CENTRO UNIVERSITARIO DE PLASENCIA

DPTO. DE ANATOMIA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA

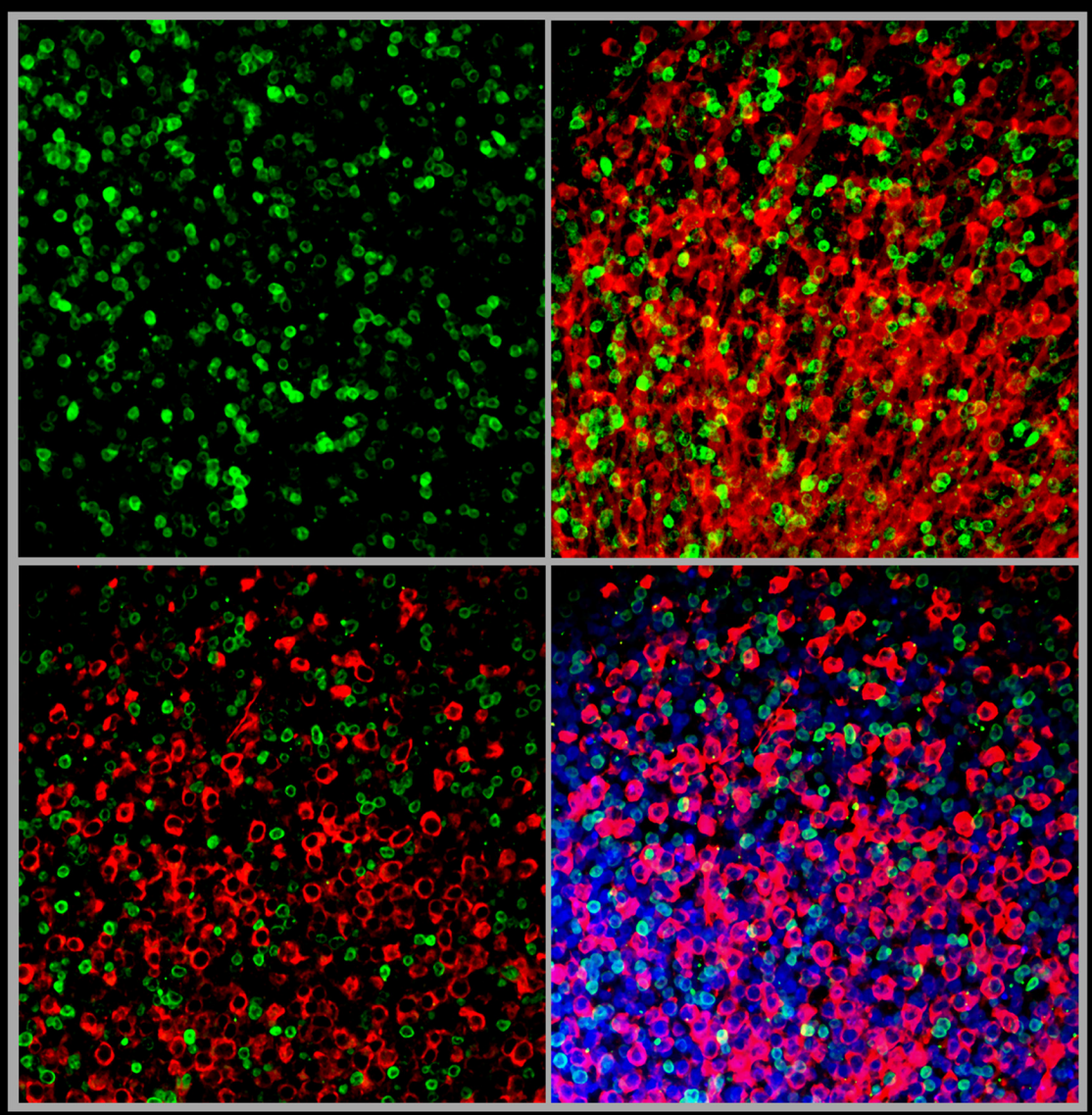
(UNEX)

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

DPTO. DE FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

(C.S.I.C.)

MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE PRECURSORES NEURALES: CARACTERIZACIÓN DE SU INCIDENCIA Y REGULACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE VERTEBRADOS



TERESA CHAVARRÍA GIMÉNEZ

PLASENCIA, 2007

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

CENTRO UNIVERSITARIO DE PLASENCIA

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE PRECURSORES NEURALES: CARACTERIZACIÓN DE SU INCIDENCIA Y REGULACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE VERTEBRADOS.

Memoria presentada por:

TERESA CHAVARRÍA GIMÉNEZ,

para optar al Título de Doctora en Ciencias Biológicas

por la Universidad de Extremadura.

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas,

Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

Bajo la dirección de:

Dr. Enrique J. de la Rosa **Dra. Raquel Mayordomo Acevedo**

Plasencia, 2007

A Belitos, por haberme enseñado cuanta fortaleza puede haber en la vulnerabilidad.

A Chendo Sr., por ayudarme a no perder la ilusión por alcanzar mis sueños.

A Chendo, Bert, Judith y Lucas, por haber estado siempre tan cerca de mi..

A Manolo, porque si la ciencia da forma a mi vida, tú le das sentido.

Todo Mi Agradecimiento.

Hace ya casi 10 años que inicié una serie de aventuras para poder presentar una "Memoria de Tesis Doctoral". Como consecuencia, a mi paso he ido conociendo a una hilera de personas que no puedo, ni quiero olvidar. Este es el momento de agradeceros a todos vuestra ayuda directa o indirecta para poder presentar un trabajo que, se juzgue o no modesto, ha sido fruto de muchas "huevadas", muchos momentos dulces y alguno que otro amargo y de muchos, muchos viajes. Esta ha sido la tesis de las idas y venidas. Por ello, aunque resulte un poco largo y peque de exagerada, quiero daros las gracias a todos. El que quiera leer, que lea.

En el CIB…

Al Dr. Enrique de la Rosa; Heinrich gracias por esa llamada a Málaga hace cinco años. Gracias también por el tiempo que has invertido en leer el manuscrito, por los ratos en los que hemos hablado de Ciencia y por enseñarme a adoptar una postura serena ante todas las situaciones. Por preocuparte de que el laboratorio sea algo más que un área de trabajo y por intentar, con tus "ejercicios espirituales" sentirte próximo a tus becarios. Gracias finalmente por haber firmado la tesis a pesar de la "jaula de los ratones".

A la Dra. Flora De Pablo; Flora, gracias por estar pendiente siempre del desarrollo de mi trabajo en el laboratorio y de mis clases en Plasencia, por estar a mi lado el día del "costalazo" por las escaleras y por darme tu apoyo en todo momento durante estos años.

Sin duda, a Maite y a Silvia, por vuestra ayuda y asesoramiento con el Confocal. Trabajar con vosotras ha sido además de una suerte y un placer, una auténtica diversión. Maite, no podré agradecerte lo suficiente la de horas demás que has echado para ayudarme. Te debo mil…

A todos mis antiguos compañeros CIB. Muchos que ya no estáis pero que me habéis ayudado tanto: Carmen F, por esas imitaciones tan conseguidas; a Gaizka, por todas las veces que nos has hecho reír en el laboratorio; Emilio, Isa y Eva, A Carlos Vicario, por esas primeras lecciones de anatomía del sistema nervioso.

A mis "bichas" del labo.: Jimena, gracias por tu generosidad, por confiar en mi forma de trabajar, por las muchas horas que pasamos hablando de ciencia y por haber sido y ser un hombro sobre el que poder apoyarme en todo momento. Alice, mi "Rubi" preferida, gracias mil por tus consejos científicos, por tu capacidad para leer en mí sin tener que decirte nada. A la Mary Joe, sin duda, he hecho de ti una gran maestra del peinado, je, je. Niña mía, gracias por tu ayuda con mis primeros marcajes, por tantas horas que hemos pasado en el zulo "contando células", por lo mucho que nos hemos divertido en el CIB de Velázquez y sin duda, por no haber perdido el contacto y seguir cerca de mi ahora. A "esa peaso de Chivi". Silvia, que puedo decir... Gracias por acompañarme todos estos años, por rescatarme y no darme la espalda cuando necesité ayuda en el laboratorio, por darme ejemplo con tu pasión por la vida y la ciencia. Por todos los buenos momentos que hemos vivido dentro y fuera del CIB. ¡Nadie canta como tú y como yo…somos un dueto irrepetible! Te quiero niña.

A Sonia, por ser tan genial, eres una gran persona y una gran científica. Gracias por escucharme, por animarme y por estar cerca en mis momentos más difíciles. Y gracias por esas jornadas de baile que no hemos pegado, je, je.

A mis niñas, Mariam y Natalia. Gracias por vuestro ejemplo de esfuerzo, estudio y mejora. Es increíble veros trabajar y pensar a nivel de un post-doc siendo aún tan jóvenes. A Patri V, por compartir conmigo tu idea de lo que es ciencia.

A Ana R, sin duda parte de la buena marcha del laboratorio es por ti. Mil gracias por todos tus consejos, por tu amistad y por tu complicidad.

A Tani, por estar siempre dispuesta a echarme una mano con todo. A Violeta y Tere Suarez, por vuestros consejos constructivos y por transmitirme la tranquilidad que ahora tanta falta me hace. A Patri B, gracias por las primeras correcciones de la tesis, por el esfuerzo que has puesto siempre en ayudarme y por tu ejemplo de dedicación al laboratorio. A Ana@, tu cariño y tu gracia se echan de menos. A mi "Katiuska"; Cati, sin duda he aprendido mucho de ti estos años: tu serenidad, tu trabajo bien hecho y tu paciencia han sido un referente para mí. A Ana Valenciano, por tu sentido de la crítica y por tu ayuda en el diseño experimental.

A mis niños: el gran Oscar, me acordaré de ti el día de la lectura, especialmente cuando lo celebre. Gracias por tu apoyo y por cantar bien. Kike, con ese corazón que no te cabe en el pecho. Los ánimos que me has dado estas últimas semanas me han servido de gran ayuda. Los chicos de al lado: Rodri, Carlos, Asier y mi amigo David. Inolvidable vuestra

actuación en la fiesta del CIB. Gracias por eso y por el momento café. A Blas (que espero que ahora estés bailando Salsa pegadito a una Cubanita), Juan y Gonzalo, gracias por acompañarme tantos años en el CIB. A las "Vidalitas" y las chicas de al lado, por vuestras risas, compañerismo y complicidad.

Y a todos los servicios del CIB (especialmente a Luci y Fernándo por avisarme que llegan huevos, a la chicas de compras, a Paco, Noemí y Manolo del animalario, a Mónica de fotografía y a super Aurelio). Hoy esto es posible gracias a vosotros.

…en Madrid,

A Carmen Segundo y a Fran, por ser mi familia en la mansión de Vallehermoso y haberme enseñarde tanto sobre cómo debe ser un buen científico (inolvidables frases como "…donde haya dos estamentos claramente diferenciados…"). A Carlos y a Irene, por vuestro cariño y aprecio. A Carlota, Renata y a Maya, por ser de mis primeras amigas en la capital. Por vuestro apoyo y cariño en mis momentos amargos y por tantas risas que nos hemos pegado juntas.

A mis chicos de la mansión de Blasco de Garay, Rubén y Alfonso. Por soportar mis "Teresadas", por cuidarme como a una princesa y por quererme tanto a pesar de la guerra que os he dado. Por los momentos tan geniales y las guerras de cojines que nos hemos pegado en casa. Os quiero mil y mil y mil pedacitos que no tienen fin.

A La Plataforma al completo. Por los momentos de locura total que hemos tenido (y me temo que seguiremos teniendo), por esos magníficos estatutos, por el complejo de Peter Pan y por todos nuestros viajes. Pero gracias sobre todo por estar a mi lado a las duras y a las maduras.

A mis tíos José Carlos, María Teresa, Miguel y Juana por vuestra ayuda tanto a mi como los míos.

…**en Extremadura,**

Ante todo a la Dra. Raquel Mayordomo, por haberme dado la oportunidad de formar parte del mundo de la enseñanza universitaria de Plasencia y la financiación para acabar la tesis. Pero además, por haberme enseñado lo importante que es ser generoso con la ciencia; por haberme ayudado tantas madrugadas con los experimentos ventana; por tantos ratos de discusión sobre nuestros resultados y tantos ratos de charla sobre lo divino y lo humano. Para mi ha sido muy especial poder aprender de ti durante estos dos años y medio. Gracias también a Julio y a tus dos pequeños, por el cariño que siempre me han mostrado y por todas las veces que te he apartado de ellos.

He de agradecer al Dr. Gervasio Martín Partido todo su apoyo y asesoramiento durante el tiempo que he formado parte del Dpto. de Anatomia, Biología Celular y Zoología en la UNEX. Gracias también por ayudarme con los trámites de la tesis y por informarme de todos los asuntos burocráticos. Ha sido una suerte poder contar contigo.

A la Junta de Extremadura por la financiación de la estancia breve.

A mis compañeros en el Centro Universitario de Plasencia: Mamen, Bea, Elena, Sonia; Belinda, Alfonso, Raquel, José Carlos, Maite. Gracias por vuestra cariñosa acogida desde el principio.

A Marta, por tu disposición a dejarme usar la balanza de precisión…a cualquier hora. A Silvia, por prepararme el PFA, sin duda un lujo para mí. A las chicas de "abajo": Carmen, Bea, Pilar…sois fantásticas. Y a los chicos de seguridad, por velar por mí en los experimentos de madrugada.

Y como no, a las chicas del piso: Natalia, Mercedes, Inés y Bea. Por haber hecho del piso de Plasencia mi hogar varios días a la semana.

…en Málaga.

Al Dr. Miguel Ángel Medina, por enseñarme a coger una pipeta automática, je,je. Miguel, gracias de todo corazón por iniciarme en el laboratorio, por animarme a emprender esta aventura y por haber estado pendiente de mis experimentos todos estos años. Por haber sido sincero conmigo y a pesar de todo, seguir creyendo en mí. Pero sobre todo, por ser un gran amigo.

A la Dra. Francisca Sánchez-Jiménez. Kika, sentirte cerca estos años ha sido muy importante. A parte de enseñarme a cambiar una rueda (inolvidable viaje a Alicante), has sido para mí un ejemplo de fortaleza. Gracias sobre todo por animarme en mis momentos más bajos, por desearme siempre "que me vaya bonito" y por todo lo que sé has luchado por mi.

A mis chicos del labo.: Salva, Dani, Karl y Paz. Por haber seguido en contacto todos estos años y haberme animado tanto con la tesis. Por vuestra sincera amistad y por todas las juergas que nos hemos pegado juntos. Socio, 14 años de amistad se dicen pronto. Ahora, tenerte cerca de nuevo es una suerte. Espero que el día de la tesis estés super ogulloso de mí.

A la Bio-Peña: mi fabulosa Pili, José "el Largo", Jose "Pachoni", "Fali Canío", JM "Palangui", Luis "El Canario", Adolfo, Alberto, Juan Antonio…por aquellos maravillosos años y por los que han seguido de fabulosos correos electrónicos.

A mis niñas del "NNCR Club": María, Blanca, Terete y Bea. Gracias por permanecer a mi lado a pesar de la distancia, por vuestro apoyo incondicional a pesar de que os echéis las manos a la cabeza con la vida que llevo. Gracias también a Jacobo, Pablo y Rafa por quererme a pesar de mi locura transitoria.

A Juanjo, Leti, Sonia, Parra, Pablito…por nuestras jornadas "Carchuneras". Buena parte de este trabajo se ha gestado en Carchuna (entre un Gin-Tonic y otro, je, je). Gracias por hacerme la vida tan fácil mientras he estado trabajando. Gracias también a María Jesús y a Esther, por vuestro cariño. Os quiero niñas.

Gracias a mi familia…

Last but not least:

Manolo; no sabes cuanto significa que ahora mismo estés a mi lado (aunque sea dormido en el sofá ☺). Gracias por acompañarme todos estos años, por ayudarme a superarme día a día y por creer que tengo algo que aportar a la ciencia. Por tanto amor que me das y por haber soportado con paciencia y cariño estos últimos meses. Tú me completas.

A la memoria de mi madre, **Belitos Giménez Pacheco**. Gracias por todo tu amor pasado, presente y futuro. Por preocuparte por mí hasta el final, por transmitirme tu fortaleza y por haber creído siempre que yo era maravillosa.

A mi padre. Chendo Chavarría. Dad, gracias por comprar mis primeros libros de Biología (sin duda, allí empezó todo). Por todo lo que me has animado estos años y por enseñarme que lo importante en la vida es sonreír y perseguir nuestros sueños.

A mis hermanos Chendo, Alberto, Judith, Lucas y Alfredo, por soportar mis palizas hablando de ciencia y por todo vuestro amor ahora y siempre.

Y la muerte está dentro de la vida.

FERNANDO PESSOA.

