticuerpos secundarios se utilizan:

Anti ratón (cabra, Alexafluor 594 Abcam, 1:500); anti conejo (cabra, Alexafluor 488 Abcam, 1:400); anti oveja (burro, Alexafluor 647 Abcam, 1:400)

Como contraste nuclear se utiliza:

4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 1:10000)

5.7 Detección inmunocitoquímica

La detección inmunocitoquímica se realiza sobre los cultivos fijados. En la primera etapa se realiza el proceso de lavado de los cultivos, 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS, luego se realiza el procedimiento de bloqueo con BSA 2%, NGS 6,5% y Tritón-X100 0.5% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Posteriormente, se aplica el anticuerpo primario oveja anti TH 1:1000 (ABCAM), diluido en la solución de bloqueo por 24 horas a 4ºC. Posterior a lavados, se aplica el anticuerpo secundario burro anti oveja-647 (Jackson) a una dilución 1:400 durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitador. Se lava 5 veces durante 1 minuto con BSA 0,5%, NGS 1,5% y Tritón-X100 0,5% en PBS a temperatura ambiente en agitador. Se post fija con PF (4% en PBS) durante 15 minutos. Se lava 5X durante 1 minuto con PBS para luego bloquear con BSA 2%, NGS 6,5% y Tritón-X100 en PBS durante 60 minutos en agitador. Se aplica anticuerpo primario conejo α CASP-3 1:500, en solución de bloqueo por 24 horas a 4ºC. Luego de lavar 3X durante 5 minutos con BSA 0.5%, NGS 1,5% y Tritón-X100 0,5% en PBS a temperatura ambiente, se aplica anticuerpo secundario cabra anti conejo 488

(Jackson) diluido en BSA 0,5%, NGS 1,5% y Tritón-X100 0,5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador. Posterior a lavados de 5X durante 1 minuto con BSA 0,5%, NGS 1,5% y Tritón-X100 0,5% en PBS a temperatura ambiente en agitador, se fija nuevamente con PF (4% en PBS) durante 15 minutos. Se lava 5X durante 1 minuto con PBS para luego bloquear con BSA 2%, NGS 6,5% y Tritón-X100 en PBS durante 60 minutos en agitador. Se aplica anticuerpo primario ratón α MAP-2 1:200, en solución de bloqueo por 24 horas a 4ºC. Luego de lavar 3X durante 5 minutos con BSA 0.5%, NGS 1,5% y Tritón-X100 0,5% en PBS a temperatura ambiente, se aplica anticuerpo secundario cabra anti ratón 594 (Jackson) diluido en BSA 0,5%, NGS 1,5% y Tritón-X100 0,5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador. Luego, se lava 3X durante 5 minutos con PBS. Entonces, los cultivos se montan sobre un portaobjetos agregando 80 µL de medio de montaje (Fluoromount-G, Electron Microscopy Science), se cubren con un cubreobjeto y almacenan a 4ºC en oscuridad (ver Figura 3)(Morales et al. 2005).

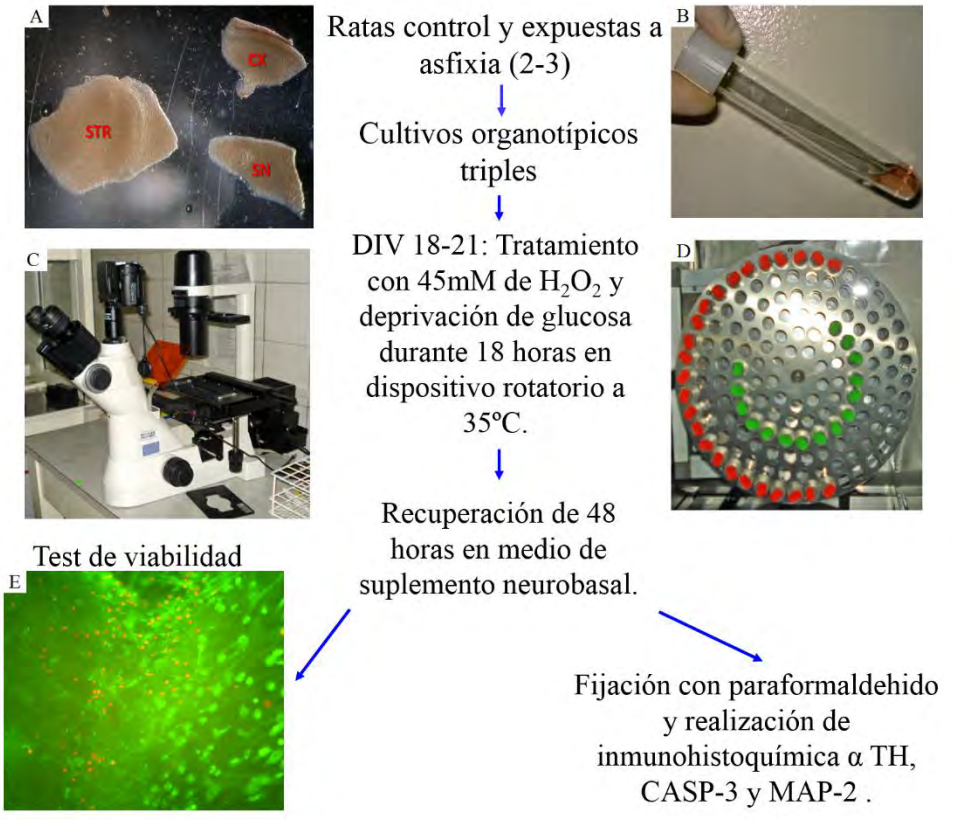


Figura 3: Diseño experimental

A. Tejido de sustancia nigra (SN), estriado (Str) y corteza (Cx) se selecciona, diseca y monta sobre un coverslip. B. El coverslip con el tejido se inserta en un tubo Nunc™ con base plana con 750 µl de medio de cultivo. C. Los tubos con los cultivos se colocan en un dispositivo rotatorio con cribas denominado Roller. D. El desarrollo in vitro de los cultivos se evalua con un microscopio invertido equipado con epifluorescencia y óptica Hoffmann (Nikon T100). E. Microfotografía de un triple cultivo organotípico tratado con el kit (L3224) de LIVE/DEAD Viabilidad/Citotoxicidad, a DIV 18, mostrando células vivas (verde) y muertas (rojo).

5.8 Microscopia confocal y cuantificación estereológica

La visualización de las muestras se realiza en un microscopio confocal Olympus (Fv10i; Tokyo). Las células positivas para MAP-2, TH, CASP-3 y/o DAPI se cuentan utilizando la técnica óptica "*disector*", descrita en detalle por Gundersen et al. (1988; Ver Morales et al.

2005; 2008). Brevemente, Las células positivas para MAP-2, DAPI y CASP3 se observan a medida que aparecen en foco mientras se escanea a través del campo en el eje Z. La altura del "*disector*" (h) se fija a 10 µm. Los núcleos ubicados dentro de los 3 primeros µm no se contabilizan. Se programa un área que define al cultivo y se mide a través del software imageJ 1.32 (Morales et al 2005, 2008). Una vez obtenidas las fotos se contabilizan las células positivas para el antígeno buscado, colocalizado con DAPI. Se selecciona entre 10-20 imágenes para crear un stack bidimensional. Luego, cada stack es analizado y editado en el programa FluoView a fin de facilitar el recuento con ImageJ.

Primero, se selecciona el tipo de célula que desea contar marcándola con un color específico y luego se cuenta haciendo clic en la imagen. Un número de color correspondiente al tipo de célula aparece en la imagen cada vez que se hace clic. El número final aparece en una columna a la derecha de la imagen.

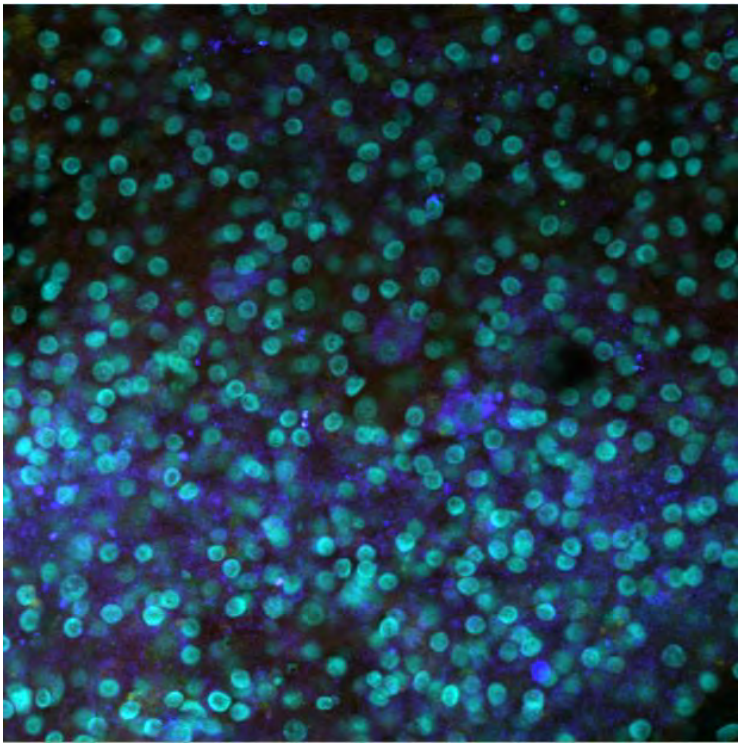


Figura 4: Neuronas dopaminérgicas en cultivos organotípicos

La imagen muestra una microfotografía obtenida con microscopio confocal de una sección de un cultivo organotípico de un animal control, fijado a DIV 22, y tratado con DAPI

(celeste) para visualizar núcleos, e inmunocitoquímica, para visualizar proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), como marcador de neuronas maduras (rojo); tirosina hydroxylasa (TH), como marcador de neuronas dopaminérgicas (azul), y caspasa 3 (CASP-3), como marcador de apoptosis (verde). La microfotografia es de la región mesencefálica del cultivo. Se observa un gran número de núcleos celulares, la mayoría de ellos positivos a MAP-2, y algunas células iniciando un proceso apoptótico. Se aprecia un conglomerado de células positivas a TH, posiblemente localizadas en la pars compacta del mesencéfalo.