ABSTRACT. vii

ABREVIATURAS. ix

1. INTRODUCCIÓN. 1

1.1. Neurogénesis en el sistema nervioso de vertebrados. 1

1.2. Muerte celular programada. 2

1.2.1. Mecanismos de muerte celular programada. 3

1.2.2. Muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso. 6

1.2.3. *Muerte neural temprana.* 8

1.2.4. Poblaciones celulares afectadas por la muerte neural temprana. 10

1.3. La retina embrionaria de pollo como modelo de estudio de los procesos de muerte celular programada durante el desarrollo neural. 12

1.3.1. Desarrollo de la retina embrionaria del pollo. 12

1.3.2. Muerte celular programada en el desarrollo de la retina neural de pollo. 15

1.3.3. Factores extracelulares que regulan la muerte neuronal de la retina durante el desarrollo. 16

1.4. La familia de la insulina durante el desarrollo neural. 17

1.4.1. La insulina y los factores relacionados con la insulina. 17

1.4.2. Receptores de la familia de la insulina. 19

1.4.3. Señalización a través de receptores de la familia de la insulina. 20

2. OBJETIVOS. 21

3. MATERIAL Y MÉTODOS. 23

3.1. Embriones de pollo. 23

3.2. Aislamiento de la neurorretina embrionaria de pollo. 25

3.2.1. Aislamiento de la neurorretina en diferentes estadios. 25

3.3. Tratamientos de embriones *in vivo*. 26

3.3.1. Marcaje en ventana mediante incorporación de BrdU. 26

3.3.2. Marcaje con BrdU y tratamientos con inhibidores. 28

3.4. Cultivos organotípicos de neurorretinas. 29

3.4.1. Tratamientos en cultivos organotípicos de retinas de E5 y E9. 30

3.5. Disociación de retinas embrionarias de E5 y E9. 31

3.6. Cultivos celulares de la línea inmortalizada de retina temporal de codorniz RTC5. 33

3.6.1. Cultivo de mantenimiento. 34

3.6.2. Protocolos de proliferación y diferenciación de la línea RTC5. 34

3.6.3. Experimento de dosis respuesta a FGF-2. 36

3.7. Detección de la muerte celular programada. 37

3.7.1. Detección de la muerte celular por la técnica TUNEL. 38

3.7.1.1 Detección de la muerte celular mediante TUNEL en retinas montadas en plano. 39

3.7.1.2. Detección de la muerte celular mediante TUNEL en secciones de retinas. 40

3.7.1.3. Detección de la muerte celular mediante TUNEL en células primarias inmortalizadas de retina de codorniz. 42

3.7.2. Detección de la muerte celular mediante tinción nuclear con DAPI en células disociadas de retina. 43

3.8. Inmunodetección de marcadores celulares. 44

3.8.1. Inmunodetección en retinas montadas en plano. 44

3.8.2. Inmunodetección en secciones de retinas. 49

3.8.3. Inmunodetección en retinas disociadas. 50

3.8.4. Inmunodetección de proteínas en membrana "western blot". 51

3.9. Representación de las curvas de densidad de muerte, proliferación y diferenciación. 54

4. RESULTADOS. 57

4.1. El proceso de muerte celular programada en los estadios iniciales del desarrollo de la retina neural de pollo. Descripción de las Isothanas. 57

4.2. El proceso de proliferación celular en los estadios iniciales del desarrollo de la retina neural de pollo. Descripción de las Isopro. 60

4.3. La diferenciación temprana en el desarrollo de la retina de pollo. Descripción de las Isoislet. 61

4.4. Caracterización de las poblaciones celulares afectadas por los proceso de muerte en el desarrollo temprano de la retina de pollo. 63

4.4.1. La muerte celular programada afecta a una población de células proliferativas en retinas de HH19 y HH21. 66

4.4.2 La muerte celular programada afecta a una población de neuronas recién diferenciadas en retinas de HH21. 74

4.5. Mecanismos de señalización de la muerte celular programada en una línea celular inmortalizada de retina de codorniz (RTC5). 84

4.5.1. Cambios en la susceptibilidad a muerte en condiciones de proliferación y diferenciación. 85

4.5.1.1. La insulina ejerce un papel antiapoptótico en la línea RTC5 en condiciones de proliferación. 86

4.5.1.2. El factor FGF-2 ejerce un papel antiapoptótico y proliferativo en la línea RTC5. 89

4.6. Caracterización de las vías de regulación y ejecución de la muerte celular programada en fases temprana y tardía del desarrollo de la retina. 93

4.6.1. Muerte celular programada a lo largo del desarrollo de la retina embrionaria del pollo. 94

4.6.2. Proliferación y muerte celular programada en dos estadios del desarrollo de la retina: E5 y E9. 98

4.6.3. Mecanismos de ejecución de la muerte celular programada: caspasas y catepsinas. 100

4.*6.4. Acción de la insulina y la proinsulina en la supervivencia.* 102

4.6.5. Modulación de los procesos de proliferación y diferenciación por insulina. 104

4.6.6. La insulina actúa como factor de supervivencia: activación de las vías de señalización PI3K-Akt y MEK-ERK. 107

4.6.7. Efecto de la inhibición de las vías de supervivencia en los procesos de proliferación y diferenciación. 114

4.6.8. Efecto de la activación de la vía de MEK-ERK inducida por insulina en retinas de E5. 117

4.6.9. Las ceramidas y el factor NF_KB como inductores de muerte. 121

5. DISCUSIÓN. 125

5.1 Muerte celular programada durante el desarrollo de la neurorretina embrionaria de pollo. 125

5.2. Poblaciones afectadas por muerte celular programada. 128

5.3. La insulina como factor de supervivencia y sus vías de señalización en el desarrollo de la retina neural. 132

6. CONCLUSIONES. 137

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 139

APÉNDICE I: Soluciones y Anticuerpos. 157

APÉNDICE II: Publicaciones. 163

ABSTRACT.

The importance of programmed cell death on projecting neurons during vertebrate development of the nervous system has been well studied. This process critical for the establishment of a definitive pattern of neuronal connection, is known as neurotrophic cell death and is regulated through competition of a limited amount of trophic factors. Cell death ocurring at earlier stages of neural development affecting proliferating neural precursor cells and recently born neuroblasts has also been recognized. Commonly cell death appears to be determined by a balanced cross-talk among multiple pro- and anti-apoptotic signals, which interact to determine survival or death. The embryonic retina provides a primary model system suitable for the analysis of regulatory and executor elements. Among the signaling factors, those of the insulin family, especially IGF-I, are well-characterized neuroprotective factors whose actions span from development to aging. In the present work, the whole embryonic retinal development has been covered with the aim to compare the magnitude, and some aspects of the regulatory and executor pathways of the early and late phases of programmed cell death in this part of the nervous system.

We have established spatial and temporal patterns of cell death during chick retinal development and neurogenesis progression during early development. In addition, cell death populations undergoing early programmed cell death have been identified and quantified *in vivo*. We also characterize in the present work the role of two major signalling pathways, PI3K-Akt and MEK-ERK, in controlled retinal organotypic cultures from embryonic day 5 (E5) and E9, when cell death preferentially affects proliferating neuroepithelial cells and ganglion cell neurons, respectively. The relative density of programmed cell death *in vivo* was 5- to 24-fold higher in the proliferative and early neurogenic stages of retinal development (E3-E5) than during

neuronal maturation and synaptogenesis (E8-E19). In organotypic cultures from E5 and E9 retinas, insulin, as the only growth factor added, was able to completely prevent cell death induced by growth factor deprivation. Insulin activated both the PI3K-Akt and the MEK-ERK pathways. Insulin survival effect, however, was differentially blocked at the two stages. At E5, the effect was blocked by MEK inhibitors, whereas at E9 it was blocked by PI3K inhibitors. The cells which were found to be dependent on insulin activation of the MEK-ERK pathway at E5 were mostly proliferative neuroepithelial cells. These observations support an exquisite specificity in the regulation of early neural cell death.

ABREVIATURAS

(-)FC: ausencia de factores de crecimiento.

2-ME: 2- Mercapto - etanol.

AC: células amacrinas.
Akt/PKB: *accutely transforming retrovirus/ Protein Kinase B.*

Apaf-1: *Apoptotic protease activating factor 1.*
APP: *β-Amyloid precursor protein*.
BAD*:* pro-apoptotic BH3-only protein.

Bcl-2: *B-cell leukemia proto-oncogene.*

Bcl-2: *B-cell leukemia proto-oncogene.*
BDNF: *Brain Derived Neurotrofic Factor*.

BGT: tampón compuesto por Albúmina Sérica Bovina, Glicina, Tritón-X 100.

Bid: *a BH-3 domain-only death agonist protein*.

BrdU: 5-bromo-2´-deoxyuridina.

BSA: albúmina de suero bovino.

CCG: capa de células ganlgionares.
Cer-2: Ceramida-2-fosfato.

CFO: capa de fibras ópticas.
CG: Capa de Ganglionares.

ChS: *Chick Serum*.

CNE: Capa Nuclear Externa.

CNI: Capa Nuclear Interna.

CPE: capa plexiforme externa.
CPI: capa plexiforme interna.
CREB: *cAMP Response Element-Binding.*

Cyt c: *Cytochrome c*.

DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane.

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidarto.

DNA: *Deoxyribonucleic Acid.*

DNasa: Enzima que digiere el DNA.

dNTP: *Deoxyribonucleotide Triphosphate.*

E: día de desarrollo embrionario.

EDTA: Ácido Etilén-Diamín-Tetracético.

EP: epitelio pigmentario.
ER: E*ndoplasmic Reticulum.*

ERK: E*xtracellular Signal-Regulated Kinase.*

ESM: error estándar de la media.

FA: inhibidor de catepsina B.

FasL: *Fas Ligand.*

FCS: Fetal Calf Serum.

FF: inhibidor de catepsina L.

FGF-2: fibroblast growth factor-2.

Fig: Figura.

FKHR: *Forkhead in Rhabdomyosarcoma.*

FR: fotorreceptores.
G3G4: anticuerpo contra 5-bromo-2´-deoxyuridina.

GSK-3: *Glycogen Synthase kinase-3 beta.*

HC: células horizontales.
IAP: *Inhibitor of Apoptosis.*

IGF-I: *Insulin related Growth Factor I.*

IGF-II: *Insulin related Growth Factor II.*

IGF-IR: *IGF- Insulin Receptor*.

Ins: insulina.

IR: I*nsulin Receptor*.

IRSs: I*nsulin Receptor Substrates.*

Islet 1/2: factor de trasncripción nuclear Islet.

JNK: *Jun N-terminal Kinase.*

kDa: kilo Dalton.

L: Lente.

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase.*

MCP: muerte celular programada.

MEK: *Mitogen-activated protein Kinase*.

MET: Microscopia Electrónica de Transmisión.

mRNA: RNA mensajero.

Na_3VO_4: Ortovanadato Sódico.

NF-κB: *Nuclear Factor kappa B.*
NF-κB: *Nuclear Factor Kappa B.*

NGF: *Nerve Growth Factor.*

NGS: *Normal Goat Serum.*

NO: Nervio Óptico.

NT-3: *Neurotrofin 3.*

NT-4: *Neurotrofin 4.*

NT-6: *Neurotrofin 6.*

NT-7: *Neurotrofin 7.*

p/v: peso/volumen.

P: día de desarrollo postnatal.

p90RSK: *90 kDa ribosomal S6 kinase.*

PBS: P*hosphate Buffered Saline.*

PDK1*: 3'-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1.*

PI3K*: Phosphoinositide-3-Kinase.*

PKC: *Protein Knase C*.

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonil.

RE: retículo endoplasmático.
SD: desviación estándar.

SDS: *Sodium dodecylsulphate.*

SE: capa de los Segmentos Externos.

Shc: S*rc homologous collagen-like protein.*

SSC: *Sodium chloride/Sodium Citrate.*

TNF: *Tumor Necrosis Factor.*

TNFR: *Tumor Necrosis Factor Receptor.*

Trk: *Tirosin kinase receptors.*

TUJ-1: anticuerpo anti-β III tubulina.

TUNEL: T*erminal transferase mediated dUTP Nick End Labelling.*

v/v: volumen/volumen.

v: zona vitreal.

VO: vesícula óptica.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Neurogénesis en el sistema nervioso de vertebrados.

El desarrollo del sistema nervioso comienza una vez que se han establecido, tras la gastrulación, las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. El sistema nervioso de vertebrados deriva principalmente del tubo neural, formado durante la neurulación a partir del neuroectodermo. En sus etapas más tempranas consta de células neuroepiteliales y de células de la cresta neural, una población que se libera del tubo neural y migra hacia otras regiones del embrión (Gallera, 1971). A partir del tubo neural se forma el sistema nervioso central (encéfalo, incluyendo la retina del ojo, y médula espinal principalmente), mientras que la cresta neural da lugar a la mayoría de las neuronas y células de sostén del sistema nervioso periférico (Bronner-Fraser, 1995).

La neurogénesis, que tiene lugar tras la neurulación, supone la diferenciación de los diferentes tipos neuronales y de células de la glía a partir de precursores proliferativos multipotentes (Huttner y Kosodo, 2005). El control de la neurogénesis depende de un balance entre factores intrínsecos, que incluyen la expresión de genes proneurales y neurogénicos, y factores extrínsecos, que son las señales procedentes de otras células, tales como factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular y moléculas de superficie de células adyacentes (Cremisi *et al*., 2003). A pesar de los avances recientes, los aspectos morfológicos del proceso neurogénico son aún mucho mejor conocidos que los mecanismos de control que subyacen al proceso de generación de diversidad celular a partir de precursores multipotentes, aparentemente indiferenciados.

1.2. Muerte celular programada.

La muerte celular programada (MCP) es un proceso esencial para el mantenimiento y la homeostasis de órganos y tejidos (Conlon y Raff, 1999). Durante el desarrollo de un organismo, la MCP interviene en la formación de algunas estructuras, en la eliminación de otras innecesarias y en el control del número de células. En general, juega un papel relevante en la morfogénesis tanto en vertebrados como en invertebrados (Clarke, 1990; Ellis *et al.,* 1991; Jacobson *et al.,* 1997). Específicamente este proceso juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso (de la Rosa y De Pablo, 2000; Kuan *et al.,* 2000; Davies, 2003; Lossi y Merighi, 2003; Yeo y Gautier, 2004; Boya y de la Rosa, 2005; Buss *et al.,* 2006). Se han descrito varios tipos de MCP, todos ellos caracterizados por ser procesos ordenados y regulados a nivel genético, pero que tienen características diferentes: autofagia, necrosis y apoptosis (revisado por Nelson y White, 2004) (Fig. 1.1). La apoptosis (Kerr *et al.,* 1972), el fenotipo de muerte más estudiado y más común en vertebrados, implica una serie de cambios morfológicos celulares que tienen lugar de forma secuencial: disminución del volumen celular, pérdida de contacto entre células vecinas, aparición de protuberancias en la superficie celular, condensación de la cromatina y rotura del núcleo formando los cuerpos apoptóticos (Hale *et al.,* 1996). Durante el proceso de apoptosis la célula se desarma por completo, formando cuerpos apoptóticos que son reconocidos y posteriormente fagocitados por macrófagos y células vecinas (Raff, 1998), evitando de esta forma la liberación de los componentes intracelulares de la célula que está muriendo y la inflamación de los tejidos circundantes.

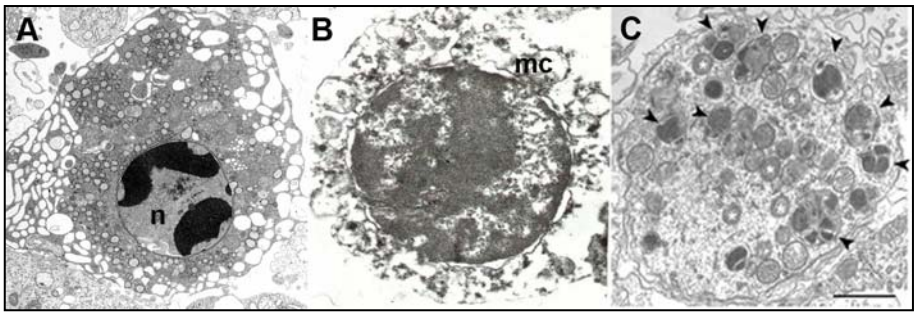


Figura 1.1 Imágenes de microscopia electrónica de transmisión de los diferentes tipos de muerte celular programada. (A) Célula apoptótica en la que se puede apreciar la fragmentación nuclear característica y una buena preservación de la membrana plasmática y los orgánulos celulares. (B) Célula necrótica en al que se puede observar la rotura de la membrana plasmática y cierta preservación de la morfología nuclear (C) Célula autofágica que presenta numerosas mitocondrias englobadas en vacuolas de autofagia (flechas) n: núcleo; mc: membrana celular. Barra = 1μm.

Imágenes obtenidas de: www.mssm.edu/labs/yuez01/images/autophagy.gif; www.cyto.purdue.edu/

1.2.1. Mecanismos de muerte celular programada.

La muerte celular programada depende de un balance entre señales inductoras de supervivencia y de muerte, que interaccionan tanto a nivel intra- como extracelular y que, en última instancia, determinan el destino de la células: morir o continuar su ciclo vital (Strasser *et al.,* 2000; Joza *et al.,* 2002; Danial y Korsmeyer, 2004). Las investigaciones de las últimas décadas han permitido identificar cientos de genes que controlan la iniciación, la ejecución y la regulación de la MCP en varias especies (Danial y Korsmeyer, 2004). La muerte celular por apoptosis puede iniciarse por señales extracelulares como la unión de ligandos a receptores de muerte (tales como el factor TNF, FasL), o la ausencia de factores tróficos. Por su parte, los estímulos intracelulares incluyen, entre otros, el estrés del retículo, el daño al DNA y la activación de mensajeros secundarios como los radicales libres o algunos lípidos.

Los mecanismos de apoptosis están muy conservados a nivel evolutivo, culminando en la mayoría de los casos en la activación de unas proteasas, las caspasas (cisteín proteasas con afinidad específica por el aspartato) (Thornberry y Lazebnik, 1998; Riedl y Shi, 2004). Las caspasas se sintetizan generalmente como precursores inactivos o procaspasas, que son activadas mediante proteolisis por otro miembro de la familia. Durante la apoptosis, estas proteasas escinden sustratos celulares necesarios para las funciones celulares, tales como proteínas del citoesqueleto o enzimas reparadoras del DNA. Las caspasas se pueden activar directamente a través de los receptores de muerte, como la caspasa 8 o tras la formación del denominado apoptosoma, un complejo multiproteico que es capaz de activar la caspasa 3, la principal caspasa ejecutora. En este proceso la mitocondria juega un papel esencial mediante la liberación de citocromo *c*, que, junto con la activación de Apaf-1 y la presencia de ATP, supone la formación de un complejo con procaspasa 9, lo que conduce finalmente a la activación de la cadena de caspasas efectoras de la muerte celular por apoptosis. La regulación de algunos mecanismos de apoptosis dependientes de caspasas que conducen a una célula hacia la muerte se resume en la figura 1.2.

Adicionalmente se han descrito otros mecanismos proteolíticos de ejecución de la muerte independientes de caspasas. Entre ellos se encuentran los mecanismos regulados por las catepsinas, un grupo de proteasas lisosomales. En respuesta a determinadas señales este tipo de proteasas son liberadas del lisosoma al citoplasma. Ahí pueden activar vías de muerte apoptótica bien a través de la activación de caspasas o bien liberando factores pro-apoptóticos de la mitocondria. Dentro de la familia, las catepsinas B, L y D son las que juegan un papel relevante en la ejecución de muerte por apoptosis (Buhling *et al.,* 2006; Chwieralski *et al.,* 2006).