5.9 Datos estadísticos

Todos los resultados se expresan como promedios de la respectiva observación en cada uno de los grupos ± las respectivas SEM. Las comparaciones se evaluaron con F-ANOVA, seguidas de un post hoc test (Dunn). Se considera el nivel $p<0.05$ como crítico para aceptar una diferencia entre grupos como estadísticamente significativa.

Resultados

Se cuantificó el número de neuronas dopaminérgicas apoptóticas, en cultivos que han sufrido un segundo insulto metabólico (CSI y ASI) y en cultivos organotípicos controles evaluando separadamente SN, Str y Cx. Como control se utilizó cultivos sin segundo insulto, de animales asfícticos (ASC) y controles nacidos por cesárea (CSC), procesados mediante los protocolos descritos en la metodología. Con estos resultados se comparó los datos de los cultivos insultados versus no insultados, verificando la significación de las diferencias con el test one way F-ANOVA de comparaciones múltiples.

Los gráficos presentados describen la apoptosis en las 3 áreas de interés y la comparación específica de neuronas dopaminérgicas en SN. Los resultados obtenidos tras la aplicación de un test de viabilidad celular muestran que la SN es el área más vulnerable a un segundo insulto (ver figura 6), aun cuando la diferencia entre la muerte de neuronas dopaminérgicas no alcanza el nivel de significación estadística (ver figura 10). Se cuantificó el efecto del segundo insulto sobre dichas neuronas, no habiendo diferencias significativas entre las neuronas dopaminérgicas provenientes de ratas controles o sometidas a asfixia (ver figura 11).

Las imágenes captadas mediante microscopía confocal revelan que la morfología y citoarquitectura tisular disminuye en el grupo asfíctico respecto al control no sometido a AP. De igual manera, el insulto recurrente induce una pérdida notable de la mantención de la citoarquitectura tisular, siendo más dificultosa la observación de los cambios morfológicos que presenta el cultivo, especialmente en SN y Cx (ver figura 7 y 8); efecto no observado al analizar el Str (ver figura 9).

Se cuantificó además el número de células por mm^3 en base a núcleos DAPI (+), observando que el insulto recurrente genera pérdida celular en SN y Cx, tanto en cultivos de animales asfícticos y controles. Interesantemente, este efecto no se observó tras el análisis del STR, en donde el efecto de pérdida celular se remite exclusivamente al grupo sometido a asfixia (cultivos AS) (ver figura 12). También se evaluó presencia de cuerpos apoptóticos concomitante con la marcación CASP-3 (+), observándose que el número de

cuerpos apoptóticos es mayor tanto en el grupo control y en el grupo asfíctico tras el tratamiento con el segundo insulto metabólico (ver figura 13).

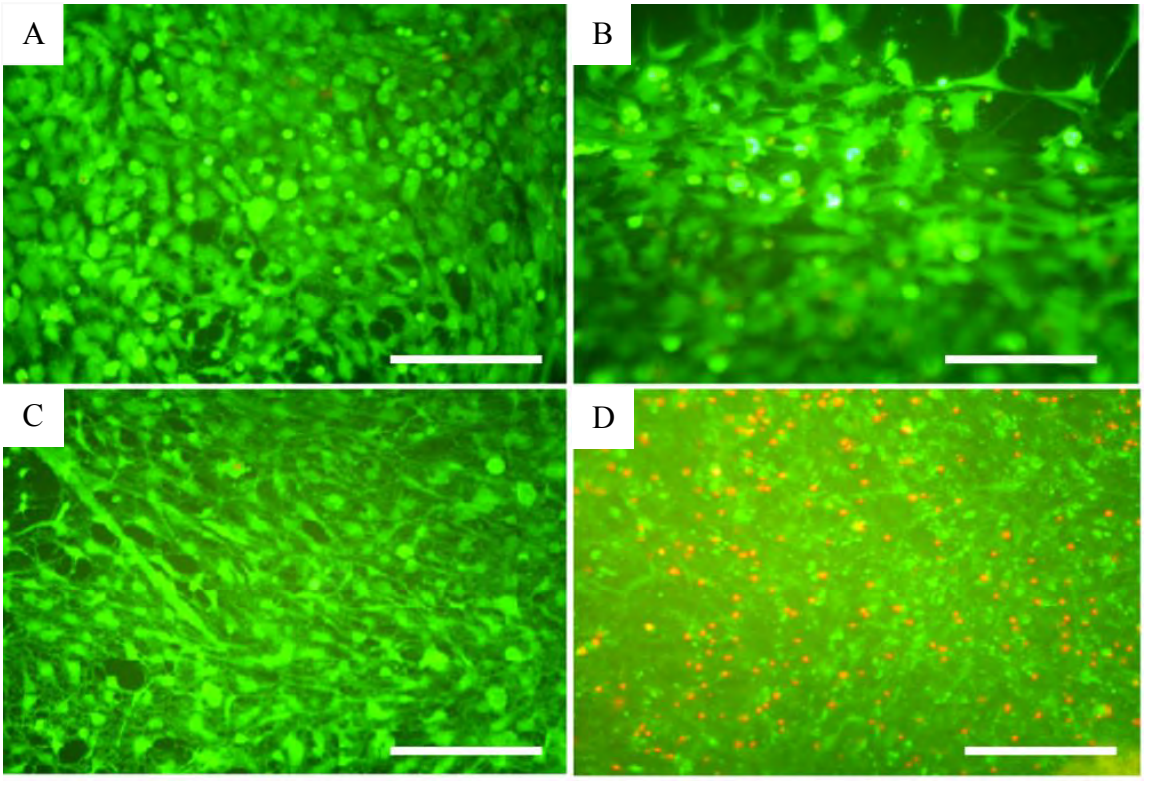


Figura 5: Un insulto recurrente aumenta la muerte celular en cultivos organotípicos, de animales sometidos a asfixia perinatal y controles.

Los cultivos fueron tratados con un test de viabilidad celular (DIV 19-22), marcando en verde celulas vivas y en rojo celulas en proceso de muerte. En A, cultivo de animal control (CSC), en el que no se aprecian células en proceso de muerte. En C, cultivo de animal asfictico, en el que se observan algunas células en proceso de muerte. En B, cultivo de animal control sometidos a un segundo insulto. En D, cultivo de animal asfictico sometido a un segundo insulto. Se contabilizó directamente con un microscopio invertido y epifluorescencia las células muertas (fluorescencia roja) a 40X (barra de escala: 50 um).

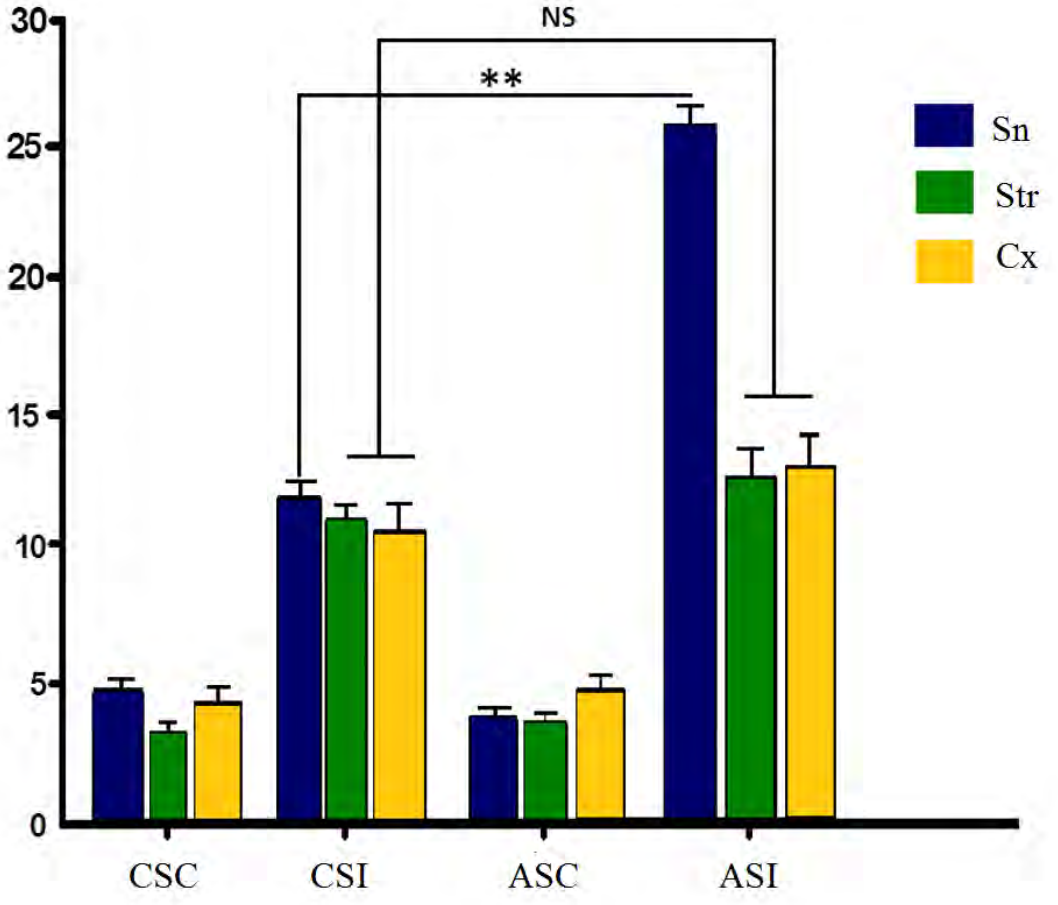


Figura 6: Asfixia Perinatal induce muerte celular tras un segundo insulto metabólico en sustancia nigra.

Análisis densitométrico del porcentaje total de células positivas para EThD-1 (Etidio homodímero) en cada zona (SN, Str y Cx) por campo. Se observó un incremento de células muertas en los grupos controles y asfixiados sometidos a un segundo insulto en todas las regiones analizadas, respecto a los grupos con un solo insulto. Las mayores diferencias se observaron e la SN del grupo ASI.

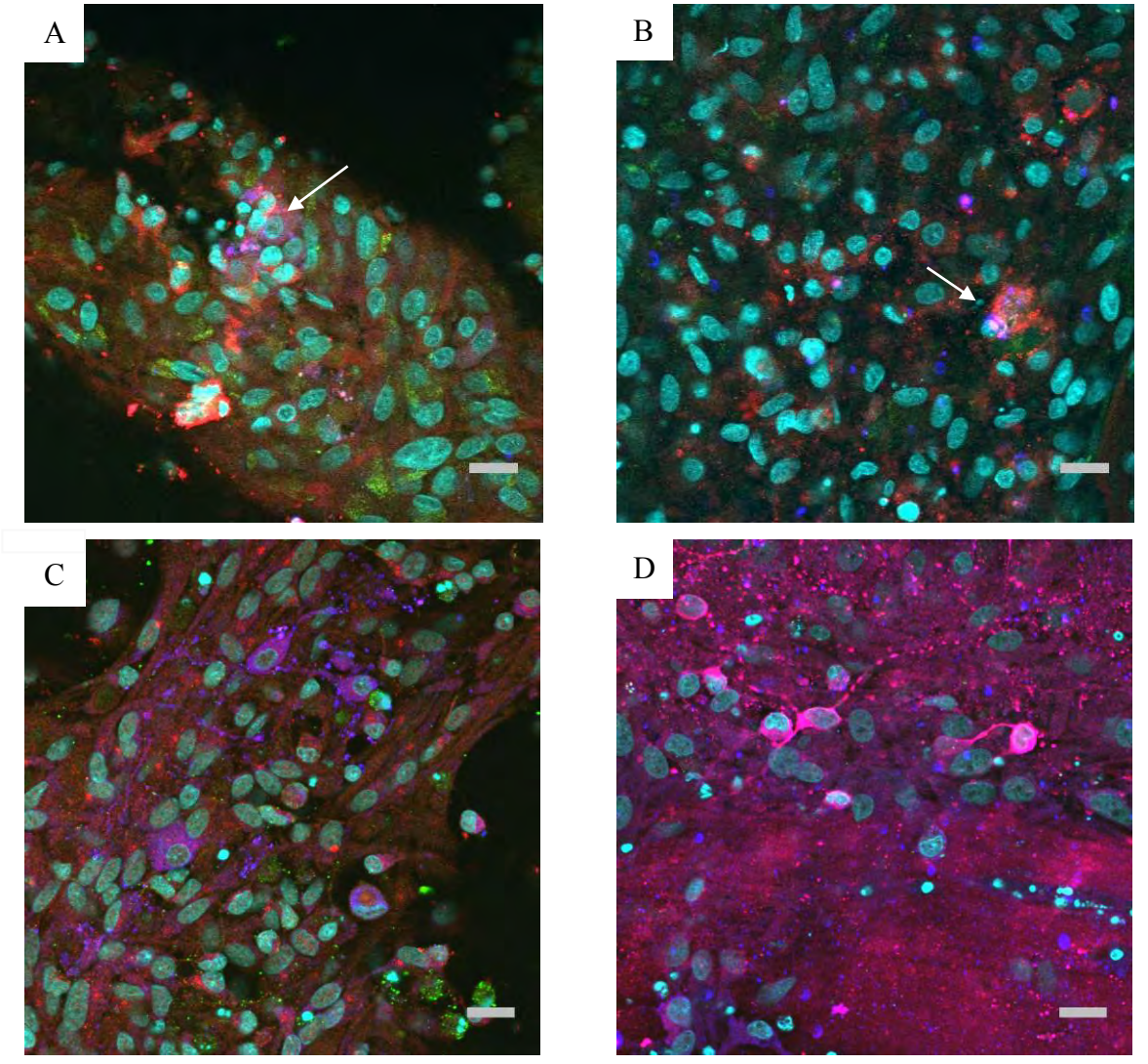


Figura 7: Asfixia perinatal induce cambios en la expresión de proteínas pro-apoptóticas en SN de cultivos organotípicos expuestos a un segundo insulto metabólico.

Microfotografías de la región mesencefálica, específicamente sustancia nigra (SN), obtenidas con microscopio confocal de cultivos fijados a DIV 22, y tratado con DAPI (celeste) para visualizar núcleos, e inmunocitoquímica, para visualizar proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), como marcador de neuronas maduras (rojo); tirosina hidroxilasa (TH), como marcador de neuronas dopaminérgicas (azul), y caspasa 3 (CASP-3), como marcador de apoptosis (verde). . En A, imagen representativa de cultivo de animal control

(CSC) que muestra la presencia de neuronas positivas para DAPI, MAP-2, TH y CASP-3. La flecha blanca indica la presencia de una neurona dopaminérgica normal. En B, grupo control insultado (CSI). La imagen muestra neuronas positivas para DAPI, MAP-2, CASP-3 y TH indicando que el segundo insulto provoca muerte en neuronas de este grupo, afectando la morfología e inmunomarcaje. En C, grupo asfíctico no insultado (ASC). Se observa positividad para DAPI, MAP-2, TH y CASP-3 en una proporción cualitativamente mayor respecto a A. En D, grupo asfíctico insultado, que muestra marcaje positivo para DAPI, MAP-2, CASP-3 y TH, que es proporcionalmente mayor respecto a A, B y C, indicando que el segundo insulto genera mayor muerte celular en cultivos de animal asfíctico. Además, se observa la pérdida de citoarquitectura y destrucción tisular, reflejado en una mayor cantidad de *background* respecto a CSC y ASC. Se observa diferencias en el tamaño nuclear entre CSI, ASC, ASI y CSC. Microscopía confocal, aumento 60X. Barra de escala 20 um.