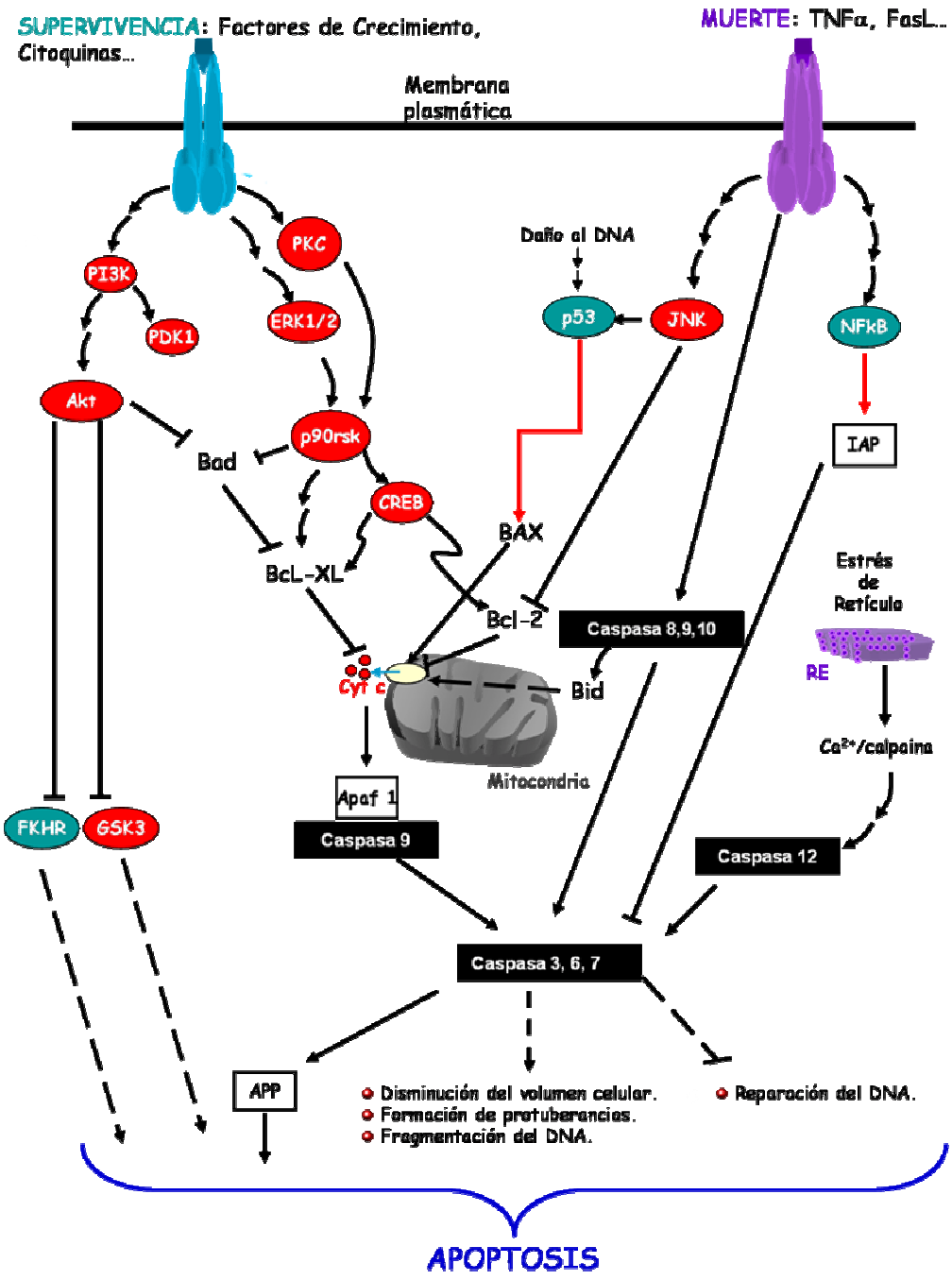


Figura 1.2. Principales vías de señalización que conducen a una célula hacia la muerte. Los estímulos pro-apoptóticos incluyen señales extracelulares (TNF, FasL) e intracelulares (daño al DNA y el estrés de retículo). Las caspasas son las moléculas centrales en el proceso de ejecución de la apoptosis. Las caspasas iniciadoras (entre ellas la caspasa 8, 9, 10 y 12) están estrechamente acopladas a las señales pro-apoptóticas. Estas caspasas, iniciadoras de las señales de muerte son capaces de activar a su vez caspasas efectoras de apoptosis (caspasas 3, 6 y 7). El potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo *c* están regulados por proteínas de la familia de Bcl-2. Algunos miembros (Bid y Bax) son pro-apoptóticos y otros (Bcl-X_L y Bcl-2) son anti-apoptóticos. Los ligandos anti-apoptóticos (factores de crecimiento y citoquinas) activan Akt y p90rsk, que a su vez inhiben Bad e impiden la liberación de citocromo *c*. Leyenda de flechas y colores: rojo, quinasas; verde, factores de transcripción; flecha simple (→), efecto directo; flechas múltiples o punteadas (⇢), efecto en varios pasos; flecha acabada en punta, efecto estimulador; flecha acabada en T, modificación inhibitoria; flecha azul (→), translocación; flecha roja (→), estimulación de la transcripción. Para abreviaturas, ver índice de abreviaturas.

En el proceso de apoptosis, la membrana plasmática es el lugar principal donde comienza la cascada de reacciones que conducen a la célula hacia su muerte. Ciertos lípidos de membrana se han identificado como moléculas relevantes en los procesos de apoptosis. Así las ceramidas, moléculas centrales en el metabolismo de los esfingolípidos que actúan como segundos mensajeros lipídicos, pueden provocar un aumento de apoptosis (Yao *et al.,* 1995; Zhang *et al.,* 1996; Wiesner *et al.,* 1997). Los mecanismos moleculares que ejecutan el proceso incluyen la activación directa de la caspasa 3 (Smyth *et al.,* 1996), la potenciación de la permeabilidad mitocondrial, (Pastorino *et al.,* 1999) y la modulación de los niveles de algunas proteínas quinasas, entre ellas Akt, al inhibir de forma directa la actividad quinasa de Akt e impidiendo su fosforilación (Zhou *et al.,* 1998).

El factor de transcripción NF-κB es un importante regulador de la respuesta celular al estrés. Clásicamente se activa durante la respuesta inflamatoria, las infecciones virales y bacterianas, el aumento de radicales libres y numerosas situaciones que supongan una agresión a la célula. Dentro de los genes regulados por este factor de transcripción se encuentran numerosos genes implicados en la respuesta apoptótica de las células. Por ello, juega un papel importante en la regulación de los procesos de supervivencia y muerte celular por apoptosis en el sistema nervioso, modulando la muerte celular durante el desarrollo, la protección de neuronas del hipocampo ante el estrés oxidativo (Mattson *et al.,* 1997) y en algunos desórdenes neurodegenerativos (Barger y Mattson, 1996; Mattson *et al.,* 2000).

1.2.2. Muerte celular programada durante el desarrollo del sistema nervioso

Durante el desarrollo del sistema nervioso, entre un 20-80% de las células diferenciadas son eliminadas por MCP en momentos concretos y bien definidos coincidentes con el establecimiento de conexiones sinápticas (Oppenheim, 1991).

Este tipo de muerte, también llamada *muerte neuronal fisiológica o muerte natural* fue observada por primera vez por Víctor Hamburger y Rita Levi-Montalchini (Levi-Montalchini, 1949) en los ganglios espinales, torácicos y cervicales del embrión de pollo durante los días 5 y 6 de desarrollo embrionario (E5-E6).

La finalidad de esta pérdida de neuronas de forma programada durante el desarrollo del sistema nervioso es una de las cuestiones más estudiadas desde que se descubrió este proceso. Las neuronas son producidas en exceso durante el desarrollo embrionario y, en un determinado momento, compiten por una cantidad limitada de factores de supervivencia o factores neurotróficos suministrados por otras neuronas o células diana. Esta es la base de la llamada *Teoría Neurotrófica*. Sólo aquellas neuronas que accediesen a su factor neurotrófico sobrevivirían, ajustándose de esta manera el número de neuronas inervantes al número de células en el tejido diana (Hofer y Barde, 1988; Oppenheim, 1989).

Esta hipótesis se confirmó con el aislamiento de una molécula con actividad neurotrófica, el NGF (Levi-Montalcini, 1987). El NGF permite la supervivencia de neuronas simpáticas, de una subpoblación de neuronas sensoriales y de una población de neuronas colinérgicas de los núcleos de la base (Levi-Montalcini, 1987), de tal manera que su eliminación (Gorin y Johnson, 1979; Levi-Montalcini, 1987), o el bloqueo de su transporte retrógrado (Johnson *et al.,* 1979; Yan *et al.,* 1988) causa la muerte de estas. Inversamente, la administración de NGF exógeno disminuye la MCP de estas poblaciones (Oppenheim *et al.,* 1982), indicando que este factor es producido en cantidades limitantes por tejidos diana en los cuales se han detectado niveles altos de NGF.

Hoy en día, se ha ampliado el concepto de neurotrofismo, que incluye la dependencia trófica de diferentes tipos neurales, así como la de células glíales en varios estadios del desarrollo (Korsching, 1993). Las señales de supervivencia no sólo recaen en los factores neurotróficos, sino en otros factores de crecimiento pertenecientes a varias familias (incluidos neurotransmisores liberados por las

neuronas terminales aferentes), así como en la actividad eléctrica de los axones de neuronas vecinas. La *Teoría Neurotrófica* ha permitido establecer una base conceptual para la aceptación de la muerte celular como un proceso fisiológico que ocurre durante diferentes etapas del desarrollo de los organismos.

1.2.3. Muerte neural temprana.

La Teoría Neurotrófica se ha centrado en caracterizar los procesos de muerte relacionados con neuronas diferenciadas y células de la glía maduras como ya hemos explicado en el apartado anterior (Oppenheim, 1991; Henderson, 1996; Pettmann y Henderson, 1998; Kuan *et al.,* 2000; Davies, 2003; Lossi y Merighi, 2003; Yuan *et al.,* 2003). Menos atención se ha prestado a otro acontecimiento de muerte que sucede en etapas anteriores del desarrollo: aquel que está relacionado con células neuroepiteliales proliferativas y neuroblastos recién diferenciados en los primeros días del desarrollo embrionario. Hoy en día la muerte neural temprana es aceptada como una fase de muerte fisiológica del desarrollo (de la Rosa y de Pablo, 2000; Lossi y Merighi, 2003; Yeo y Gautier, 2004, Boya y de la Rosa, 2005), y estudios recientes de diferentes laboratorios comienzan a poner de manifiesto su relevancia (Roth y D'Sa, 2001; Panchision y McKay, 2002; Lossi y Merighi, 2003; Yeo y Gautier, 2004).

Hay muchas evidencias de que la muerte neural temprana es un proceso necesario para el desarrollo normal en vertebrados. La prueba definitiva ha sido aportada por los animales modificados genéticamente; aquellos que han sido manipulados a nivel de las vías de regulación o ejecución de la MCP presentan generalmente letalidad embrionaria en edades tempranas e hipertrofias del tejido nervioso. Un ejemplo muy clarificador es el de los ratones nulos para caspasas. Los mutantes nulos para caspasa-3 y caspasa-9, las proteasas efectoras de la MCP, presentan malformaciones en el cerebro, un número excesivo de células en determinadas regiones del córtex, el cuerpo estriado, el hipocampo, el cerebelo y la

retina (Kuida *et al.,* 1996, 1998; Leonard *et al.,* 2002). Trabajos *in vivo* con otros modelos de vertebrados apoyan lo obtenido con los modelos genéticos. Así, la interferencia *in ovo* (en el interior del huevo) con la muerte fisiológica del embrión de pollo en estadio de neurulación tardía tiene como resultado la aparición de malformaciones embrionarias (Hernández-Sánchez *et al.,* 2002, 2003).

No obstante, aún se desconoce la base funcional de la MCP que ocurre en etapas más tempranas del desarrollo. Algunos autores defienden como posible causa un ajuste del número de células por existencia limitada de factores tróficos, de una forma similar a la planteada en la *Teoría Neurotrófica*. Discuten que en muchos sistemas los procesos de proliferación y muerte parecen estar acoplados, de forma que las señales mitogénicas son capaces de inducir muerte, además de proliferación, mientras no reciban señales de supervivencia (Abrams, 2002; Abrams y White, 2004). De esta manera, células proliferativas competirían por cantidades limitadas de factores neurotróficos como mecanismo de ajuste de su número. Como hipótesis alternativa y de carácter adaptativo, también se postula que las células competirían entre ellas produciéndose de esta manera una selección de aquellas más eficientes (Díaz y Moreno, 2005). En cualquier caso, los aspectos funcionales de la muerte neural temprana son objeto de debate y controversia.

Todas estas observaciones apoyan la idea de que la muerte de precursores neurales en etapas tempranas del desarrollo es necesaria para que el sistema nervioso en vertebrados se forme correctamente.

Una de las principales razones por las que la muerte neural temprana ha sido considerada fisiológicamente poco relevante en el desarrollo de vertebrados ha sido la escasa información que se ha tenido acerca del número de células que mueren durante el proceso. La muerte neurotrófica se ha podido cuantificar mediante un seguimiento de poblaciones específicas de neuronas diferenciadas que han ido desapareciendo en el transcurso del desarrollo. De manera complementaria, ha sido posible cuantificar las poblaciones neuronales que sobreviven cuando se añaden

factores neurotróficos exógenamente. Sin embargo, en el caso de la muerte neural temprana, esta aproximación no se puede utilizar ya que durante el desarrollo temprano los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada coexisten en el espacio y en el tiempo. A esto hay que añadir que la mayoría de los estudios se han centrado en analizar, mediante técnicas de detección de apoptosis, como son TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUTP nick End-Labeling) o ISEL+ (In Situ End Labeling) el número de núcleos picnóticos en momentos muy concretos y regiones muy localizadas del desarrollo temprano de los organismos, subestimando la incidencia y magnitud del proceso. El resultado ha sido la cuantificación de un número relativamente bajo de células muriendo, tanto en los pocos estudios cuantitativos (Díaz *et al.,* 1999 y 2000) como en los estudios cualitativos que se han realizado (Cook *et al.,* 1998). Hasta que no se han empezado a realizar estudios detallados de los procesos de muerte temprana y a normalizarlos adecuadamente en los tejidos afectados, se ha considerado que el proceso de MCP temprana tenía lugar de forma casual y azarosa.

1.2.4. Poblaciones celulares afectadas por la muerte neural temprana.

Durante los estadios de desarrollo temprano, el sistema nervioso está formado por células neuroepiteliales que juegan un papel importante en los movimientos morfogenéticos y de especificación regional. Las células neuroepiteliales sufren secuencialmente procesos de proliferación y diferenciación generando células madre, progenitores neurales, neuroblastos o glioblastos jóvenes y finalmente neuronas diferenciadas o células de la glía. A lo largo de los años, múltiples estudios han puesto de manifiesto que la muerte temprana afecta a células que antes de morir se encuentran en fase S del ciclo, es decir, en proliferación (Homma *et al.,* 1994; Galli-Resta y Ensini, 1996; Thomaidou *et al.,* 1997; Díaz *et al.,* 1999; Lossi y Merighi, 2003).

Otra evidencia de que la muerte neural temprana afecta a células proliferativas la encontramos en los ratones nulos de caspasa-3 y caspasa-9, en los que se ha detectado una disminución de la muerte en la capa ventricular del tubo neural, región en la que se dividen activamente los progenitores neuroepiteliales. Según estos resultados y los obtenidos por otros investigadores (Ross, 1996; Conlon y Raff, 1999) podemos sugerir la idea de que los procesos de muerte y proliferación actúan para controlar el número de células durante el desarrollo temprano del sistema nervioso.

Sin embargo, la población de precursores proliferativos no parece ser la única población afectada por los procesos de muerte. Existen aproximaciones *in vivo* que apoyan la idea de que el proceso de muerte también está asociado a la propia neurogénesis o nacimiento de neuronas. En Xenopus, el bloqueo de la proliferación con inhibidores selectivos no afecta a la muerte celular temprana. Sin embargo, una inhibición de la muerte provoca una disminución de la neurogénesis, indicando que el proceso de MCP es necesario para que ésta transcurra de forma normal. De manera inversa, una inducción de la neurogénesis provoca un aumento de la MCP. Los autores proponen que los procesos de muerte temprana actuarían como un mecanismo de corrección contra posibles errores temporales en la diferenciación neural (Yeo y Gautier, 2003, 2004 y 2005).

1.3. La retina embrionaria de pollo como modelo de estudio de los procesos de muerte celular programada durante el desarrollo neural.

La retina embrionaria de pollo forma parte del sistema nervioso central y ha sido clásicamente empleada en estudios de desarrollo. Su fácil accesibilidad y su independencia materna junto con el amplio conocimiento de la ontogenia del pollo, han hecho de ella un excelente modelo para estudiar el desarrollo mediante cultivos organotípicos, manipulaciones *in ovo* y cultivos de embriones en placas (Hernández-Sánchez *et al.,* 1995; Díaz *et al.,* 1999 y 2000; Mayordomo *et al*., 2003;). En el presente trabajo, la retina embrionaria de pollo se ha empleado para estudiar *in vivo* e *in vitro* los elementos ejecutores y reguladores de la MCP durante el desarrollo del sistema nervioso.

1.3.1. Desarrollo de la retina embrionaria del pollo.

El ojo de pollo comienza a desarrollarse a partir de la formación de las vesículas ópticas (VO) en la región anterior del prosencéfalo a partir de las 30 horas de incubación. A las 40 horas de incubación ya se han formado la VO y la placoda de la lente. Aproximadamente a las 55 horas de incubación y a medida que la placoda se internaliza, la parte más distal de la VO se invagina para formar la copa óptica (Rager y Rager, 1979; Hilfer y Yang, 1980; Martin-Partido *et al.,* 1988), cuya capa más externa forma el epitelio pigmentario de la retina y cuya capa más interna constituye el neuroepitelio pseudoestratificado de la retina. A las 72 horas la lente se está diferenciando y aparece el tallo óptico (Mey y Thanos, 1992) (Fig. 1.3 A-C).

En los primeros días de desarrollo, la retina neural está constituida por células neuroepiteliales que sufren divisiones mitóticas sucesivas y que no están

determinadas hacia una vía específica de diferenciación. La proliferación de la retina transcurre en la región ventricular, situada por debajo del futuro epitelio pigmentario (EP). Tras su última división mitótica, los progenitores neurales migran radialmente hacia la zona vitreal y se diferencian a neuroblastos. El momento en el que el progenitor se divide por última vez se denomina "nacimiento" de la neurona (Gilbert, 1988).

La neurogénesis de la retina de pollo comienza a partir de E2 en el área dorso-temporal de la región central de la retina. A medida que transcurre el desarrollo, la neurogénesis avanza hacia la periferia y aumentan los tipos celulares diferenciados, completándose hacia E12 (Prada *et al.,* 1991). De acuerdo con Prada y colaboradores, hay un gradiente dorsal-ventral y temporal-nasal en el desarrollo de la retina (Prada *et al.,* 1991). En aves, las células ganglionares son las primeras en diferenciarse. Después lo harán de forma secuencial y con gran solapamiento en el tiempo, las células amacrinas seguidas de las células horizontales, los fotorreceptores y las células de Müller, y, finalmente las células bipolares (Prada *et al.,* 1991) (Fig. 1.3 D). A medida que un mayor número de células salen de ciclo, la retina pasa de estar en fase de proliferación a estar en fase de diferenciación. Finalmente, los procesos de migración y diferenciación neuronal transforman la retina en un órgano sensorial diferenciado y estructurado. El patrón de estratificación definitivo se establece en E16 (Mey y Thanos, 2000). En el pollo, la capa plexiforme interna (CPI) se distingue entre días E7-8 (Meller y Tetzlaff, 1976) y la capa plexiforme externa (CPE), donde se encuentran las proyecciones de las células horizontales se distingue entre E9-10 (Coulombre, 1955). Las primeras sinapsis se ven en E13 en la CPI, donde se encuentran las proyecciones de las células ganglionares y amacrinas fundamentalmente (Meller, 1964). La respuesta eléctrica de los fotorreceptores no se desarrolla hasta E17 y se completa en el día 3 post-natal (Mey y Thanos, 2000).

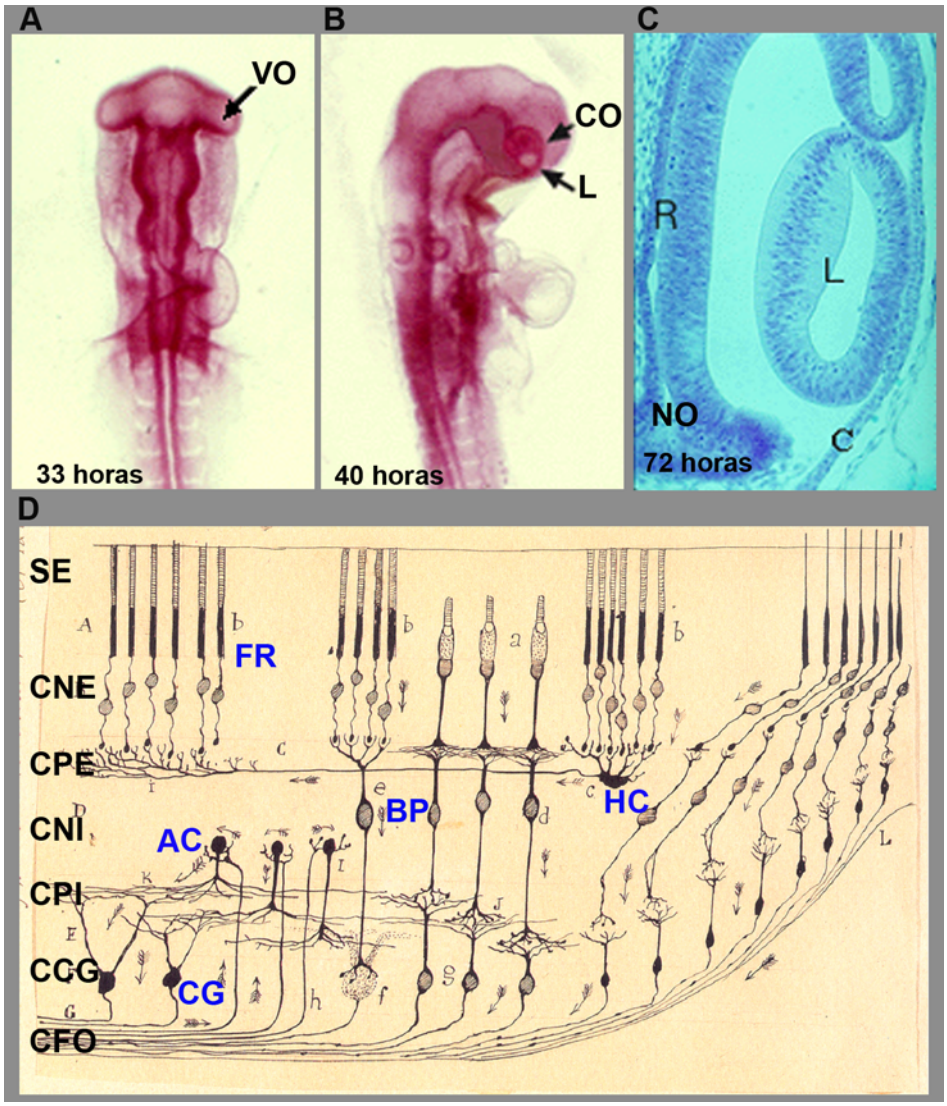


Figura 1.3. Desarrollo de la retina en el embrión de pollo. A) El desarrollo del ojo comienza a partir de la formación de las vesículas ópticas (VO) en la zona rostral del prosencéfalo aproximadamente a las 33 horas de desarrollo. (B) A las 40 horas ya se ha formado la copa óptica (CO) y la placoda de la lente (L)**.** C) A medida que la placoda se internaliza, la parte más distal de la vesícula óptica se invagina para formar la copa óptica, cuya capa más externa forma el epitelio pigmentario de la retina y cuya capa más interna constituye el neuroepitelio pseudoestratificado de la retina. D). La retina se presenta como una estructura organizada en tres capas nucleares y tres capas plexiformes. Las capas nucleares son: capa nuclear externa (CNE), formada por el cuerpo de los fotorreceptores (FR); capa nuclear interna (CNI), formada por el cuerpo de las células bipolares (BP), células horizontales (HC), células amacrinas (AC) y las células de la glía de Müller; capa de células ganglionares (CCG) formada por células ganglionares de la retina (CG). Las capas plexiformes corresponden a: capa plexiforme externa (CPE), formada por las conexiones entre las células horizontales, bipolares y fotorreceptores y capa plexiforme interna (CPI), formada por las conexiones entre las células ganglionares, amacrinas y bipolares. En la zona ventricular se encuentran el epitelio pigmentario y el segmento externo de los fotorreceptores (SE). Los axones de las células ganglionares forman la capa de fibras del nervio óptico (CFO).
VO, vesícula óptica; CO, copa óptica; L, lente; R: retina neural; C, coroides.
Imágenes A-C obtenidas en:www.uoguelph.ca/. Imagen de Santiago Ramón y Cajal en D obtenida en: www.aragonesasi.com

1.3.2. Muerte Celular Programada en el desarrollo de la retina neural de pollo.

Durante el desarrollo de la retina del pollo se han descrito varias fases de muerte celular. Una primera fase, asociada a la formación de la copa óptica y la morfogénesis de la retina, que transcurre durante los dos primeros días de desarrollo (Strongin y Guillery, 1981; Garcia-Porrero *et al.,* 1984; Martin-Partido *et al.,* 1988; Navascues *et al.,* 1989; Cole y Ross, 2001; Trousse *et al.,* 2001; Candal *et al.,* 2005). Una segunda fase, que coincide con la etapa de neurogénesis y la proyección de los primeros axones procedentes de las células ganglionares, afecta a progenitores proliferativos y neuroblastos recién diferenciados (Silver y Sapiro, 1981; Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido *et al.,* 1988; Díaz *et al.,* 1999 y 2000; Pimentel *et al.,* 2000; Mayordomo *et al.,* 2003; Pequignot *et al.,* 2003). Finalmente, en etapas tardías del desarrollo, una tercera fase que afecta a neuronas durante los procesos de conectividad neuronal y sinaptogénesis explicados por la *Teoría Neurotrófica* (Rager, 1980; Young *et al.,* 1984; Williams *et al.,* 1985; Dunlop y Beazley, 1987; Cook *et al.,* 1998; Marin-Teva *et al.,* 1999; Cole y Ross, 2001; Francisco-Morcillo *et al.,* 2004; Candal *et al.,* 2005). Aunque la mayoría de los estudios de muerte se han centrado en las células ganglionares, también se han descrito patrones de muerte en las diferentes capas de la retina de pollo (Cook *et al.,* 1998) y de codorniz (Marin-Teva *et al.,* 1998; Marin-Teva *et al.,* 1999). En la capa de células ganglionares (CCG), se ha descrito un máximo en la densidad de muerte en E10 tanto en pollo como en codorniz (Rager y Rager, 1978; Rager, 1980; Cook *et al.,* 1998; Marin-Teva *et al.,* 1998 y 1999). En la capa nuclear interna (CNI) el máximo se alcanza en E11 en pollo y en E12 en codorniz.

Estudio previos en nuestro laboratorio, mediante inyecciones *in ovo* con un inhibidor general de caspasas, habían demostrado que al menos un 50% de la muerte que acontece en la retina neural del pollo durante el desarrollo temprano es ejecutada

por las caspasas. En consecuencia la inhibición de estas proteasas provocaban un aumento en el número de células recién salidas de ciclo. El otro 50% de las células que están muriendo en estos estadios tan tempranos del desarrollo no son dependientes de caspasas, por lo que cabe pensar que existe más de un mecanismo de regulación de la muerte en estas edades (Mayordomo *et al.,* 2003).

No tenemos conocimiento de que se haya abordado el estudio de los procesos de muerte, proliferación y neurogénesis de una forma conjunta en estas edades tempranas del desarrollo de la retina neural. La caracterización de estos procesos ayudaría a comprender la magnitud real de los mismos y a determinar las poblaciones afectadas.

1.3.3. Factores extracelulares que regulan la muerte neuronal de la retina durante el desarrollo.

A nivel extracelular, la ausencia de factores tróficos es responsable de la muerte neuronal durante la fase tardía de desarrollo. Las neurotrofinas son polipéptidos que juegan un papel crucial en el desarrollo del sistema visual de vertebrados (Hallböök, 1996). Entre los miembros de la familia se encuentran el NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-6 y NT-7. Estos factores actúan uniéndose a sus receptores, entre los cuales se encuentra la familia de Trk que incluye TrkA, TrkB y TrkC. Estos receptores unen de forma específica e individual neurotrofinas (Barbacid, 1994). También existe el receptor de baja afinidad para NGF, también conocido como p75. Este receptor une neurotrofinas con diversa afinidad y no presenta actividad tirosina quinasa.

EL NGF controla la MCP de neuroblastos post-mitóticos durante el desarrollo a través de su unión a p75. La unión de NGF a p75 supone una señal de muerte que regula el número de neuronas recién diferenciadas (Frade *et al.,* 1996).

No obstante, la expresión de NGF en células horizontales de la retina del pollo también permite la supervivencia de estas de una forma autocrina (Karlsson *et al.,* 2001). El BDNF, a través de la activación de TrkB, actúa como factor trófico controlando la supervivencia de células ganglionares de la retina. El NT-3 se expresa en la mayoría de los tipos celulares de la retina durante el desarrollo (Hallböök, 1993). Juega un papel esencial en el desarrollo embrionario normal y la diferenciación celular (de la Rosa *et al.,* 1994a) y se ha propuesto que su ausencia puede inducir una muerte masiva de células ganglionares recién diferenciadas en la retina (Bovolenta *et al.,* 1996).

Por otro lado, la insulina y los factores de crecimiento de la familia de la insulina, son capaces de revertir la muerte celular en cultivos de neurorretinas embrionarias y en embriones de pollo (Díaz *et al.,* 1999 y 2000; Hernández-Sánchez *et al.,* 2002). La proinsulina, el precursor de la insulina se expresa de forma endógena en la retina (Hernández-Sánchez *et al.,* 1995). A su vez, otros factores de crecimiento de la familia como el IGF-I también se expresan en la retina lo largo del desarrollo embrionario y regulan la MCP. (Díaz *et al*, 2000).

1.4. La familia de la insulina durante el desarrollo neural.

1.4.1. La insulina y los factores relacionados con la familia de la insulina.

La familia de factores polipeptídicos de la insulina está formada por la propia insulina, su precursor la proinsulina, por el IGF-I, el IGF-II y hasta otras siete proteínas de tipo relaxina (Kasik *et al.,* 2000). La insulina puede producirse en tejidos no pancreáticos, tales como el tejido nervioso adulto (Rosenzweig *et al.,* 1980) o en tejidos embrionarios (De Pablo y Roth, 1990; Giddings y Carnaghi, 1990; Deltour *et al.,* 1993; De Pablo y de la Rosa, 1995). En ellos actúa de forma autocrina/paracrina

regulando procesos biológicos relacionados con el desarrollo, crecimiento y supervivencia celular (de la Rosa y De Pablo, 2000; Varela *et al.,* 2003). Además, se ha descrito que la insulina y otros factores relacionados con la familia de la insulina modulan de manera positiva múltiples procesos durante el desarrollo neural, así como en la fisiología neuronal y en el adulto (Varela-Nieto *et al.,* 2003).

La proinsulina se procesa a insulina por la acción de las convertasas PC2 y PC3. En estadios embrionarios pre-pancreáticos y en la retina embrionaria de vertebrados, la proinsulina permanece no procesada debido a la ausencia de expresión de al menos la convertasa PC2 (Alarcon *et al.,* 1998; Hernández-Sánchez *et al.,* 2002).

A pesar de que la insulina siempre se ha considerado una hormona pancreática, en las últimas décadas y en varias especies de vertebrados se ha detectado mRNA de proinsulina previo a la formación del primordio del páncreas (De Pablo *et al.,* 1982; Serrano *et al.,* 1989; Schultz *et al.,* 1993; de la Rosa *et al.,* 1994b). En etapas más tardías del desarrollo también se ha visto expresión en tejidos extrapancreáticos como la neurorretina, el hígado y el saco de la yema del embrión (de la Rosa *et al.,* 1994b; Alarcon *et al.,* 1998; Moore *et al.,* 2001), aunque su expresión siempre es siempre muy baja en relación a la encontrada en el páncreas. En el embrión de pollo, desde la gastrulación a la organogénesis temprana se ha detectado expresión de proinsulina en células pertenecientes a los tres linajes embrionarios (Hernández-Sánchez *et al.,* 2002). En definitiva, la insulina y los factores de la familia, forman un conjunto de moléculas presentes en el sistema nervioso desde los primeros momentos de su desarrollo. Intervienen, además, de forma positiva regulando procesos de supervivencia neuronal, neurogénesis y proliferación, lo que confiere a estas moléculas una gran versatilidad funcional.

1.4.2. Receptores de la familia de la insulina.

El receptor de insulina (IR) y el receptor de IGF tipo I (IGF-IR), pertenecen a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa. Ambos receptores están formados por un dímero covalente de dos subunidades α y dos subunidades β. Los monómeros idénticos se ensamblan en la membrana plasmática mediante puentes disulfuro formando homodímeros en ausencia de ligando, a diferencia de otros receptores tirosina quinasa que dimerizan tras la unión del ligando. La subunidad β está anclada a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana y presenta además un dominio citoplasmático en el que reside la actividad tirosina quinasa. La subunidad α es extracelular y presenta el dominio de unión al ligando (Ullrich *et al.,* 1985; Ullrich *et al.,* 1986). La afinidad del receptor de insulina (IR) por el ligando difiere en los principales factores de la familia. Así, aunque IR une preferentemente insulina, también es capaz de unir con 10 veces menos afinidad proinsulina, y con 100 veces menos afinidad IGF-I e IGF-II. Inversamente, el receptor de IGF-IR une IGF-I e IGF-II con gran afinidad, pero también es capaz de unir insulina aunque con 100-1000 veces menos afinidad y prácticamente no puede unir proinsulina (García de-Lacoba *et al.,* 1999).

En tejidos donde se co-expresan el receptor de insulina y el de IGF tipo I, se pueden formar receptores híbridos por la dimerización de un monómero α/β de cada receptor. Aunque no se ha caracterizado el receptor a través del cual señaliza la proinsulina, estudios previos parecen indicar que se trata de un receptor híbrido con poca capacidad para discriminar entre los diferentes ligandos de la familia (García de–Lacoba *et al.,* 1999), (Fig.1.4).

La expresión de los receptores de insulina se produce desde etapas muy tempranas del desarrollo, incluso de forma previa a la aparición de algunos de sus ligandos (Girbau *et al.,* 1989). Su función fisiológica durante el desarrollo se pone de

manifiesto con el análisis de los ratones nulos; así pues, los mutantes nulos para el gen del IR presentan un retraso de un 10% en el crecimiento embrionario y letalidad post-natal por problemas metabólicos, diabetes y cetoacidosis (Accili *et al.,* 1996; Joshi *et al.,* 1996). Los ratones mutantes para el IGF-IR presentan un importante retraso en el crecimiento embrionario (45%) y muerte post-natal temprana por fallo respiratorio.

De forma general, podemos concluir que las múltiples funciones que presentan la insulina y los factores de la familia en el sistema nervioso se deben, al menos en parte, a la versatilidad de los receptores de la familia. Tanto su expresión diferencial a lo largo del desarrollo como los diferentes grados de afinidad por sus ligandos pueden explicar las múltiples vías de señalización que se activan a través de estos receptores.

1.4.3. Señalización a través de receptores de la familia de la insulina.

La autofosforilación del receptor tras la unión del ligando en residuos específicos de tirosina hace posible que el receptor reclute proteínas sustrato susceptibles de ser también fosforiladas. Los sustratos más próximos al receptor incluyen a los miembros de las proteínas adaptadoras IRSs. La fosforilación de Shc e IRS1 permite la activación de dos vías de señalización, cuyos principales mediadores son MAPK y PI3K (Fig.1.4). Las MAPK o MEK intervienen en varias vías de señalización intracelular como respuesta a múltiples factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores. Su activación requiere de la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina por una proteína quinasa (MAPKK o MEKK). La familia de las MAPK/MEK engloban a tres grandes grupos: ERK (extracelullar signal-regulated kinase), JNK/SAPK (C-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) y p38. Dentro de la familia, el grupo ERK 1/2 (p42/p44 MAPK) tiene varias funciones en el desarrollo del sistema nervioso. Una vez activada, ERK 1/2, fosforila sustratos relacionados con procesos celulares implicados en proliferación, diferenciación,

supervivencia celular y transcripción de genes como CREB (Combettes-Souverain e Issad, 1998). Por otra parte, la vía de señalización de PI3K interviene en la regulación del tamaño celular, el metabolismo, transmite una fuerte señal antiapoptótica y puede promover proliferación celular (Datta *et al.,* 1999; Morrison *et al.,* 2002). La PI3K cataliza la fosforilación del grupo 3'hidroxi de los fosfatidil-inositoles. Los productos de esta reacción parecen regular procesos celulares a través de interacciones con proteínas que presentan el dominio plecstrina (PH). Estas incluyen a la PDK1 cuyo homólogo en mamíferos es Akt/PKB.