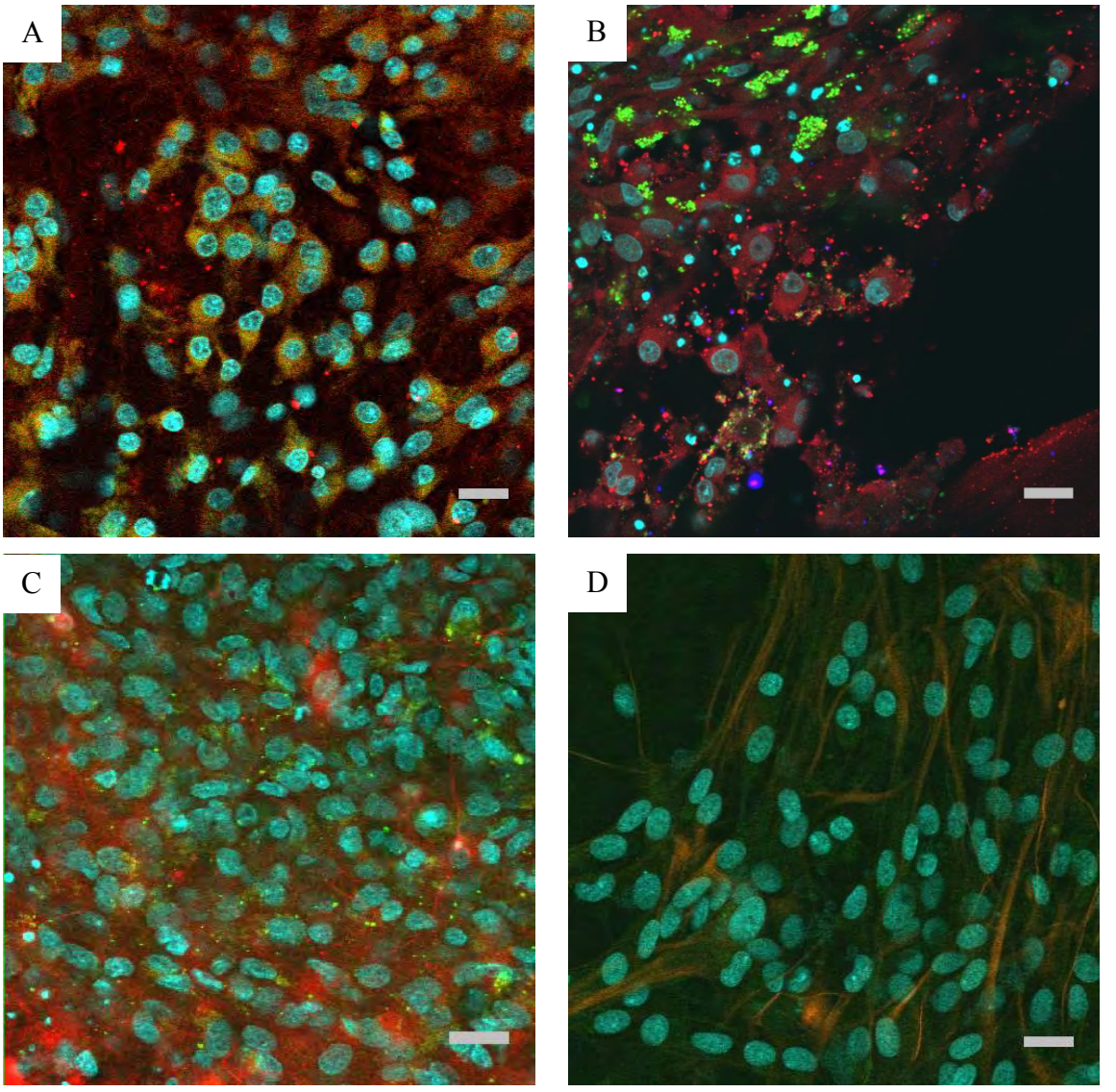


Figura 8: Asfixia perinatal induce cambios en la expresión de proteínas pro-apoptóticas en Cx de cultivos organotípicos expuestos a un segundo insulto metabólico.

Microfotografías de neocorteza (Cx), obtenidas con microscopio confocal de cultivos fijados a DIV 22, y tratado con DAPI (celeste) para visualizar núcleos, e inmunocitoquímica, para visualizar proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), como marcador de neuronas maduras (rojo); tirosina hidroxilasa (TH), como marcador de neuronas dopaminérgicas (azul), y caspasa 3 (CASP-3), como marcador de apoptosis (verde). En. A, imagen representativa de cultivo de animal control (CSC), marcando neuronas positivas para DAPI, MAP-2 y CASP-3. El cultivo se ve homogéneo con células con clara morfología neuronal. En B, grupo control insultado (CSI). La imagen muestra

colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3, indicando que el segundo insulto provoca muerte neuronal. En C, grupo asfíctico no insultado (ASC). Se observa colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3. En D, grupo asfíctico insultado (ASI), colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3, que no es, sin embargo, cualitativamente mayor respecto a su control (C). Microscopía confocal, aumento 60X. Barra de escala 20 um.

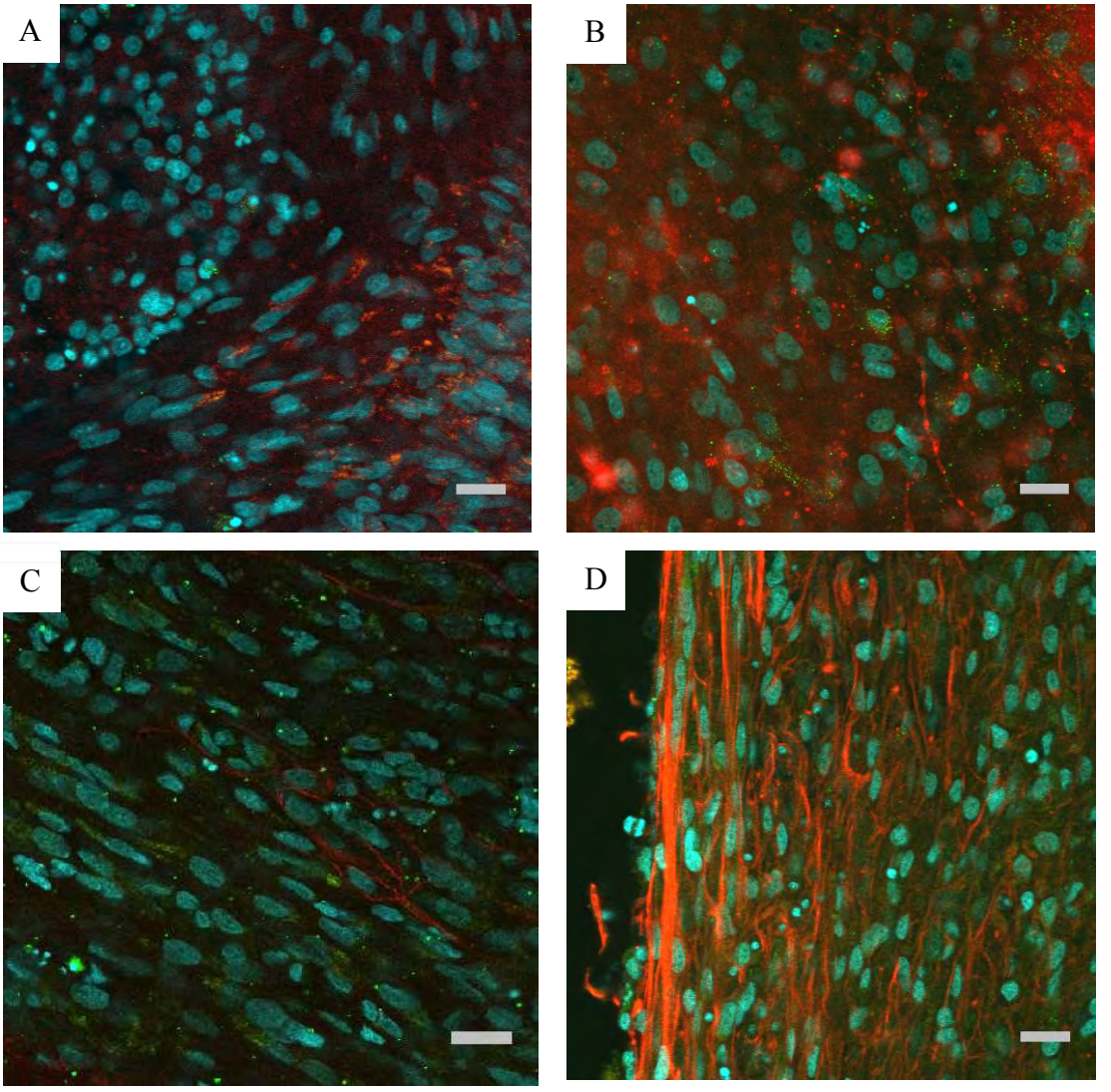
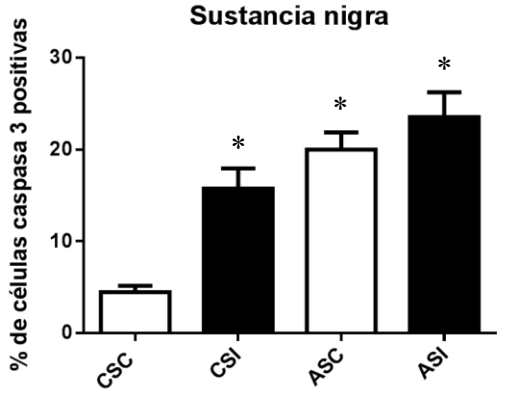


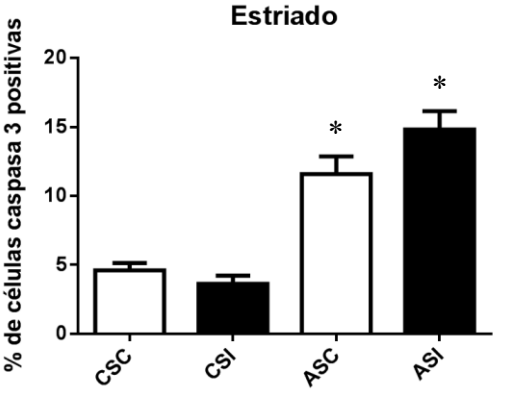
Figura 9: Asfixia perinatal induce cambios en la expresión de proteínas pro-apoptóticas en Str de cultivos organotípicos expuestos a un segundo insulto metabólico.

Microfotografías de neoestriado (Str) obtenidas con microscopio confocal de cultivos fijados a DIV 22, y tratado con DAPI (celeste) para visualizar núcleos, e inmunocitoquímica, para visualizar proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), como marcador de neuronas maduras (rojo); tirosina hidroxilasa (TH), como marcador de neuronas dopaminérgicas (azul), y caspasa 3 (CASP-3), como marcador de apoptosis (verde). En A, imagen representativa de cultivo de animal control (CSC) que muestra colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3. Se observan algunas células en proceso de muerte. En B, grupo control insultado (CSI). La imagen muestra colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3, mostrando prolongaciones neuronales y una elevada presencia de

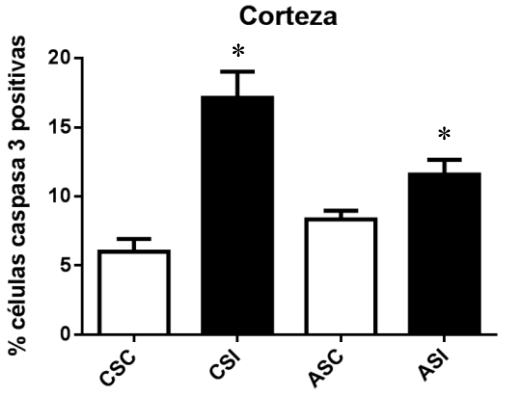
células en apoptosis, indicando que el segundo insulto provoca muerte en neuronas de Str. En C, grupo asfíctico no insultado (ASC). Se observa colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3, algunas prolongaciones neuronales y muchas células que se encuentran en algún estadío apoptótico. En D, grupo asfíctico insultado (ASI), colocalización de DAPI, MAP-2 y CASP-3, mostrando prolongaciones neuronales y gran proporción de células muertas. Microscopía confocal, aumento 60X. Barra de escala 20 um.



A



B

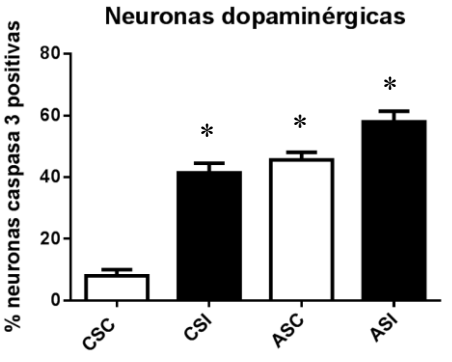


C

Figura 10: Comparación porcentual de células caspasa 3 positivas en SN, Str y Cx.

Cuantificación de células positivas a CASP-3 en cultivos organotípicos triples a DIV 22 de animales control (CSC), control insultado (CSI), asfícticos (ASC) y asfícticos insultados (ASI). En A, sustancia nigra, el grupo ASI presenta una mayor tasa apoptótica, comparado con el grupo CSI, de acuerdo a la comparación entre los grupos control, CSC y ASC. El efecto del segundo insulto incrementa la actividad apoptótica en SN. En B, estriado, los grupos ASC y ASI presentan una tasa apoptótica mayor que CSC y CSI. En C, neocortex, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ASI y CSI versus CSC (n=5 en los cuatro grupos estudiados). *$p<0.05$; comparado con el control correspondiente (F-ANOVA, seguido de test de Dunn).

A



B

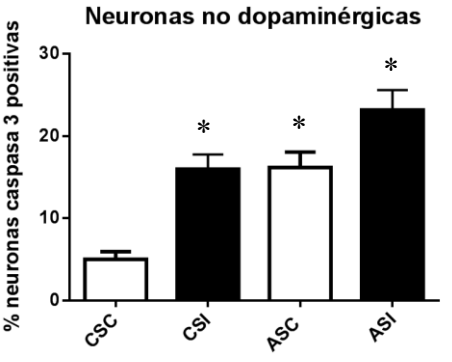
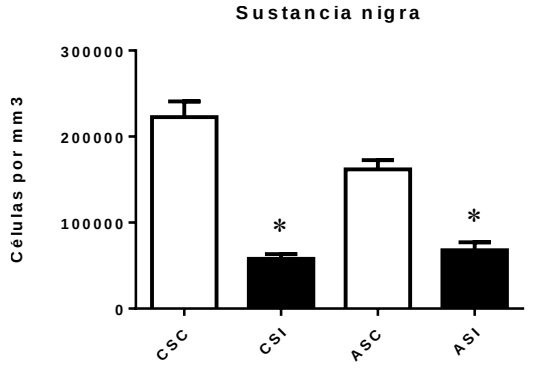


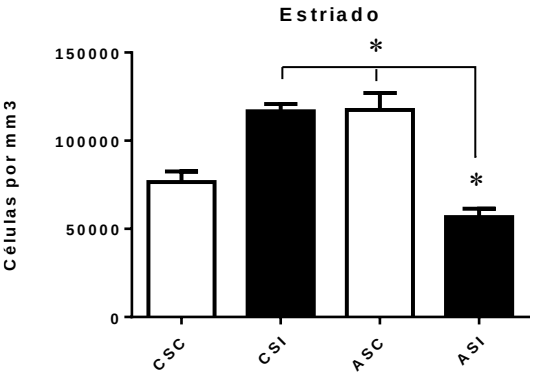
Figura 11: Comparación porcentual de neuronas dopaminérgicas positivas a caspasa 3.

Cuantificación de neuronas dopaminérgicas positivas a CASP-3 en cultivos organotípicos triples, DIV 22, de animales control (CSC), control insultado (CSI), asfícticos (ASC) y asfícticos insultados (ASI). En A, existe una diferencia significativa en CSI, ASC y ASI versus CSC. En, B, existe una diferencia significativa en CSI, ASC y ASI versus CSC. (n=5 en los cuatro grupos estudiados). *$p<0.05$; comparado con el control correspondiente (F-ANOVA, seguido de test de Dunn).

A



B



C

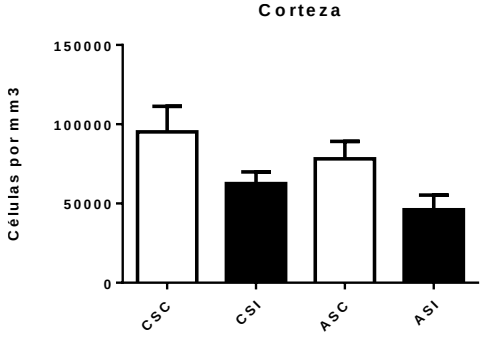


Figura 12: Número de células por mm3 en SN, Str y Cx.

Cuantificación de células DAPI positivas en cultivos organotípicos triples, DIV 22, de animales control (CSC), control insultado (CSI), asfícticos (ASC) y asfícticos insultados (ASI). (n=5 en los cuatro grupos estudiados).

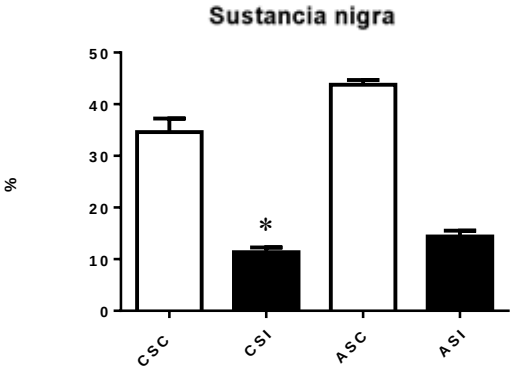


Figura 13: Comparación porcentual de cuerpos apoptóticos en SN.

Cuantificación de cuerpos apoptóticos CASP-3 positivos en cultivos organotípicos triples a DIV 22 de animales control (CSC) , control insultado (CSI), asfícticos (ASC) y asfícticos insultados (ASI). Datos obtenidos en base a la observación morfológica para las células CASP-3 (+). Existe una diferencia significativa entre los grupos control y grupos insultados respecto a la presencia de cuerpos apoptóticos. (n=5 en los cuatro grupos estudiados). *$p<0.05$; comparado con el control correspondiente (F-ANOVA, seguido de test de Dunn).

Discusión

Los resultados obtenidos del análisis de cultivos organotípicos indican que existe vulnerabilidad selectiva en SN, demostrando que un insulto recurrente daña a los cultivos diferencialmente (ver figura 5 y 6). Los datos concuerdan con la susceptibilidad descrita de las neuronas a cambios homeostáticos, como variaciones osmóticas, hipoglicemia, y estrés oxidativo (Singh et al. 2004; Auer et al. 2004). En ese contexto, el análisis permite establecer que las células del sistema nervioso poseen mecanismos diferenciales para enfrentar injurias postnatales.