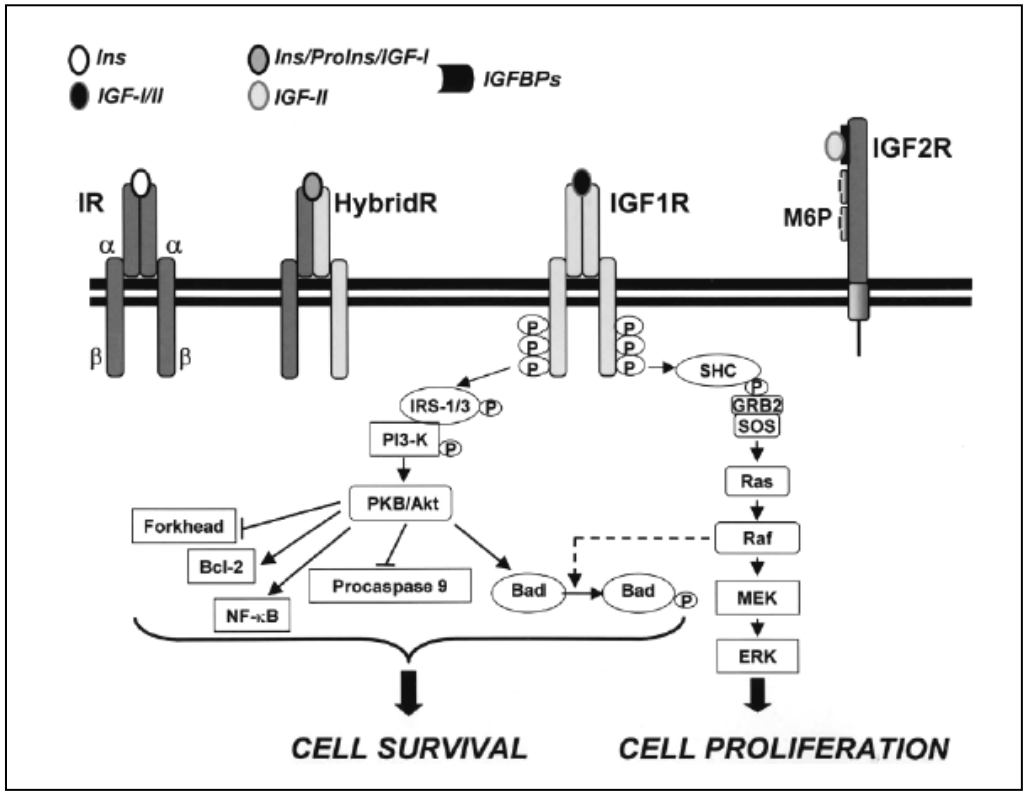


Figura 1.4. Esquema de las principales vías de señalización activadas por insulina y factores relacionados. El receptor de insulina (IR) y el de IGF-I (IGF-IR) son dímeros constituidos por dos subunidades α citosólicas y dos subunidades β transmembrana con actividad tirosina quinasa. Los receptores híbridos están formados por hemimoléculas del IR y del IGF-IR. La unión de los ligando a su receptor, activan diversas vías, principalmente la vía de las ERK y de PI3K, cuyas interconexiones se traducen finalmente en efectos en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. (Imagen tomada de Varela *et al* 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto de Tesis es la caracterización de la incidencia y regulación de la muerte celular programada durante el desarrollo temprano del sistema nervioso de vertebrados, utilizando como modelo la retina de embrión de pollo.

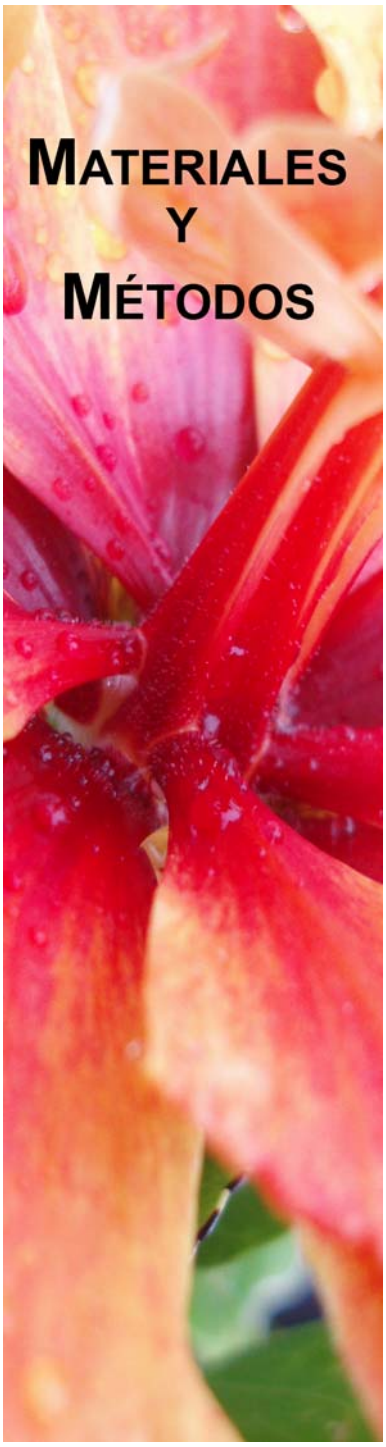
Dicho objetivo global se ha desarrollado a través de los siguientes objetivos concretos:

2.1. Caracterización *in vivo* del proceso de muerte celular programada durante las etapas tempranas del desarrollo, en particular de su magnitud e incidencia en la retina embrionaria de pollo.

2.2. Caracterización *in vivo* de las distintas poblaciones celulares afectadas por los procesos de muerte temprana en la retina embrionaria de pollo.

2.3. Caracterización *in vitro* de los mecanismos de ejecución de la muerte celular programada en un modelo de células inmortalizadas de retina embrionaria de codorniz (línea RTC5).

2.4. Caracterización *in vitro* de los mecanismos de ejecución de la muerte y de regulación de la supervivencia en cultivos organotípicos de retina embrionaria de pollo en diferentes estadios del desarrollo.


MATERIALES
Y
MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Embriones de pollo.

En los experimentos se emplearon huevos fertilizados de *Gallus gallus*, raza White Leghorn (granja Rodríguez Serrano, Alba de Tormes, Salamanca). Los embriones se desarrollaron en un incubador humidificado y con giro automático, a 38ºC durante el periodo de tiempo indicado para cada experimento. Los métodos de experimentación empleados siguieron las directrices de la Unión Europea, estando a su vez aprobados por la comisión de Bioética del CSIC.

El trabajo aquí presentado abarca varios estadios embrionarios Para nombrar estos estadios se han empleado tanto los criterios de horas/días de desarrollo como de estadio definido por Hamburger y Hamilton (1951). En el desarrollo inicial del embrión de pollo es posible observar que suceden importantes cambios morfológicos en el transcurso de muy pocas horas. A medida que el desarrollo avanza, es necesario que pasen muchas más horas para poder observar cambios morfológicos significativos. En la Tabla 1 se muestran las equivalencias.

El fenotipo de los embriones empleados para caracterizar los procesos de MCP durante el desarrollo temprano se muestran en la figura 3.1. A. Se puede observar en el embrión de HH17 la aparición del primordio de las extremidades y la flexura craneal, aunque todavía no se ha producido la curvatura del tronco. En el embrión de HH18 ya se ha producido la flexura cervical. En los embriones de HH20 y HH21 ya se ha formado el alantoides, el epitelio externo de la retina ya está pigmentado y el embrión empieza a inclinarse produciéndose una aproximación entre la cabeza y el primordio de la cola. Las edades empleadas para estudiar los mecanismos de señalización de la MCP fueron de día 5 (HH25 ó E5) y de día 9 (HH35 ó E9). En la figura 3.1. B se muestra las características morfológicas de ambas edades.

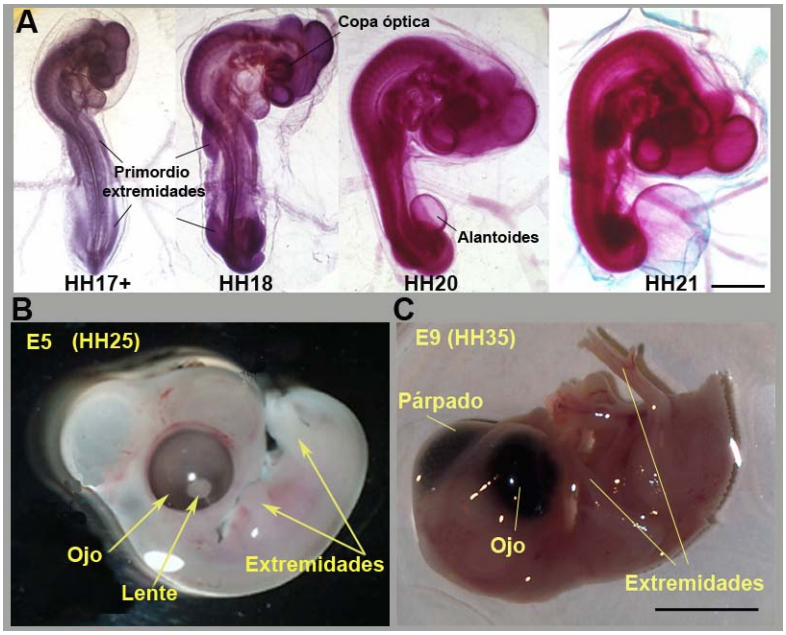


Figura.3.1 Características morfológicas de estadios embrionarios. A) Imágenes representativas de embriones de pollo entre estadios HH17 y HH21 empleados para la caracterización de la muerte temprana. En estos estadios se aprecia el cambio en las flexuras cervical y del tronco. B). Embriones de E5 (HH25) C). Embrión de E9 (HH35) Los estadios embrionarios fueron determinados según Hamburger y Hamilton (1951). Barra en A = 0,3cm; C = 2 cm para E9 y 1 cm para E5.

Tabla 1: Correspondencias entre los estadios según Hamburger y Hamilton (HH) y la edad embrionaria de los estadios embrionarios empleados en el presente trabajo.

Estadio según Hamburger y Hamilton (HH)	Edad Embrionaria
17	52-64 horas
18	65-69 horas
19	68-72 horas (3 días)
20	70-72 horas (3 días)
21	84 horas (3,5 días)
22	86 horas (3,5-4 días)
23	83-96 horas (4 días)
25	108 horas (4,5-5 días)
35	8,5-9 días

En los embriones de E5 se aprecian los tres primeros dedos de las extremidades y el pico empieza a formarse. En el embrión de E9 ya son distinguibles las falanges de los dedos y la presencia de los párpados con forma elíptica extendidos hacia el globo ocular.

3.2. Aislamiento de la neurorretina embrionaria de pollo.

Para aislar la retina neural del resto de los tejidos del ojo (epitelio pigmentario, cristalino, procesos ciliares, etc.) se emplearon tres abordajes diferentes en función del estadio embrionario. En todos los casos, una vez extraídos del huevo, los embriones se lavaron con PBS para eliminar restos de sangre, yema y clara del huevo. Las disecciones se llevaron a cabo bajo la lupa (Leica MZ8, Alemania) en placas con PBS a 37ºC.

3.2.1. Aislamiento de la neurorretina en diferentes estadios embrionarios.

Entre HH17 y HH23, para aislar la retina neural del resto del ojo se procedió, utilizando el embrión como punto de apoyo, a retirar el cristalino y el cuerpo vítreo con ayuda de pinzas de disección. A continuación, se separó la estructura del resto del embrión y se separó la neurorretina del resto de los tejidos (incluido el epitelio pigmentario ya presente a partir de HH20) abriendo a nivel de tallo óptico y tirando suavemente hacia arriba. Las retinas se montaron en plano sobre una membrana de nitrocelulosa negra (Sartorius, Goettingen, Alemania) y a continuación se fijaron en PFA 4% *(p/v)* (Merck, Darmstadt, Alemania) en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 a 4ºC durante toda la noche.

Para aislar la neurorretina en embriones de E5 y E9, éstos se depositaron en placas con PBS y, con ayuda de unas pinzas, se extrajeron los ojos eliminando bien el

tejido conjuntivo de alrededor. Cada ojo se depositó en una placa con PBS a 37ºC para facilitar la retirada de las capas del globo ocular, incluido el epitelio pigmentario que en estas edades está más adherido a la retina neural.

En los embriones de E5, la separación del epitelio pigmentario del resto de la retina se realizó mediante una incisión en la fisura óptica, a la altura de la salida del nervio óptico. Una vez hecha la incisión y con ayuda de las pinzas se levantó el epitelio pigmentario tirando en direcciones opuestas. A continuación se procedió a eliminar el cristalino liberando la neurorretina de todas las estructuras que la rodean.

En los embriones de E9, una vez limpiado el ojo de tejido conjuntivo y del párpado, fue el cristalino. Para ello, con las pinzas se rompieron los procesos ciliares del ojo y a continuación se pinchó el interior del ojo extrayendo el cuerpo vítreo firmemente adherido al cristalino. En esta edad embrionaria, el pecten (estructura a través de la cual se nutre y oxigena la retina) está completamente formado. Para separar la neurorretina del epitelio pigmentario se realizó una incisión a nivel de pecten y a continuación se levantó todo el epitelio.

3.3. Tratamientos de embriones *in vivo*.

3.3.1. Marcaje en ventana mediante la incorporación de BrdU.

El marcaje en ventana ha sido empleado para caracterizar el destino de células proliferativas, mediante la incorporación de precursores de la síntesis de DNA en la fase S del ciclo celular durante un tiempo determinado (Belecky-Adams *et al.,* 1996). En nuestros experimentos, empleamos como precursor de la síntesis de DNA el nucleótido análogo de la timidina, 5'-Bromo 2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Para llevar a cabo el marcaje, los huevos se incubaron a 38ºC en posición vertical con la cámara de aire hacia arriba. Con unas pinzas curvas se abrió un agujero de aproximadamente 1,5 cm. en la cáscara y se retiraron la

membrana de la cáscara y las membranas vitelinas que recubren al embrión dentro del huevo (Fig.3.2).

La ventana de marcaje se inició con un pulso de BrdU (2,5 μg/huevo) en un volumen final de 25 μL que fue inyectado con una micropipeta duchando el ojo del embrión. Transcurrida 1 hora, la ventana de marcaje se cerró mediante dilución por adición de un exceso de timidina (Sigma-Aldrich) (1,25 mg/huevo) en un volumen final de 16,7 μL inyectado de la misma forma (Fig.3.3 A). Así, sólo presentarían incorporación de BrdU aquellas células que hubiesen estado en fase S del ciclo en algún momento del intervalo determinado por el pulso de BrdU y el pulso de timidina. Una vez realizado el marcaje, el huevo se cubrió con cinta adhesiva para evitar la deshidratación y fue incubado de nuevo a 38ºC.

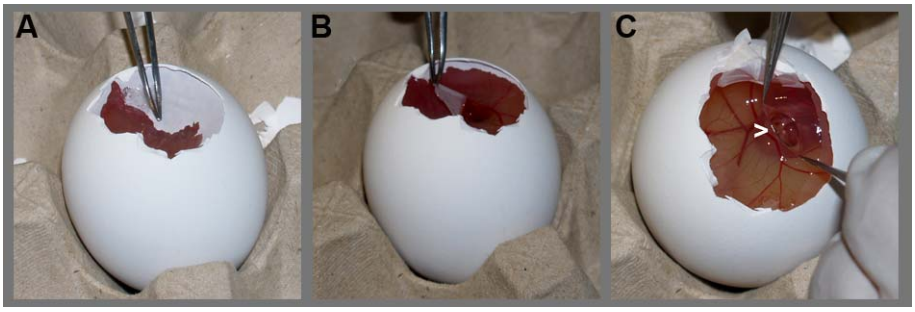


Figura 3.2. Proceso de manipulación durante el marcaje *in vivo* para pollos de E5 y E9. A) La membrana de la cámara de aire se humedeció con PBS. B) Se procedió a retirar la membrana con la ayuda de unas pinzas curvas con cuidado de no provocar hemorragias C) Con pinzas finas se realizó una incisión en las dos membranas vitelinas (flecha blanca), a través de la cual fueron realizados los tratamientos *in vivo*, introduciendo la punta de micropipeta a través de la incisión practicada.

Transcurridas las horas de incubación necesarias en cada experimento, los embriones fueron extraídos del huevo y su estadio determinado de nuevo según Hamburger y Hamilton (1951). Las retinas se montaron en plano y tras la fijación en PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, fueron procesadas para visualizar

proliferación, MCP y diferenciación con los marcadores adecuados (ver apartados 3.7 y 3.8).

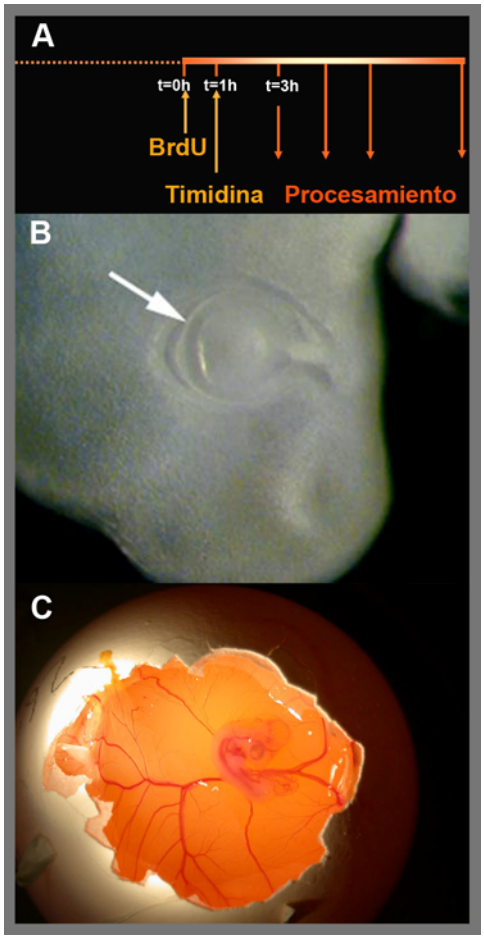


Figura 3.3. **Marcaje en ventana**. A) Esquema del diseño experimental del marcaje en ventana. B) La flecha indica el área de de tratamiento sobre el ojo mediante ducha en un embrión de estadio temprano HH18. C) Posición de incubación del embrión en el interior del huevo durante los tratamientos *in ovo*. Una vez finalizado el tiempo de incubación de la ventana los embriones fueron extraídos y su estadio final determinado según Hamburger y Hamilton (1951).

3.3.2. Marcaje con BrdU y tratamientos con inhibidores.

Los huevos fueron incubados siguiendo el mismo procedimiento que en el marcaje en ventana (3.3.1). El marcaje con BrdU y los tratamientos con el inhibidor de MEK, U-0126 *in vivo* se realizaron sobre embriones de E5 y E9. En estas edades, los embriones se encuentran incluidos en el interior del huevo, cubiertos por las membranas vitelinas, vasos sanguíneos, clara y yema. Al no presentar de forma directa la cabeza, una vez practicada la incisión sobre las membranas vitelinas, se aplicaron los tratamientos introduciendo la punta fina de la micropipeta a través del agujero de las membranas asegurando de esta forma la difusión de los compuestos.

Se añadieron 2,5 μg de BrdU por huevo en un volumen de 25 μL. De forma simultánea, cuando fue necesario se añadieron 25 μL de una solución 100μM de U-126 (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.) Los huevos se cubrieron con cinta adhesiva y se incubaron durante 6 horas. Las retinas fueron disecadas y montadas en plano sobre membranas de nitrocelulosa, fijadas durante 18 horas a 4ºC con PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1M pH 7,4. Finalmente fueron procesadas para la detección de MCP y marcadores de proliferación y/o diferenciación con los anticuerpos adecuados.

3.4. Cultivos organotípicos de neurorretinas.

El cultivo organotípico de retina preserva las interacciones funcionales y anatómicas del tejido, de manera similar a las condiciones fisiológicas presentes en el embrión, a la vez que permite el control de las condiciones de cultivo en un medio definido y los tratamientos farmacológicos.

El cultivo de neurorretinas completas se realizó en un medio químicamente definido carente de suero denominado **MN2**. De esta forma se pudo llevar a cabo el aislamiento de nuestro sistema de la señalización endógena embrionaria y el estudio *in vitro* de los mecanismos de supervivencia y muerte en dos edades embrionarias, E5 y E9. La composición del medio de cultivo **MN2** fue: DMEM-F12 (1:1) (Sigma-Aldrich), suplementado con 100 μg/mL de apo-transferrina (Sigma-Aldrich), 16 μg/mL de putrescina (Sigma-Aldrich), 6 ng/mL de progesterona (Sigma-Aldrich), 5,2 μg/mL de selenito sódico (Sigma-Aldrich) y 50 μg/mL de gentamicina (Gibco, Paisley, Scotland, U.K.). La glutamina 2 mM (Gibco) fue añadida fresca en cada ensayo realizado para evitar su degradación y un posible efecto citotóxico.

3.4.1. Tratamiento de cultivos organotípicos de retinas de E5 y E9.

Retinas de E5 y E9 una vez disecadas, fueron cultivadas en el medio definido **MN2** en ausencia de factores de crecimiento (-FC) o en presencia de insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich), según las concentraciones indicadas para cada experimento. Los tratamientos se realizaron durante 6 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Para evitar el acondicionamiento del medio, las retinas de E5 se incubaron en placas de 24 pocillos con 2 mL de medio por pocillo y retina. Las retinas de E9 fueron cultivadas en placas de 12 pocillos con 3,5 mL de medio por pocillo y retina. Se hicieron los siguientes tratamientos a distintos tiempos y concentraciones finales diferentes:

- **Tratamientos con inhibidores de catepsinas**. Se emplearon los inhibidores de catepsina B, z-FA-fmk 150 μM (Calbiochem) y catepsina L, z-FF-fmk 20 μM (Calbiochem), en cultivos de retinas de E5 y E9. Las retinas fueron cultivadas durante 6 horas.
- **Tratamientos con el inhibidor general de caspasas Boc**. Se empleó el inhibidor Boc-D-fmk 38 μM (Calbiochem) en cultivos retinas de E5 y E9 cultivadas durante 6 horas.
- **Tratamiento con el inhibidor de PI3K.** Las retinas de E5 y E9 se preincubaron durante 30 minutos con el inhibidor, Ly-294002 50 μM o 150 μM, periodo tras el cual fueron tratadas con o sin insulina 100 nM.
- **Tratamiento con el inhibidor de MEK-ERK.** Retinas de E5 y E9 fueron preincubadas durante 30-40 minutos con U-0126 (Calbiochem) 50 μM ó 150 μM o PD-98059 50 μM, (Calbiochem). A continuación fueron tratadas con o sin insulina 100 nM durante 6 horas.

- **Tratamiento con el inhibidor del factor de transcripción nuclear NF-κB.** Retinas de E5 fueron preincubadas durante 3 horas con del inhibidor SN50 y el control de inhibición SN50M 50 μg/mL (Biomol Internacional LP, Plymouth Meeting, PA, EE.UU.). SN50 es el péptido inhibidor de la translocación al núcleo de NF-κB y SN50M es el péptido inactivo control con una secuencia de translocación mutada. A continuación fueron tratadas con o sin insulina 100 nM durante 6 horas.
- **Tratamiento con Ceramida 2-fosfato.** Retinas de E5 fueron cultivadas en presencia de Cer-2 2, 5 y 10 μM (Sigma-Aldrich) durante 6 horas.
- **Tratamiento con el análogo de timidina 5-Bromo-2'-deoxiuridina.** Para cuantificar la proliferación en determinados experimentos, se añadió BrdU 5 μM (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo, en presencia o ausencia de insulina 100 nM y los inhibidores correspondientes.

Después de los tratamientos, las retinas fueron montadas en plano, fijadas en PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 18 horas a 4ºC. Posteriormente fueron procesadas para la visualización y cuantificación de la MCP y/o marcadores de proliferación o diferenciación.

3.5. Disociación de retinas embrionarias de E5 y E9.

El método de disociación fue empleado para una cuantificación más precisa de las proporciones relativas de núcleos picnóticos, núcleos proliferativos y células diferenciadas en retinas de E5 y E9. El procedimiento fue el siguiente:

- Tras el cultivo organotípico, se transfirió cada retina a un tubo de 2,5 mL de fondo redondeado con 800 μL de PBS y 50 μL de BSA 30 mg/mL en PBS.
- Se colocaron los tubos en un bloque térmico a 37ºC y se añadieron 10 μL de tripsina (100 mg/mL en PBS) (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.) moviendo suavemente el tubo para mezclarla.
- Transcurridos 10 minutos se obtuvo una suspensión celular pasando el contenido del tubo por una pipeta Pasteur larga siliconizada entre 2-3 veces y muy suavemente.
- Se añadieron 10 μL de DNAsa (5mg/mL en PBS) y, tras agitar suavemente, se dejó incubar durante 10 minutos.
- Finalmente se añadieron 10 μL de EDTA (0,5M, pH 8,0) disgregando completamente el tejido con ayuda de la pipeta Pasteur.
- Una vez finalizada la digestión, se añadieron 850 μL de PFA 8% *(p/v)* y se procedió a la fijación durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente.
- Tras la fijación, se realizaron tres lavados con BSA 3 mg/mL en PBS mediante centrifugaciones de 5 minutos a 200 g en una centrífuga de mesa (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Finalmente se resuspendieron los precipitados celulares en una solución de BSA 3 mg/mL, EDTA 5mM, azida sódica 0,1% (p/V) en PBS.
- El número de células se cuantificó para cada muestra resuspendida mediante una cámara de Neubauer. Se ajustó el volumen de solución para obtener entre 40.000 y 50.000 células en cada cito-centrifugación.

3.6. Cultivos celulares de una línea inmortalizada de retina embrionaria de codorniz (RTC5).

La línea RTC5 fue cedida por el grupo de Elisabeth Pollerberg (Max Planck-Institute for Developmental Biology, Tübingen, Alemania). Esta línea se generó en su laboratorio mediante transducción retroviral de un cultivo primario de retina temporal de codorniz de E3,5 con el oncogen myc. Se empleó el oncogen myc por su capacidad inductora de proliferación y su compatibilidad con la diferenciación. Para inmortalizar el cultivo primario se diseñó un gen quimera mycER, que contenía el gen viral v-myc y un dominio de unión al receptor de estrógeno (ER) que permitió la regulación hormonal de la actividad inductora de proliferación de myc (Pollerberg et al., 1995). El clon 5 aislado en el proceso de transducción originó la línea inmortalizada de retina embrionaria temporal llamada **RTC5**. La figura 3.4.A muestra un resumen esquemático de la obtención de la línea. La línea presentó una población de células neuroepiteliales y una subpoblación con características morfológicas de células ganglionares. Estudios posteriores demostraron que la línea podía inducirse a diferenciación neuronal añadiendo el factor básico de crecimiento de fibroblastos FGF-2 a 20 ng/mL y que las células diferenciadas presentaban marcadores de células ganglionares (Pollerberg y Eickholt 1995).

Teniendo en cuenta que la línea presentaba una subpoblación de células neuroepiteliales capaz de diferenciarse a células ganglionares, una elevada capacidad proliferativa, y susceptibilidad a diferenciación inducible con FGF-2 se decidió llevar a cabo el mantenimiento de los cultivos para realizar experimentos de señalización intracelular *in vitro*.

3.6.1. Cultivo de mantenimiento.

- El mantenimiento de la línea se llevó a cabo en un medio suplementado con suero y laminina, que denominamos medio **MS10** y cuya composición fue: DMEM-F12 HAM (1:1) (Sigma-Aldrich) sin glutamina, suplementado con suero de ternero fetal 8% *v/v* (Sigma-Aldrich), suero de pollo 2% *v/v* (Sera-Lab, Sussex, U.K.), gentamicina 50 mg/mL (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco) añadida fresca y β-estradiol 2 μM (Sigma-Aldrich) en etanol. El medio, una vez preparado fue filtrado (Stericup System, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) y conservado a 4ºC.
- Las células se incubaron a 37ºC en una atmósfera de 5% de CO_2. Se emplearon para su mantenimiento botellas de cultivo de tejidos de 75 cm^2 (BD Falcon, Bradford, MA, EE.UU.).
- En cada pase, generalmente a razón 1:20 cada cuatro días, las células fueron lavadas con PBS y despegadas de la placa mediante tratamiento durante 2 minutos con tripsina-EDTA 1:25 (*v/v*) (Gibco) a 37ºC.

En la figura 3.4. B-D se muestran imágenes representativas de las características fenotípicas del cultivo de mantenimiento.

3.6.2. Protocolos de proliferación y diferenciación de la línea RTC5.

En cada ensayo realizado, después de despegar las células de la placa de cultivo con tripsina, se cuantificó el número de células viables con el colorante vital Tripan Blue en una cámara de Neubauer. A continuación, las células se sembraron en cámaras-portaobjetos de 8 pocillos (Chamber Slide System, Lab-Tek, Rochester, NY, EE.UU.) y se mantuvieron en el medio adecuado según el protocolo a seguir.

Transcurridos los periodos de tratamiento las células se fijaron en PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 24 horas a 4ºC y fueron procesadas para la cuantificación de la muerte y la proliferación.

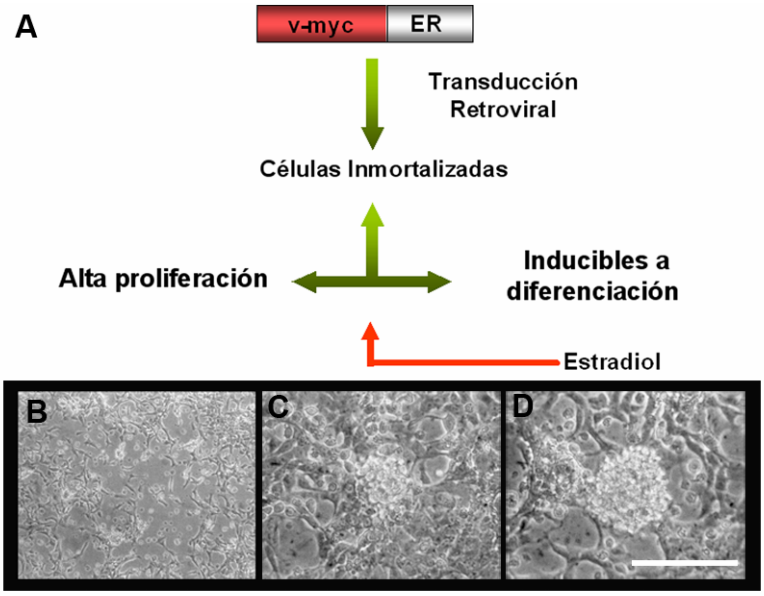


Figura 3.4. Características de la línea inmortalizada RTC5. A) La línea RTC5 se obtuvo a partir de un cultivo primario de retina temporal embrionaria (E3.5) de codorniz y se inmortalizó mediante transducción retroviral con el oncogen v-myc. Es una línea con alta proliferación añadiendo β-estradiol al medio de cultivo y, a su vez, inducible a diferenciación añadiendo FGF-2 al medio de cultivo. B-D) Los paneles muestran fotografías de microscopia óptica invertida en las condiciones óptimas de cultivo, en presencia de laminina y una mezcla de suero fetal bovino y de pollo. Barra = 200 μm en B, 80 μm en C y 20 μm en D.

- **Protocolo de proliferación.** Las cámaras-portaobjetos se trataron con 0,5 μg/mL de laminina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en agua. Se sembraron tres cámaras con 2.500 células/cm^2 en medio MS10. Transcurridas 24 horas, el medio fue renovado y las células se mantuvieron en estas condiciones durante 48 horas más. Tras las 72 horas de cultivo en medio MS10, éste fue lavado tres veces con PBS a 37ºC y sustituido por un medio definido MN2 sin suero. Las células se

incubaron en este medio durante 6 horas en presencia o ausencia de insulina 100 nM. Para cuantificar la proliferación, una hora antes de finalizar el tratamiento se añadió BrdU 5 μM al medio. En la figura 3.5. A se resume de forma esquemática el protocolo de proliferación.

- **Protocolo de diferenciación.** Se sembraron tres cámaras con 2.500 células/cm^2, en medio MS10 con laminina 0,5 μg/mL (Invitrogen) y se incubaron durante 48 horas. Transcurridas las 48 horas, el medio MS10 se renovó y se añadió FGF-2 20 ng/mL para inducir diferenciación. Las células se mantuvieron en presencia de FGF-2 durante 24 horas. Tras las 72 horas de cultivo en medio MS10 + FGF-2, el medio MS10 fue sustituido por medio sin suero MN2 + FGF-2, en presencia o ausencia de insulina 100 nM. Las células se incubaron durante 6 horas en estas condiciones. Para cuantificar la proliferación se añadió BrdU 5 μM al medio una hora antes de finalizar el tratamiento. En la figura 3.5. B se resume de forma esquemática el protocolo de diferenciación.

3.6.3. Experimento de dosis respuesta a FGF-2.

- Se sembraron dos cámaras-portaobjetos con 1.500 células/cm^2 en medio MS10 con suero y laminina (5 μg/mL). Se añadieron diferentes concentraciones de FGF-2 (0, 5, 10, 20 ng/mL). Las células se mantuvieron en cultivo durante 120 horas. Una hora antes de terminar el periodo de tratamiento se añadió BrdU 5 μM al medio.

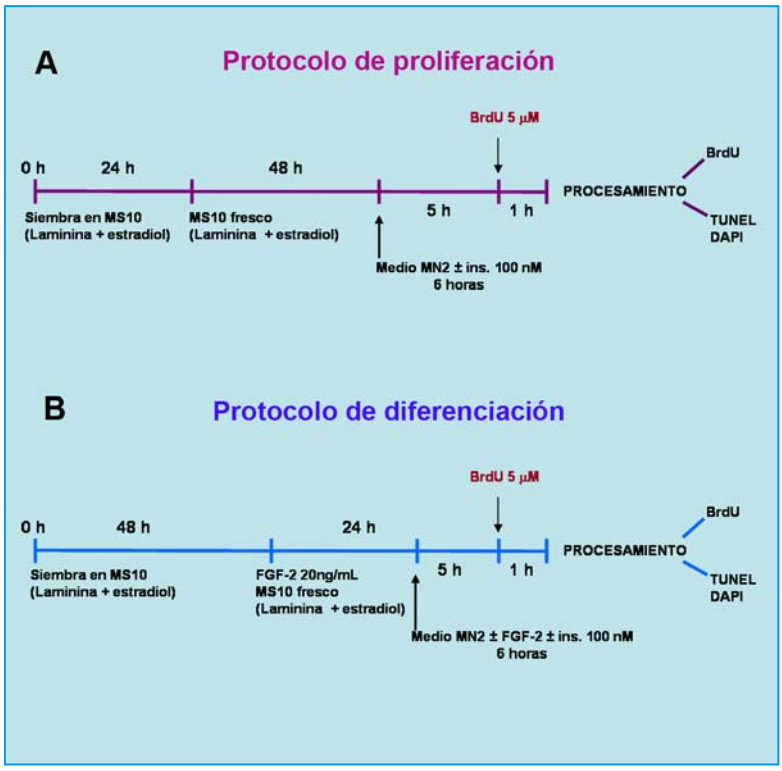


Figura 3.5. Protocolos de proliferación y diferenciación de la línea RTC5. Después del último pase las células se sembraron y mantuvieron durante 72 horas en medio MS10 con suero, laminina y estradiol. A) En el protocolo de proliferación, tras las 72 horas de crecimiento, se trataron con o sin insulina100 nM en un medio definido MN2 sin suero durante 6 horas. B) En el protocolo de diferenciación se añadió FGF-2 al medio MS10 24 horas antes del tratamiento con o sin insulina en el medio definido MN2. En ambos protocolos se añadió de BrdU 5 µM, 1 hora antes de finalizar el tratamiento con o sin insulina.

3.7. Detección de la muerte celular programada.

La MCP fue detectada mediante diferentes métodos en función del material biológico da partida (secciones de retinas embrionarias, células de una línea primaria de retina de codorniz, células disociadas de retina o retinas montadas en plano). Las diferentes técnicas empleadas se detallan a continuación.

3.7.1. Detección de la muerte celular por la técnica TUNEL.

Para la detección de muerte celular se utilizó la técnica de TUNEL. La técnica se basa en la capacidad de la enzima transferasa terminal (TdT) para añadir nucleótidos (dUTP) marcados con fluoresceína a los extremos 3´-OH libres del DNA. Esto permite detectar mediante microscopía de fluorescencia los fragmentos de DNA que se generan por endonucleasas específicas durante el proceso de MCP. La detección de dichos fragmentos nucleotídicos se realizó con un "Kit" de TUNEL comercial (DeadEnd^{TM} Fluorimetric TUNEL System, Promega, Madison, WI, EE.UU.). La técnica se realizó sobre células primarias inmortalizadas de retina de codorniz (RTC5), células disociadas, secciones de retina embrionaria y retinas montadas en plano ajustando los tiempos del protocolo para cada tejido.

Como pasos generales dentro del protocolo se estableció:

- Un paso de permeación con Tritón X-100 (Fluka, Buchs, Suiza) cuyo tiempo y porcentaje de detergente varió en función de la capacidad de permeación del tejido. Se aumentó el tiempo y el porcentaje de Tritón para las retinas montadas en plano con respecto a las secciones y las células disociadas (ver subapartados 3.7.1.1., 3.7.1.2. y 3.7.1.3.).
- Lavados sucesivos con tampón PBS para eliminar todo el detergente y así impedir la inhibición de la TdT y una preincubación con un tampón de equilibrado del Kit durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Preparación de la mezcla de reacción según las instrucciones del fabricante e incubación de las muestras durante 1 hora a 37ºC. Para detener la reacción se añadió a cada muestra 20 μL de una solución de SSC 2X y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura

ambiente. Tras varios lavados con tampón PBS las muestras se montaron sobre portas con una mezcla de DABCO 4% *(p/v)* (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) (Sigma-Aldrich), Glicerol 70% *(p/v)* (Calbiochem, Molecular Grade) para evitar la pérdida de fluorescencia por oxidación.

A continuación se detallan los protocolos de marcaje con TUNEL específicos para cada tipo de tejido.