En SN, se cuantificó las células positivas para DAPI, encontrando que el efecto de un segundo insulto provoca disminución significativa en el número de células de los grupos expuestos (ver figura 12 A), que está de acuerdo con lo expuesto en las figura 6. En CSC, se observó presencia de neuronas positivas para DAPI, MAP-2, TH y CASP-3, con escasa colocalización MAP-2, TH y CASP-3, lo que se correlaciona con el comportamiento esperado (figura 7 A; 10 A). En CSI, se observó aumento de colocalización, indicando que el insulto provocó aumento en la muerte celular, afectando la morfología e inmunomarcaje, ya que existe diferencia significante entre CSC y CSI (figura 7 B; 10 A), específicamente en neuronas dopaminérgicas (figura 11 A), confirmando que el efecto provocado al grupo CSI es homologable a un insulto recurrente. En ASC, se observó colocalización para DAPI, MAP-2, TH y CASP-3 en una proporción cualitativa y cuantitativamente mayor respecto a CSC, confirmando el efecto de AP y se observó diferencias significantes entre CSC y ASC ((figura 7 C; 10 A), específicamente en el número de neuronas dopaminérgicas (figura 11 A). En ASI, se observó colocalización para DAPI, MAP-2, TH y CASP-3 en una proporción cualitativa y cuantitativamente mayor respecto a ASC, además se observó deterioro tisular, evidente por el *background* observado, confirmando la idea de que el efecto del insulto recurrente se suma al provocado inicialmente por la AP, generando una

pérdida de la citoarquitectura y mayor muerte celular (figura 7 D; 10 A), específicamente en perdida de neuronas dopaminérgicas (figura 11 A).
En SN, se cuantificó además los cuerpos apoptóticos, concomitante con la expresión de CASP-3 (figura 13), observando diferencias significativas entre los grupos insultados versus sus controles.

En Str, se contabilizó células positivas para DAPI, encontrando que el efecto de un segundo insulto en CSI provocó aumento significativo en el número de células respecto a CSC, lo que se explicaría por proliferación astrocitaria. Sin embargo, el efecto de un segundo insulto en ASI provocó una disminución significativa en el número de células respecto a ASC y CSC (figura 12 B), demostrando que el efecto de un insulto recurrente causa pérdida celular en Str, comportamiento que está de acuerdo con lo expuesto en las figura 6. En CSC, se observó presencia de neuronas positivas para DAPI, MAP-2 y CASP-3, con escasa colocalización, lo que se correlaciona con el comportamiento esperado. (figura 8 A; 10 B). En CSI se observó escasa colocalización, indicando que el insulto no provocó aumento en la muerte celular, indicando que Str cumplió con un tiempo de maduración que le permite sopesar los efectos de un insulto metabólico (figura 8 B; 10 A).
En ASC se observó colocalización en una proporción cualitativa y cuantitativamente mayor respecto a ASC, indicando que Str es vulnerable a los efectos de AP, ya que existe diferencia significante entre CSC y ASI (figura 8 C; 10 A). En ASI, se observó colocalización para DAPI, MAP-2 y CASP-3 en una proporción cualitativa y cuantitativamente mayor respecto a ASC (figura 8 D; 10 A).

En Cx, se cuantificó células DAPI positivas, observando que no existe diferencias significativas en términos de número total de células entre los grupos. En CSC, se observó colocalización de DAPI y MAP-2 en todos los casos de acuerdo con clara morfología neuronal, y en ocasiones con CASP-3 (figura 9 A; 10 C). En CSI, se observó aumento de muerte neuronal, comparado con CSC (figura 9). En ASC, se observó colocalización en una proporción cualitativa y cuantitativamente mayor respecto a CSC (figura 9; 10 C), confirmando que Cx es vulnerable al efecto provocado por AP. En ASI, se observó

colocalización para DAPI, MAP-2 y CASP-3 en una proporción cualitativa y cuantitativamente mayor respecto a ASC, sin embargo, a pesar de que existe una diferencia morfológica respecto a ASC (Figura 9), la diferencia en muerte celular entre ambos grupos no alcanzó el nivel de significación (figura 10 C).

Se ha demostrado que H_2O_2 desregula los patrones de descarga neuronales (Avshalumov et al., 2005), induciendo apoptosis (Langeweld et al. 1995). Así, en este estudio se utilizó una alta concentración de H_2O_2 y deprivación de glucosa para simular un insulto metabólico. La combinación de H_2O_2 e hipoglicemia produce stress oxidativo, y disminución de la biodisponibilidad de ATP, contingente con el alto requerimiento energético inherente a la expresión y activación enzimática durante la apoptosis (Azbill et al. 1997), retardando el restablecimiento apropiado de las condiciones homeostáticas en neuronas, generando una condición en la que se mantienen abiertos los canales de K^+, generando despolarización, y activación de otros canales catiónicos de la membrana plasmática, agravando la crisis energética, resultando en muerte celular (ver Shieh et al. 2000). Debido a que esta condición es de alta agresividad para la célula, genera una muerte tipo necrótica, sin tiempo para generar una muerte programada de tipo apoptótico.

Los resultados de este estudio están de acuerdo con la idea de que las neuronas dopaminérgicas son susceptibles a cambios homeostáticos, por que se caracterizan por un alto *turn-over* y consumo de energía (Farnebo 1971), y requerimientos energéticos (Chan et al. 1994; Zeevalk et al. 2002; Liss et al. 2005; Sulzer et al. 2007), y durante la etapa neonatal inmadurez en las defensas antioxidantes (ver Delivoria-Papadopoulos et al. 1998; Herrera-Marschitz et al. 2014). De esta forma, la SN constituye un blanco terapéutico para subsanar los efectos deletéreos provocados por la asfixia. La vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a fallas metabólicas y estrés oxidativo es característica de numerosas enfermedades neuropsiquiátricas. Por otra parte, las neuronas dopaminérgicas son necesarias para el desarrollo de otras áreas del cerebro y la pérdida de su proyección generaría una reacción en cadena, culminando en alteraciones de desarrollo neurogénico e incluso trastornos psiquiátricos. Por lo tanto, el efecto de un segundo insulto podría

promover mayores cambios morfológicos o alteraciones funcionales en individuos afectados por AP.

Los resultados obtenidos con la expresión de CASP-3 no están de acuerdo con perdida de viabilidad celular observada en el grupo ASI. Sin embargo, la proteína CASP-3 se cliva al ser activada directamente por caspasa 8, que a su vez se activa FasL, Apo2L/Apo3L y TNFα. Por lo tanto se sugiere estudiar otras vías de apoptosis independientes de CASP-3, como caspasa 7, NF-KB, MMP, EndoG y/o AIF. En efecto, todos los insultos metabólicos producen estrés oxidativo (Freidovich 1999; Yun-Zhong et al. 2002), que se manifiesta a través de múltiples vías apoptóticas. La presencia diferencial de cuerpos apoptóticos entre los grupos insultados respecto a los controles avala la teoría de que se debe evaluar en mayor detalle otras vías apoptóticas, que culminan en muerte celular. Sin embargo, el tiempo de respuesta ante la injuria es un gatillante importante de la presencia de cuerpos apoptóticos en los distintos cultivos analizados. Por ejemplo, la vía intrínseca mitocondrial está relacionada a la disfunción mitocondrial, activación de citocromo *c* y elevadas concentraciones de Ca^{2+} (Budd et al. 1998). De acuerdo a lo anterior, se ha demostrado que altas concentraciones citosólicas de Ca^{2+} son tóxicas, conduciendo a muerte celular y necrosis (Zipfel et al. 2009). Todo esto avala el análisis profundo de la(s) vía(s) de señalización de apoptosis que conducen a una muerte celular específica de las neuronas dopaminérgicas, el cual podría abrir nuevas alternativas de protección para estas neuronas, que cumplen un rol fundamental en el desarrollo del sistema nervioso. Hasta ahora, la única terapia clínicamente probada contra AP, es la inducción de hipotermia en los recién nacidos, sin embargo se sabe que la ventana terapéutica para la hipotermia es estrecha (Engidawork et al. 2001; ver Wassink et al. 2014), por lo que se necesitan estrategias con mayor espectro temporal y especificidad celular.

Limitantes

Es destacable que la observación de los cultivos fue más dificultosa en los grupos sometidos a estrés oxidativo e hipoglicemia, ya que hipoglicemia y estrés oxidativo están estrechamente relacionados, lo que resulta en peroxidación lipídica, daño al ADN y muerte

celular (Singh et al. 2004), afectando con ello la inmunorreactividad y expresión de proteínas, afectando el análisis estereológico de los cultivos. Otra limitante es el tiempo que transcurre desde la fijación de los cultivos, hasta la realización de los inmunomarcajes. Su almacenaje va produciendo un efecto deletéreo en los cultivos, afectando la interpretación correcta en cuanto a número y proporción de células, sugiriendo que el estudio de neuronas dopaminérgicas debe ser abordado desde un punto de vista más específico, como con cultivos primarios.