3.7.1.1. Detección de la muerte celular mediante TUNEL en retinas montadas en plano.

- La retina neural, disecada del resto de los elementos del ojo, se montó bajo la lupa sobre una membrana de nitrocelulosa negra, para mejor contraste y manipulación de la misma durante el proceso de marcaje.
- Una vez montadas en plano, se fijaron con PFA al 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante toda la noche a 4ºC en placas de 24 pocillos.
- Al día siguiente se lavaron con PBS y con BSA (30 mg/mL en PBS). La permeación de la membrana celular se logró con Tritón X-100 al 1% *(p/v)* en PBS en el caso de retinas de estadios entre HH19 y HH25 (de E3-E5) y con Tritón X-100 al 4% (*p/v*) en PBS en el caso de retinas de HH35 (E9). Este paso, limitante para la entrada de la mezcla de reacción TUNEL, se realizó con dos incubaciones de 30 minutos y con agitación suave. A continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS hasta eliminar los restos de Tritón.
- Las retinas se incubaron en presencia de colagenasa para eliminar de forma enzimática componentes de la matriz extracelular. La colagenasa 20 U/mL

(Sigma-Aldrich) se dejó actuar durante 1 hora a 37ºC en el caso de las retinas de HH19-HH25 (E3-E5) y durante 1 hora y media en el caso de la retina de de HH35 (E9). Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se llevó a cabo la reacción de TUNEL, según se ha indicado anteriormente (apartado 3.7.1).

- Una vez montadas con DABCO-Glicerol, las retinas se analizaron por microscopía confocal (LEICA DMRE2). En el caso de retinas de estadios muy tempranos (HH19-HH23) se cuantificó el número de células TUNEL-positivas en la retina completa con el objetivo de 40X ó 63X. En el caso de las retinas de HH25 (E5) y HH35 (E9) se cuantificó el número de células TUNEL-positivas con el objetivo de 40X en cinco campos alrededor del nervio óptico. Para el análisis estadístico se empleó el programa Statgraphics Plus 5.1(VA, EEUU).

3.7.1.2. Detección de la muerte celular mediante TUNEL en secciones de retina.

- Una vez extraídas, las cabezas de los embriones de pollo de diferentes edades se fijaron con PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1M, y sacarosa 11% (p/v) durante 12 horas a 4ºC.
- Se crioprotegieron embebiéndolas en sacarosa 15% *(p/v)* en tampón fosfato hasta su hundimiento en la solución y después en sacarosa 30% *(p/v)* en tampón fosfato, hasta que las cabezas se hundieron de nuevo completamente. Para realizar las secciones de retinas, las cabezas se incluyeron en Tissue-Tek (Miles, Elkhart, IN, EE.UU.). Sobre este soporte se realizaron cortes seriados de 10 μm paralelos al eje óptico y al plano frontal del embrión con un criostato (CM1800, Leica). Se realizaron al menos 4 cortes a nivel de la zona central de la retina coincidiendo siempre con la salida del nervio óptico

- Para localizar la muerte celular dentro de las capas de la retina, se realizó la técnica TUNEL sobre las criosecciones de retina central, a nivel del nervio óptico (Fig.3.6). Para el marcaje de TUNEL en secciones se requiere menos permeación que para las retinas montadas en plano. Se realizaron dos series de permeaciones con BGT [BSA 3 mg/ml, Glicina 100 mM, Tritón X-100 0,25% *(p/v)* en PBS] de 15 minutos cada una. Las muestras se lavaron con PBS y se llevó a cabo la reacción de TUNEL como se ha indicado previamente. Para cubrir todas las secciones de un portaobjetos, se añadieron 50 µL de los reactivos correspondientes y se cubrieron con un cubreobjeto de plástico o un trozo de papel de parafina.
- Para calcular el número de células y la densidad celular en las críosecciones se empleó una modificación del método Dutting (Dutting *et al.,* 1983). Se cuantificaron las células TUNEL-positivas en 4 secciones de la misma retina, correspondientes a la región central, mediante microscopia de fluorescencia. En cada sección de retina se cuantificaron 2 campos con el objetivo de 40X a cada uno de los lados de la salida del nervio óptico (mostrado en la Fig.3.6). Se emplearon al menos cuatro embriones diferentes para cada edad embrionaria haciendo un total de 16 secciones de retina cuantificadas en cada estadio.

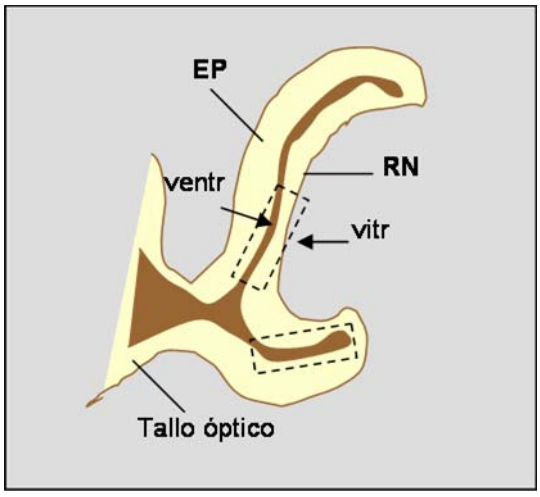


Figura 3.6. Sección frontal de retina embrionaria de pollo y áreas de contaje. Las secciones frontales de criostato se realizaron en la zona central de la retina, a nivel de la salida del nervio óptico. Las áreas rectangulares corresponden a las áreas de cuantificación de las células TUNEL-positivas. ventr, ventral; vitr, vitreal; EP, epitelio pigmentario de la retina; RN, retinal neural.

3.7.1.3. Detección de la muerte celular mediante TUNEL en células primarias inmortalizadas de retina de codorniz.

- Las células cultivadas sobre cámaras portaobjetos fueron lavadas y fijadas con PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante toda la noche a 4ºC.
- Al día siguiente, se lavaron con PBS para eliminar los restos de PFA y se permearon con 4 lavados de BGT de 15 minutos cada uno. A continuación se lavaron de nuevo con PBS y se procedió a la reacción de TUNEL preparando la mezcla de reacción como se ha descrito anteriormente, omitiendo el paso de permeación con Tritón X-100.
- Para teñir el total de núcleos celulares se empleó el colorante nuclear DAPI (4',6'-diamidino-2-phenilindol, Sigma-Aldrich). Para ello, tras la reacción de TUNEL y una vez lavadas las muestras, se incubaron 10 minutos en una solución de DAPI (4 μg/mL) en PBS. A continuación se procedió a un último lavado con PBS y al montaje con DABCO-Glicerol.
- La proporción de núcleos TUNEL positivos se cuantificó respecto al total de núcleos visualizados con DAPI mediante microscopia de fluoresencia (Zeiss Axioplan, Oberkochen, Alemania). Se cuantificaron cinco campos por cada tratamiento con un objetivo de 20X (aproximadamente entre 2.000-2.500 células). Para el análisis estadístico se empleó el programa Statgraphics plus 5.1.

3.7.2. . Detección de la muerte celular mediante tinción nuclear con DAPI en células disociadas de retina.

La determinación de la MCP en células disociadas permitió realizar una cuantifiación relativa de los niveles de muerte encontrados en retinas completas. El método de tinción de los cuerpos picnóticos con DAPI resultó adecuado en células disociadas debido al elevado grado de compactación que presenta la cromatina fragmentada, característica del fenotipo apoptótico. Con DAPI los núcleos apoptóticos aparecen más intensos y de menor tamaño siendo facilmente distinguibles de los núcleos que no han sufrido la fragmentación del DNA.

- Tras el cultivo, las retinas se lavaron dos veces con PBS y se disociaron según se ha descrito en el apartado 3.5.
- Se depositaron sobre cada embudo de citocentrifugación 100 μL de muestra con un total de 40.000 a 50.000 células. Cada embudo se encajó sobre una pinza de citocentrifugación (Slide Clips, Cytoclip™, THERMO Scientific, Boston, MA, EE.UU.), un flitro para citoespin (Shandon, THERMO Scientific) y un portaobjetos de vídrio previamente tratado con poli-L-lisina. Las citocentrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga de sobremesa (Cytospin 3, Shandon, Boston, MA, EE.UU.) a 700 r.p.m. durante 7 minutos y a temperatura ambiente. Se dejó que el portaobjetos se secara a temperatura ambiente y se delimitó el área de marcaje con un rotulador hidrófobo (Pap-Pen, G.Kisker-Products for Biotechnology, Steinfurt, Alemania).
- A continuación los portaobjetos fueron lavados tres veces seguidas con PBS y permeados con dos incubaciones de 20 minutos con BGT a temperatura ambiente. Tras la permeación se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS.

- La tinción de los núcleos apoptóticos se realizó con DAPI (4 μg/mL) en PBS durante 10 minutos. Las muestras fueron lavadas y montadas con DABCO-Glicerol.
- La tinción nuclear se detectó por iluminación ultravioleta con un microscopio de fluoresencia (Axioscop, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se cuantificó la proporción de núcleos apoptóticos DAPI-positivos respecto al total de núcleos, contando un mínimo de 2.000 células por muestra o, al menos, un mínimo de 10 células apoptóticas. El análisis estadístico se realizó empleando el programa Statgraphics Plus 5.1.

3.8. Inmunodetección de marcadores celulares.

3.8.1. Inmunodetección en retinas montadas en plano.

Se llevó a cabo un protocolo general de marcaje, con ciertas modificaciones específicas para determinados marcadores celulares. Las retinas, una vez disecadas y montadas en plano, se fijaron en PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 18 horas. La tinción se llevó a cabo en placas de 24 pocillos siguiendo estos pasos: **1**) tres lavados de 10 minutos con PBS, **2**) permeación de la membrana celular durante 1 hora a temperatura ambiente con Tritón X-100 1% (*p/v*) en PBS y en agitación suave. En el caso de retinas de E9 se empleó Tritón X-100 al 4% (*p/v*), **3**) tres lavados de 10 minutos con PBS y agitación suave para eliminar el Tritón.

A partir de este punto, el protocolo seguido cambió en función del marcador celular:

- Protocolo de marcaje para el marcador de neuroblastos recién diferenciados Islet 1/2:
    - Tratamiento con colagenasa 20 U/mL durante 1 hora a 37ºC.
    - Tres lavados de 5 minutos con BGT en agitación suave.
    - Incubación con el anticuerpo contra Islet 1/2 (monoclonal de ratón; 1/500 en BGT, clon 39.4D5, Developmental Studies Hybridoma Bank) durante 18 horas a 4ºC.
    - Tres lavados de 10 minutos con BGT.
    - Incubación con anticuerpo contra Ig de ratón conjugado con biotina (1/200, Molecular Probes, Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente.
    - Tres lavados con BGT de 10 minutos.
    - Incubación con estreptavidina conjugada con Texas Red 615 (1/100, Molecular Probes) 1 hora a temperatura ambiente.
    - Tres lavados de 15 minutos con BGT.
    - Montaje en DABCO 4% *(p/v)*-Glicerol 70% *(v/v).*

- Protocolo de marcaje para el marcador de neuroblastos recién diferenciados, TUJ-1 (β-III-tubulina).
    - Bloqueo durante 1 hora con NGS 15 % (Normal Goat Serum) en Tritón-X100 0,1 % (v/v) en PBS.
    - Incubación con el anticuerpo primario contra TUJ-1 [policlonal de conejo; 1/1.000 en NGS 15% (v/v), Tritón-X100 0,1% (*p/v*), Covance Innovative Antibodies, Berkeley, CA, EE.UU.], entre 4 y 16 horas a 4ºC.
    - Tres lavados con PBS de 5 minutos.
    - Incubación con anticuerpo secundario contra Ig de conejo conjugado con Alexa 647 (1/200, Molecular Probes), durante 2 horas a temperatura ambiente.

- Tres lavados de 15 minutos con BGT.
- Montaje en DABCO 4% *(p/v)*, Glicerol 70% *(v/v)*.

- Protocolo de marcaje para BrdU.
  - Incubación con HCl 2N en PBS durante 10 minutos.
  - Neutralización del HCl con dos incubaciones de 10 minutos con tampón Borax-Borato 0,1 M, pH 9,8.
  - Tres lavados de 10 minutos con PBS.
  - Bloqueo durante 1 hora con NGS 15 % en Tritón-X100 0,1 % (*p/v*) en PBS.
  - Incubación con el anticuerpo primario contra BrdU [G3G4, monoclonal de ratón; 1/1000 en NGS 15%, Tritón-X100 0,1% (*p/v*) en PBS; Developmental Studies Hybridoma Bank], 16 horas a 4ºC.
  - Tres lavados con PBS de 5 minutos.
  - Incubación con anticuerpo secundario contra Ig de ratón conjugado con Alexa 647 ó con Alexa 488 (1/200, Molecular Probes), durante 2 horas a temperatura ambiente.
  - Tres lavados de 15 minutos con BGT.
  - Montaje en DABCO 4% *(p/v)*-Glicerol 70% (*v/v*).

- Protocolo de inmunotinción doble TUJ-1-BrdU o combinada con TUNEL.
  - Tras la incorporación de BrdU mediante el marcaje en ventana (3.3.1) se procedió siguiendo con el protocolo de marcaje para BrdU descrito en el apartado anterior. Ambos anticuerpos primarios, anti-TUJ-1 y anti-BrdU, fueron incubados simultáneamente. Tras los lavados, las retinas fueron incubadas con anticuerpos secundarios de diferentes especies unidos a fluorocromos de diferentes longitudes de excitación.

- En el caso de la doble tinción con uno de los marcadores anteriores (anti TUJ-1 o anti BrdU) y TUNEL, el protocolo seguido fue el mismo que el empleado para cada marcador con la salvedad de que, en el paso previo a la incubación con anticuerpo secundario, se llevó a cabo la reacción TUNEL tal y como se ha descrito en el apartado 3.7.1. Una vez detenida la reacción TUNEL, se procedió a un lavado de 5 minutos con PBS y a la incubación con el anticuerpo secundario unido al fluorocromo durante dos horas a temperatura ambiente.

En la figura 3.7. se muestran retinas montadas en plano sobre las que se aplicó la técnica TUNEL y la inmunodetección de los marcadores celulares BrdU y TUJ-1 .

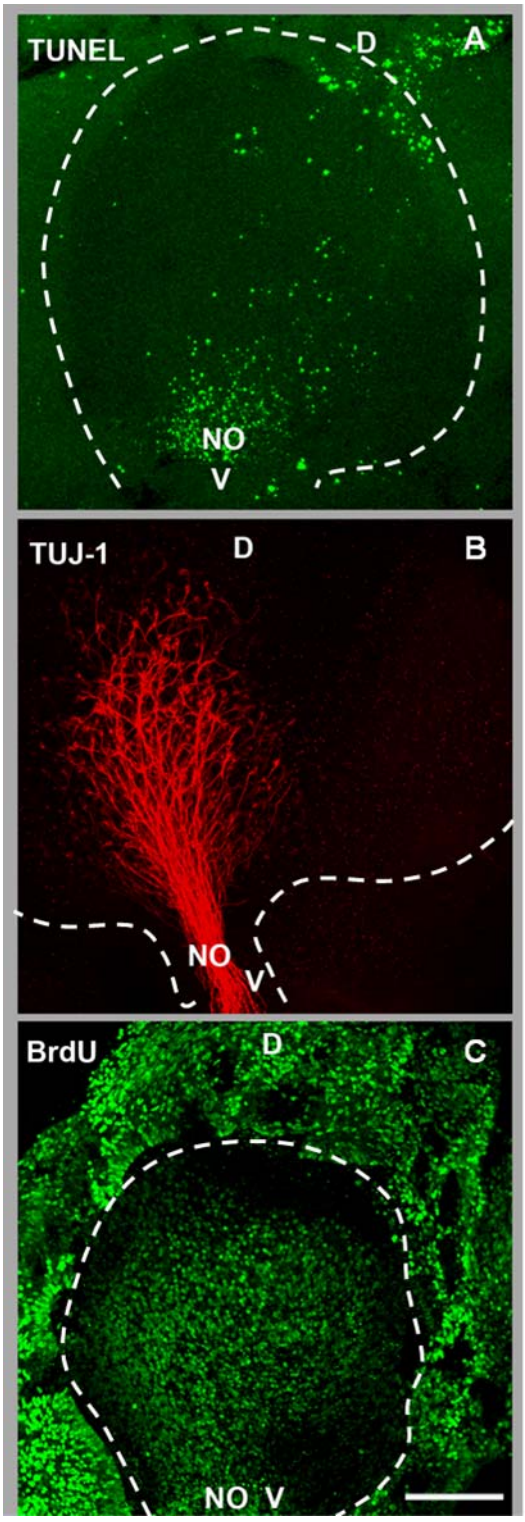


Figura 3.7. Muerte celular programada, diferenciación y proliferación en etapas tempranas del desarrollo de la retina embrionaria de pollo. A), Las imágenes tomadas mediante microscopia confocal muestran los procesos de: apoptosis mediante la técnica TUNEL en una retina de HH19 B) Diferenciación mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-TUJ-1, marcador de neuronas en una retina de HH20 C). Proliferación, medida como la incorporación de BrdU y marcada con un anticuerpo anti-BrdU en una retina de estadio HH17 La línea punteada limita el área correspondiente a la retina neural.

D, dorsal; V, ventral; NO, nervio óptico; Barra = 150 μm.

3.8.2. Inmunodetección en secciones de retinas.

Se siguió un protocolo básico de inmunotinción doble para TUJ-1 y BrdU, partiendo de cortes de cabezas de pollo de E 3,5 (HH21). Una vez extraídas, las cabezas se fijaron PFA 4% *(p/v)* en tampón fosfato 0.1M sacarosa 11% durante 12 horas a 4ºC. Se crioprotegieron embebiéndolas durante 5 horas en sacarosa 15% *(p/v)* en tampón fosfato 0.1M pH 7,1 y después en sacarosa 30% *(p/v)* en tampón fosfato 0.1M pH 7,1, hasta que las cabezas se hundieron completamente. Para realizar las secciones de retinas, las cabezas se incluyeron en Tissue-Tek (Miles) y sobre este soporte se realizaron cortes seriados de 10-13 μm paralelos al eje óptico con un criostato (CM1800, Leica).

- Permeación con BGT, 2 series de 15 minutos cada una. Las muestras se lavaron con PBS.
- Incubación con HCl 2N durante 10 minutos, seguida de neutralización con tampón Borax-Borato 0,1 M pH 9,8 con incubaciones de 10 minutos.
- Tres lavados de 10 minutos con PBS.
- Bloqueo durante 1 hora con NGS 15 % (Normal Goat Serum) en Tritón-X100 0,1 % (p/v) en PBS.
- Incubación con los anticuerpos primarios contra BrdU [G3G4, monoclonal de ratón y TUJ-1, policlonal de conejo; 1/1000 en NGS 15% Tritón 0,1% (p/v); Developmental Studies Hybridoma Bank y Covance respectivamente] durante 16 horas a 4ºC.
- Tres lavados con PBS de 5 minutos.
- Incubación con anticuerpo secundario contra Ig de ratón conjugado con Alexa 488 o Alexa 647 y contra Ig de conejo conjugado con Texas Red (1/200, Molecular Probes) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Montaje en DABCO 4% *(p/v)*, Glicerol 70% (*v/v*).