El cultivo organotípico tiene un tiempo limitado de vida y los tiempos de desarrollo celular son distintos debido a que los reactivos utilizados aceleran el desarrollo con el objetivo de mantener las células vivas en un ambiente *ex vivo*, además, el cultivo celular no representa la tridimensionalidad ni la totalidad de las interconexiones neuronales, una limitante para lograr analizar el comportamiento real de los tejidos.

Proyecciones de estudio

Como ya fue comentado, las neuronas dopaminérgicas son un objetivo de estudio debido a que presentan alto grado de diferenciación y especificidad, además de un alto estrés oxidativo y variaciones de los niveles normales de glucosa y cumplen un rol pivotal en varios trastornos neurodegenerativos y sistémicos, por lo tanto se sugiere un abordaje más específico, evaluando en detalle lo que ocurre con ellas, por ejemplo, un cultivo primario de neuronas dopaminérgicas, midiendo con exactitud los niveles totales de la proteína CASP-3 con un ensayo Western blot y q-PCR, permitiendo correlacionar el aumento de esta enzima con la expresión génica de otros marcadores de muerte celular.

Conclusiones

AP y un segundo insulto metabólico no aumentan la activación de la apoptosis mediada por CASP-3 en neuronas dopaminérgicas respecto a otras células de SN, por lo que es necesario abordar el estudio a través de las distintas etapas del desarrollo.

Por lo tanto, la conclusión final es que el efecto de un segundo insulto se supedita a las condiciones, grado y tiempo de hipoxia al cual se sometan al nacer.

Referencias

Andén N-E, Fuxe K, Hamberger B, Hokfelt T (1966) A quantitative study on the nigrostriatal dopamine neuron system in the rat brain. Acta Physiologica Scandinava 67: 306-312

Andersen JK (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Nature Medicine 10: 18-25.

Andreazza A, Kauer-Sant'Anna M, Frey B, Bond D, Kapczinski F, Young T, Yatham L (2008). Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. Journal of Affective Disorders 11: 135-144.

Auer R (2004). Hypoglycemic brain damage. Forensic Science International 146: 105-110.

Avshalumov M, Chen B, Koos T, Tepper J, Rice M (2005). Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. The Journal of Neuroscience 25: 4222-4231.

Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE (1997). Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. Brain Research 765: 283-90.

Azzopardi D, Strohm B, Edwards D, Dyet L, Halliday H, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Marlow N, Porter E, Thoresen M, Whitelaw A, Brocklehurst P (2009). Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. The New England Journal of Medicine 361: 1349-1358.

Bains J, Shaw C (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. Brain Research Reviews 25: 335-358.

Barkovich AJ, Truwit CL (1990). Brain damage from perinatal asphyxia: correlation of MR findings with gestational age. AJNR Am Journal of Neuroradiology 11: 1087-1096. Bickler PE, Fahlman CS, Ferriero DM. (2004). Hypoxia increases calcium flux through cortical neuron glutamate receptors via protein kinase C. Journal of Neurochemistry 88: 878-884.

Budd S (1998). Mechanisms of neuronal damage in Brain Hypoxia-Ischemia: Focus on the Role of mitochondrial calcium accumulation. Pharmacology & Therapeutics 80: 203-229.

Chan P, Di Monte D, Luo J, DeLanney L, Irwin I, Langston W (1994). Rapid ATP Loss Caused by Methamphetamine in the Mouse Striatum: Relationship Between Energy Impairment and Dopaminergic Neurotoxicity. Journal of Neurochemistry 62(6): 24842487.

Chiappe-Gutierrez M, Kitzmueller E, Labudova O, Fuerst G, Hoeger H, Hardmeier R, Nohl H, Gille L, Lubec B (1998). mRNA Levels of the hypoxia inducible factor (HIF-1) and DNA repair genes in perinatal asphyxia of the rat. Life Sciences 63: 1157-1167.

Compagnoni G, Pogliani L, Lista G, Castoldi F, Fontana P, Mosca F (2002). Hypothermia reduces neurological damage in asphyxiated newborn infants. Neonatology 82: 222-227.

Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP (1998). Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. The Journal of Pediatrics 132: 30-34.

Dell'Anna E, Chen Y, Loidl F, Andersson K, Luthman J, Goiny M, Rawal R, Lindgren T, Herrera-Marschitz M (1995). Short-term effects of perinatal asphyxia studied with fosimmunocytochemistry and in vivo microdyalisis in the rat. Experimental Neurology 131:
279-287.

Dix TA, Kuhn DM, Benkovic SJ (1987). Mechanism of oxygen activation by tyrosine hydroxylase. Biochemistry 26: 3354-3361.

Edwards A, Mehmet H (2008). Apoptosis in perinatal hypoxic-ischaemic cerebral damage. Neuropathology and Applied Neurobiology 22: 494-498.

Farnebo LO (1971). Release of monoamines evoked by field stimulation: studies on some ionic and metabolic requirements. Acta Physiologica Scandinava Supplementum 371: 19-27.

Farooqui A, Farooqui T, Panza F, Frisardi V (2012). Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. Cellular and Molecular Life Sciences 69: 741-762.

Fenichel G (1983). Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy in the Newborn. JAMA Neurology 40: 261-266.

Finkel, T, Holbrook N (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408, 239-247.

Floyd R, Hensley K (2002). Oxidative stress in brain aging: Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging 23: 795-807.

Foley ME, Alarab M, Daly L, Keane D, Macquillan K, O'Herlihy C (2005). Term neonatal asphyxia seizures and peripartum deaths: Lack correlation with a rising caesarean delivery rate. Am Journal of Obstetric Gynaecology 192: 102-108.

Freidovich I (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? N.Y. Academy Science 893: 13-18

Geracitano R, Tozzi A, Berreta N, Florenzano F, Guatteo E, Viscomi M, Chiolo B, Molinari M, Bernardi G, Mercuri N (2005). Protective role of hydrogen peroxide in oxygen-deprived dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. The Journal of Physiology 568: 97-110.

Gibson B (1999). Cerebro-metabolic Aspects of delirium in relationship to dementia.

Demential Geriatric Cognition Disorders 10: 335-338.

Ginet V, Puyal J, Clarke P, Truttmann A (2009). Enhancement of Autophagic Flux after

Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia and Its Region-Specific Relationship to Apoptotic Mechanisms. The American Journal of Pathology 175: 1962-1974.

Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Herrera-Marschitz M (2011). Birth asphyxia as the major complication in newborns: moving towards improved individual outcomes by prediction, targeted prevention and tailored medical care. EMPA Journal 2: 197-210.

González de Dios J, Moya M (1996). Perinatal asphyxia, hypoxic-ischemic encephalopathy and neurological sequelae in full-term newborns. II. Description and interrelation. Revista Neurología 24: 969-976.

Guatteo E, Marinelli S, Geracitano R, Tozzi A, Federici M, Bernardi G, Mercuri N (2005). Dopamine-contaning neurons are silenced by energy deprivation: A Defensive response or beginning of cell death? NeuroToxicology 26: 857-868.

Herrera-Marschitz M., Loidl, C., Zhi-Bing, Y., Andersson, K., Silveira, R., O'Connor, W., Goiny, M. (1994). Neurociurcuitry of the basal ganglia studied by monitoring neurotransmitter release. Molecular Neurobiology, 9: 171-182.

Herrera-Marschitz M, Neira-Peña T, Rojas-Mancilla E, Espina-Marchant P, Esmar D,

Pérez R, Muñoz V, Gutiérrez-Hernandez M, Rivera B, Simol N, Bustamante D, Morales P, Gebicke-Haerter P (2014). Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. Frontiers in Neuroscience 8:47; doi: 10.3389/fnins.

Ikonomidou C, Kaindl A (2010). Neuronal Death and oxidative Stress in the Developing Brain. Antioxidants & Redox Signaling 14: 1535-1550.

Jenner P (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. Annals of Neurology 53: 26-38.

Karahashi H & Amano F (1999). LPS-induced signals in activation of caspase-3-like protease, a key enzyme regulating apoptotic cell damage into a macrophage-like cell line, J774.1, in the presence of cycloheximide. *Journal of Leukocyte Biology*, 66: 689-696

Kumar A, Ramakrishna SV, Basu S, Rao GR (2007). Oxidative stress in perinatal asphyxia. Pediatric Neurology 38: 181-185.

Langeveld C, Jongenelen C, Schepens E, Stoof J, Bast A, Drukarch B (1995). Cultured rat striatal and cortical astrocytes protect mesencephalic dopaminergic neurons against hydrogen peroxide toxicity independent of their effect on neuronal development. Neuroscience Letters 192: 13-16.

Lee E, Son H (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors.

BMP Rep. 42: 239-244.

Leth H, Toft PB, Peitersen B, Lou HC, Henriksen O (2008). Use of brain lactate to predict outcome after perinatal asphyxia. Acta Pediátrica 85: 859-864.

Liss B, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S, Roeper J (2005). K_ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. Nature Neuroscience 8: 1742-1751.

Loose N, Rudloff E, Kirby R (2008). Hypoglicemia and its effects on the brain. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 18: 223-234.

Luc De Visschere P, Seynaeve P, Vanrietvelde F, Senepart M (2007). Brain Injury due to persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. European Journal of Radiology Extra 62: 35-38.

McAdams R, Juul S (2012). The Role of Cytokines and Inflammatory Cells in Perinatal Brain Injury. Neurology Research International 1155: 1-15.

McBride H, Neuspiel M, Wasiak S (2006). Mitochondria: More than just a powerhouse.

Current Biology 16: 551-560

Messier C, Gagnon M. (1996). Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. Behavioural Brain Research 75: 1-11.

Miller S, Ramaswamy V, Michelson D, Barkovich A, Holshouser B, Wycliffe N, Glidden D, Deming D, Partridge J, Wu Y, Ashwall D, Ferriero D (2005). Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. The Journal of Pediatrics 146: 453-460.

Miller SP, Weiss BS, Barnwell MD, Ferriero DM, Latal-Hajnal B, Ferrer-Rogers BA, Newton RN, Partridge JC, Glidden DV, Vigneron, DB, Barkovich AJ (2002). Seizureassociated brain injury in term newborns with perinatal asphyxia. Neurology 58: 542-548. Morales P, Fiedler J, Berrios C, Huaiquín P, Bustamante D, Cárdenas S, Parra E, HerreraMarschitz M (2008). Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. J Neurosci Res 86: 2650-2662.

Morales P, Reyes P, Klawitter V, Huaiquín P, Bustamante D, Fiedler J, Herrera-Marschitz M (2005). Effects of perinatal asphyxia on cell proliferation and neuronal phenotype evaluated with organotypic hippocampal cultures. Neuroscience 135: 421-431.

Neugebauer V (2006). Subcortical processing of nociceptive information: basal ganglia and amygdala. Handbook of Clinical Neurology 81: 141-157.

Onn S, West A, Grace A (2000). Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. Trends in Neurosciences 23: 48-56.

Ozcan E, Mukaddes G, Elif O, Ruhcan P, Omer A (2004). Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. International Clinical Psycopharmacology 19: 89-95.

Papadopoulos M, Koumenis I, Dugan L, Giffard R (1997). Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. Brain Research 748: 151156.

Pasternak J, Predey T, Mikhael M (1991). Neonatal asphyxia: Vulnerability of basal ganglia, thalamus, and brainstem. Pediatric Neurology 7: 147-149.

Roberts C, Sindhu K (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sciences 84: 705-712.

Rostrup M, Fossbakk A, Hauge A, Kleppe R, Gnaiger E, Haavik J (2008). Oxygen dependence of tyrosine hydroxylase. Amino Acids 34: 455-464.

Schulz J, Lindenau J, Seyfried J, Dichans J (2001). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. European Journal of Biochemistry 267: 4904-4911.

Shieh Ch, Coghlan M, Sullivan J, Gopalakrishnan M (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. Pharmacological Reviews 52: 557-594.

Singh P, Jain A, Kaur G (2004). Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: Correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. Molecular and Cellular Biochemistry 260: 153-159.

Spina M, Cohen G (1989). Dopamine turnover and glutathione oxidation: Implications on Parkinson disease. Neurobiology 86: 1398-1400.

Sulzer D (2007). Multiple Hit Hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. Trends in Neuroscience 30: 244-250.

Taylor D, Edwards A (1999). Oxidative Metabolism, Apoptosis and Perinatal brain Injury. Brain Pathology 9: 93-117.

Van Handel M, Swaab H, De Vries L, Jongmans M (2007). Long-term cognitive and behavioural consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. European Journal of Pedriatics 10: 431-437.

Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ (2014) The mechanism and treatment of asphyxia encephalopathy. Front neurosci Vol 8, 40, doi: 10.3389/fnins.

Whittemore E, Loo D, Cotmans C (1994). Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. Neuro Reports 5: 1485-1488.

Whittemore, E, Loo, D, Watt, JA, Cotmans, C. A detailed analysis of hydrogen peroxideinduced cell death in primary neuronal culture. Neuroscience, 67: 921-932.

Yorek M (2003). The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. Free radical research 37: 471-480.

Yun-Zhong F, Sheng Y, Guoyao W (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18: 872–879

Zeevalk G, Bernard L, Nicklas W (2002). Role of Oxidative Stress and the Glutathione System in Loss of Dopamine Neurons Due to Impairment of Energy Metabolism. Journal of Neurochemistry 70: 1421-1430.

Zhou D, Qian J, Liu CX, Chang H, Sun RP (2008). Repetitive and profound insulin induced hypoglycemia results in brain damage in newborn rats: an approach to establish an animal model of brain injury induced by neonatal hypoglycemia. Eur J Pediatrics 167:

1169-1174.

Zipfel G, Babcock D, Lee JM, Choi D (2009). Neuronal apoptosis after CNS injury: The Roles of Glutamate and Calcium. Journal of Neurotrauma 17: 857-869.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: ***"Asphyxia at birth primes CNS development and increases the vulnerability to subsequent postnatal insults"*** cuyo investigador responsable es el **Dr. Mario Herrera-Marschitz** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA 0447 FMUCH).

El Dr. Herrera-Marschitz se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2012.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**" después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 04 de Agosto de 2011.

Anexo 1: Autorización comité de Bioética

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES

CONSTANCIA

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile certifica que ha recibido para su estudio el proyecto titulado: **"ASPHYXIA AT BIRTH PRIMES CNS DEVELOPMENT AND INCREASES THE VULNERABILITY TO SUBSEQUENT POSTNATAL INSULTS"** cuyo Investigador Responsable es el Dr. Mario Herrera-Marschitz, Laboratorio de Farmacología de Neurocircuitos, Programa Disciplinario de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, que será presentado al concurso FONDECYT Regular 2012.

El presente documento sólo informa de la recepción de los antecedentes y posteriormente a su análisis, el Comité dará a conocer el resultado de este estudio otorgando la certificación correspondiente.

Santiago, 09 de junio de 2011.

FACULTAD DE MEDICINA Comité de Ética Sobre Investigación en Animales

Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

CVY/mva.

Vulnerability of dopaminergic neurons following recurrent metabolic insults: effects of perinatal asphyxia in organotypic cultures.

Sehrt-Uribe, M., Pérez-Lobos R., Palacios, E., Bustamante, D., Morales, P., Herrera-Marschitz, M.

Millenium Institute BNI-Chile; Programme of Molecular & Molecular Pharmacology, ICBM, Medical Faculty, University of Chile, Santiago, Chile.

Perinatal asphyxia (PA) features apoptotic and neuroinflamation mechanisms, leading to short- and long-term neuronal death. PA affects neuronal networks dependending on the insult timing and metabolic requirements, being basal ganglia neurocircuitry particularly prone to vulnerability, inducing functional impairments of dopaminergic systems.

We investigated whether PA primes the vulnerability of dopaminergic neurons to recurrent metabolic insults, using basal ganglia organotypic cultures from asphyxia-exposed neonate rats.

Cultures from asphyxia-exposed and control animals were subjected to H_2O_2 (45 mM) and glucose deprivation for 18h at day *in vitro* 18 (DIV18). Two days after the insult, cultures were treated for cell viability *in vitro*, or formalin fixed to analyse neuronal (MAP-2), neurochemical (tyrosine hydroxylase, TH) phenotype, caspase-3 (CASP-3) as apoptotic marker, and DAPI to analyse cell number and morphological nuclear changes.

After a second metabolic insult, there was: (i) a decreased cell viability in organotypic cultures, (ii) Sn recurrent insult cause a decrease in cell number and asphyxia exposed control decreases significantly about its non-exposed control. Str recurrent insult cause a decrease in cell number only for its asphyxia exposed group. Cx decrease in cell number only for its control group treated for a recurrent insult. Further, asphyxia exposed group cell number decreased about its control, (iii) increase in apoptotic cell death; (iv) increase in activation of CASP-3-dependent apoptotic pathways in neurons, and (v) increased

number of $TH^+/CASP\text{-}3^+$ neurons of organotypic cultures from asphyxia-exposed, compared to non-asphyctic tissue. Furthermore, morphological analysis revealed a (vi) decreased number of apoptotic bodies in tissue submitted to a recurrent metabolic insult, suggesting the activation of different death pathways in dopaminergic neurons, depending on the priming mechanisms induced by PA.

The present work describes differential vulnerability affecting neurons from basal ganglia, confirming dopaminergic neurons as a main target for the impairing effects of recurrent metabolic insults following PA in CNS.

Sponsor: Programme of Molecular & Clinical Pharmacology, ICBM, Medical Faculty, University of Chile; Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile; Millenium Institute BNI-Chile.