3.8.3. Inmunodetección en retinas disociadas.

- Alícuotas de 40.000 a 50.000 células se citocentrifugaron sobre portaobjetos previamante tratados con poli-L-lisina, evitando así que las células se despegaran en los pasos posteriores. Se delimitó el área de marcaje con un rotulador hidrófobo (Pap-Pen).
- A continuación los portaobjetos fueron lavados tres veces seguidas con PBS y permeados con dos incubaciones de 10 minutos con BGT, a temperatura ambiente. Tras la permeación se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS.
- Se incubaron con HCl 2N durante 10 minutos y después se neutralizó el ácido con tampón Borax-Borato 0,1 M pH 9,8 con incubaciones de 10 minutos.
- Tres lavados de 10 minutos con PBS.
- Incubación con los anticuerpos primarios contra BrdU [G3G4, monoclonal de ratón y TUJ-1, policlonal de conejo 1/1000, en NGS 15% (*v/v*) Tritón-X100 0,1% (*p/v*); Developmental Studies Hybridoma Bank y Covance, respectivamente] durante 16 horas a 4ºC.
- Tres lavados con PBS de 5 minutos.
- Incubación con anticuerpo secundario contra Ig de ratón conjugado con Alexa 488 y contra Ig de conejo conjugado con Texas Red (1/200, Molecular Probes, Invitrogen) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Tres lavados de 15 minutos con BGT.
- Incubación con con DAPI (4 μg/mL) en PBS durante 10 minutos.
- Dos lavados de 5 minutos con PBS.
- Montaje en DABCO 4% *(p/v)*, Glicerol 70% (*v/v*).

En la figura 3.8. se muestra un ejemplo representativo de los marcajes en células disociadas para proliferación y diferenciación contrastados con el marcador de núcleos DAPI.

3.8.4. Inmunodetección de proteínas en membrana mediante "western blot".

Los niveles proteicos de Akt, p-Akt, ERK y p-ERK se analizaron mediante la técnica de inmunodetección en membrana o "western blot".

- Una vez cultivadas, las retinas se lavaron dos veces con PBS y se homogenizaron en tubos de 1,5 mL haciéndolas pasar varias veces a través de agujas 21G (Microlance, Fraga, España) en tampón de lisis RIPA: Tris-HCl (50 mM, pH 7.4), NaCl 150 mM (Merck), EDTA 1 mM (Merck), Tritón X-100 1% *(p/v)* (Fluka), Na-deoxycholate 1% *(p/v)* (Merck), SDS 0.1% *(p/v)* (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). Para inhibir la actividad fosfatasa y evitar la degradación proteolítica, el tampón de lisis fue suplementado con los siguientes inhibidores: ortovanadato sódico 1 mM (Sigma-Aldrich), NaF 1 mM (Sigma-Aldrich), fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM (Sigma-Aldrich) y tableta mezcla de inhibidores de proteasas (complete Mini EDTA-free, Roche, Mannheim, Alemania). Las retinas de E5 fueron homogenizadas con 60 μL de RIPA y las retinas de E9 con 150 μL.
- Tras la homogenización, las muestras se mantuvieron en a 4ºC durante 15 minutos.
- Se procedió a su centrifugación a 20.000 xg, a 4ºC durante 15 minutos.
- Se cuantificó la concentración proteica de la fracción sobrenadante mediante el Kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). En cada ensayo se

estableció una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina y se cuantificaron tres réplicas por grupo experimental.

- Entre 30-50 μg de proteína se mezclaron con tampón de carga.
- Las muestras se calentaron a 90ºC durante 10 minutos y luego fueron fraccionadas en un gel SDS-PAGE al 8% *(p/v)* ó al 10% *(p/v)* de poliacrilamida para la inmunodetección de Akt/p-Akt y ERK/p-ERK respectivamente.
- La electrotransferencia se llevó a cabo a 100 V durante 100 minutos en cámara fría sobre membranas de nitrocelulosa (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.).
- El bloqueo de las membranas se realizó con BSA 3% *(p/v)*, Tween-20 1% (*v/v*) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Las incubaciones con anticuerpo primario se realizaron a 4ºC durante toda la noche en BSA 1% (p/v), Tween-20 1% (*v/v*) en PBS y con agitación suave. Los anticuerpos empleados fueron: anti-fosfo -Akt^{Ser473} (policlonal de conejo, 1:2000; Cell Signaling, Beverly, MA, EE.UU.); anti-Akt1 (policlonal de cabra, 1/2000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EE.UU.); anti-ERK1/2 (monoclonal de ratón, 1:1000; Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.); anti-fosfo-ERK1/2 (policlonal de conejo, 1:1000, Cell Signaling).
- Las membranas se revelaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1/20000, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) utilizando el sistema *Super Signal* (Pierce), exponiendo la membrana a películas X-Omat (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU.).
- Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron analizadas utilizando el programa GS-800 (BioRad), para su cuantificación, cuando ésta fue necesaria.

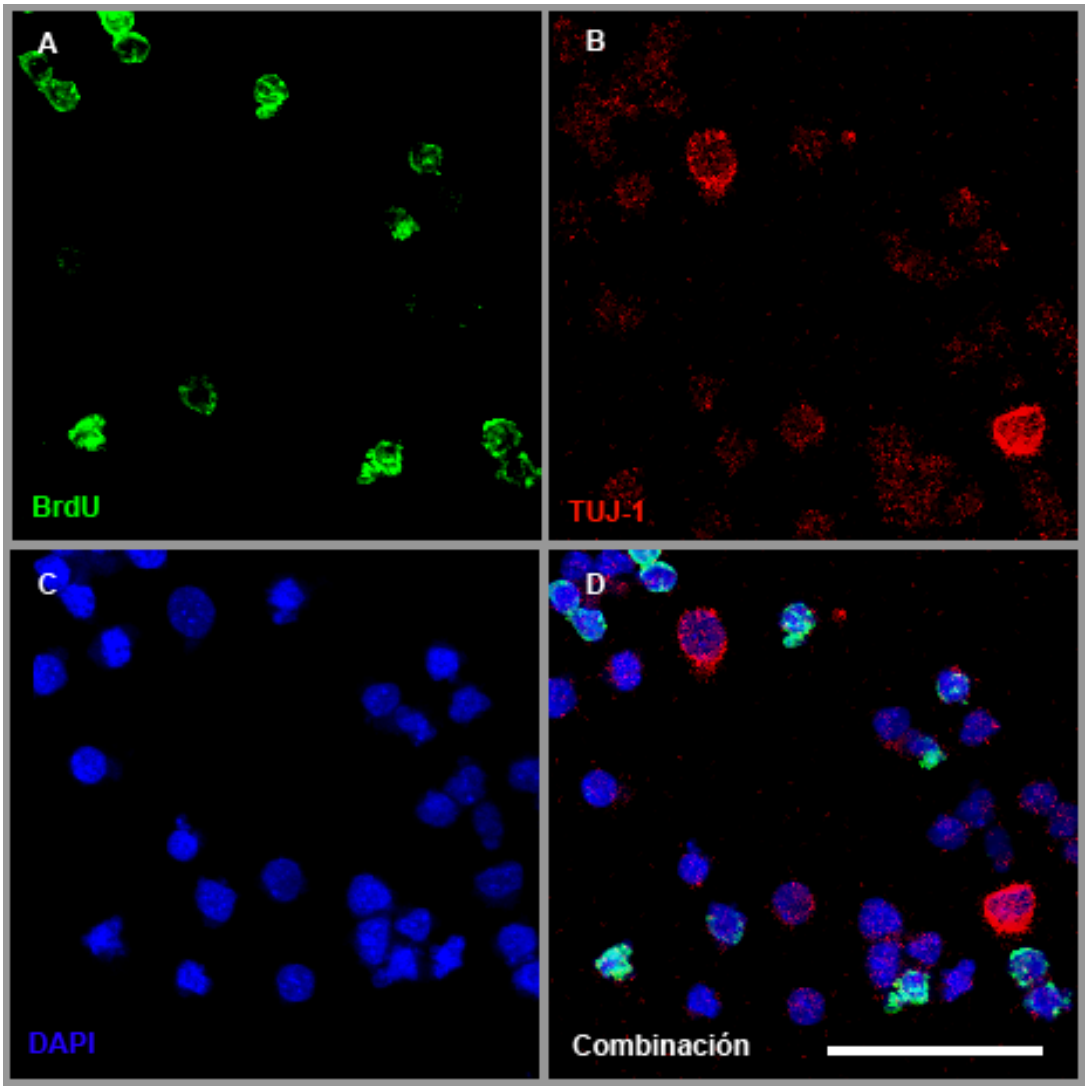


Figura 3.8. Proliferación y diferenciación en retinas disociadas. La imagen tomada mediante microscopia de fluorescencia muestra células de retina de E5 disociadas y citocentrifugadas sobre portaobjetos y después marcadas mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-BrdU (A) y con un anticuerpo anti-TUJ-1 (B). En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (C). La combinación de los tres tipos de marcaje se muestra en (D).
Barra = 45 μ.m.

3.9. Representación de las curvas de densidad de muerte, proliferación y diferenciación.

Las curvas de densidad de muerte, proliferación y diferenciación representan de una manera similar a como se hace en los mapas topográficos: áreas que comparten densidades celulares semejantes se colorean uniformemente. Su representación permitió comparar espacial y temporalmente la evolución de los procesos de MCP, proliferación y diferenciación que tienen lugar a lo largo del desarrollo embrionario de la retina en edades tempranas (estadios entre HH17 y HH23).

Se construyeron áreas de densidad de tres tipos: mapas de densidad de muerte a los que llamamos “isothanas”; mapas de densidad de diferenciación a los que llamamos “iso-islet” y mapas de densidad de proliferación denominados “Iso-pro”.

- **Mapas de densidad de MCP y diferenciación (Isothanas e Isoislet)**. Se montaron en plano retinas de estadios entre HH19 y HH23, directamente extraídas del embrión sin ningún tratamiento. Tras fijarlas en PFA 4% *(p/v)*, se realizaron los marcajes: a) TUNEL para visualizar y cuantificar la MCP, b) marcaje con un anticuerpo contra el factor de transcripción Islet 1/2, marcador temprano de neuronas. Las retinas marcadas fueron captadas con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan) con el objetivo de 40X. Se realizó un fotomontaje de las retinas completas con las imágenes obtenidas. Se cuantificó el número de núcleos picnóticos TUNEL-positivos/mm^2 y de núcleos Islet-positivos/mm^2. Los valores cuantificados se situaron sobre las imágenes de los perfiles correspondientes de las retinas. Las zonas con valores semejantes de núcleos positivos se unieron mediante líneas.

Estas líneas delimitaron áreas de incidencia de muerte celular que se identificaron mediante un escala colorimétrica. Para cada estadio embrionario se emplearon entre 6 y 9 retinas representando la media obtenida en cada estadio.

- **Mapas de densidad de proliferación o Isopro**. Se llevó a cabo un marcaje en ventana con BrdU de 6 horas de incubación en retinas izquierdas de embriones en estadios entre HH17 y HH21. Fueron fijadas en PFA 4% *(p/v)* y marcadas con un anticuerpo contra BrdU. Las retinas montadas en plano fueron captadas con el objetivo de 40X de un microscopio confocal de fluorescencia (LEICA DMRE2). Se hicieron fotomontajes de las retinas completas. Cada imagen obtenida con el microscopio fue a su vez dividida mediante una cuadrícula sobre la que se cuantificaron los núcleos proliferativos BrdU-positivos/mm^2. Los valores obtenidos se situaron sobre los moldes de las retinas. Tras la unión de valores semejantes con líneas, se estableció una escalar colorimétrica. Para cada estadio se emplearon 4 retinas, representando la media obtenida en cada uno de ellos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. El proceso de muerte celular programada en los estadios iniciales del desarrollo de la retina neural de pollo. Elaboración de los mapas de densidad de muerte o Isothanas.

El proceso de MCP que afecta a las poblaciones celulares de las distintas capas de la retina en estadios avanzados del desarrollo ha sido bien caracterizada y corresponde a los postulados de la *Teoría Neurotrófica*, especialmente la que afecta a las células ganglionares y a interneuronas. Sin embargo, la muerte celular que afecta a poblaciones celulares de la retina en estadios más tempranos está aún poco caracterizada (de la Rosa y de Pablo, 2000). Con el objeto de estudiar el proceso de MCP durante el desarrollo temprano de la retina y de identificar poblaciones celulares afectadas, decidimos estudiar mediante abordajes *in vivo*, la incidencia y la regulación de este proceso.

Utilizando la técnica TUNEL hemos estudiado la distribución espacio-temporal de la muerte en retinas montadas en plano de embriones de pollo entre los estadios HH17 a HH23. Dicha técnica, ya empleada en estudios previos (Frade *et al.,* 1997 y 1998; Cook *et al.,* 1998; Díaz *et al.,* 1999 y 2000) permite identificar y cuantificar fácilmente células con fenotipo apoptótico, aunque sean minoritarias en un tejido. Así pues, pudimos comprobar la presencia de núcleos TUNEL-positivos desde la edad más temprana analizada, HH17 (Fig.4.1 A) (52 horas de desarrollo embrionario), en la zona central de la copa óptica recién formada. La muerte en retina embrionaria de pollo ya estaba descrita desde el estadio HH14 (48 horas), previa a la invaginación de la copa óptica (Martín-Partido et al. 1988; Mayordomo *et al.,* 2003). Con los resultados obtenidos de nuestros marcajes se construyeron mapas de densidad de muerte que

denominamos isothanas (Fig.4.2), incluyendo estadios desde HH17 (correspondiente a E2.5), hasta HH23 (correspondiente a E3.5-E4). Mediante estos mapas pudimos hacernos una idea no sólo de la distribución del proceso, sino de su magnitud en etapas tempranas del desarrollo.

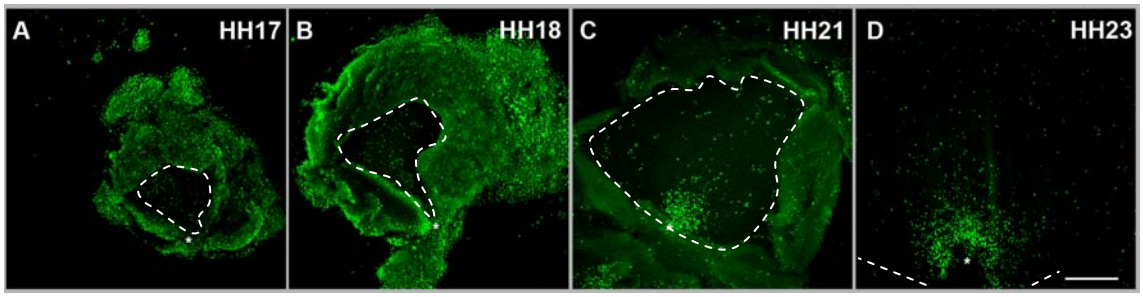


Figura 4.1. Muerte celular programada en retinas de estadios tempranos del desarrollo. Los paneles muestran ejemplos ilustrativos de la distribución de la muerte celular detectada mediante la técnica TUNEL en retinas aisladas y montadas en plano de estadios embrionarios tempranos. A partir del estadio HH20 la mayor densidad de células TUNEL-positivas se localiza en la zona ventral en torno a la salida del nervio óptico. El área punteada corresponde a la retina neural. El asterisco corresponde al área de salida del nervio óptico. Barra = 300 µm

Las isothanas (Fig. 4.2) mostraron un patrón específico de distribución de los núcleos picnóticos desde el centro hacia la periferia de la retina, encontrándose la mayor densidad en torno a la salida del nervio óptico en casi todos los estadios embrionarios analizados. Detectamos células muriendo desde el estadio HH17 con una localización dispersa de núcleos picnóticos (aproximadamente 29 núcleos TUNEL-positivos/mm^2). En retinas de HH19 (correspondiente a 68-72h), además de la muerte localizada en la región ventral de la retina, cerca de la salida del nervio óptico, encontramos una elevada densidad de núcleos marcados en la zona dorsal de la retina (unos 150 núcleos TUNEL-positivos/mm^2), aunque su densidad por unidad de área fue, en todos los casos, inferior a la densidad de la región ventral (entre 300-500 núcleos TUNEL-positivos/mm^2). El patrón espacial centro-periférico se confirmó en retinas de edades entre HH20 y HH23, en las que a medida que nos alejamos del nervio óptico hacia la periferia de la retina la densidad de muerte disminuyó de forma

progresiva. En retinas de HH22 encontramos un patrón de muerte algo diferente observando zonas con mucha menos muerte en las regiones dorso-nasal y dorso-temporal y ventro-nasal y ventro-temporal, cuyos valores oscilaron entre los 50 y 100 núcleos TUNEL-positivos/mm^2 frente a los 150 a 550 núcleos apoptóticos de las regiones circundantes. Sin embargo, en el resto de estadios tanto el patrón espacial como el temporal, se mostró más homogéneo en la distribución de densidades de muerte. Cuantificamos una mayor densidad de núcleos TUNEL-positivos en retinas de estadios más avanzados, encontrando el máximo en retinas de HH23. Los valores mas altos de densidad de muerte correspondían a la zona más cercana al nervio óptico para este estadio, y disminuyeron de forma progresiva a medida que nos acercamos a las zonas más periféricas de la retina de forma parecida a lo que ocurría en el resto de estadios estudiados.

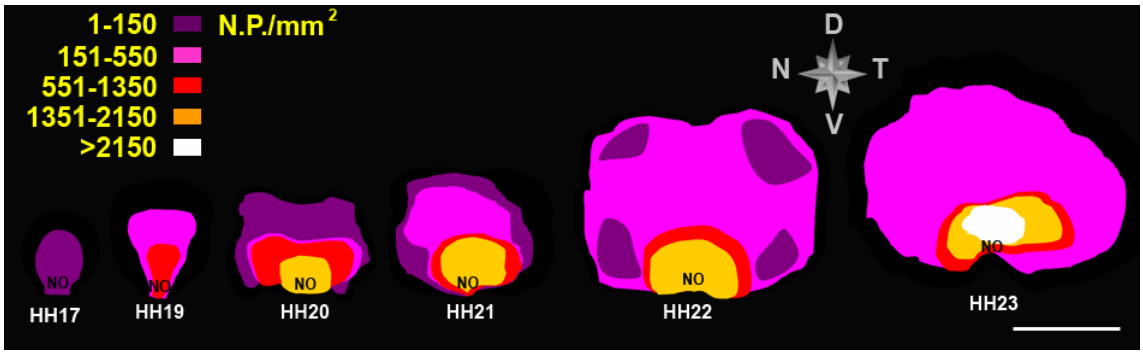


Figura 4.2. Distribución y densidad espacio-temporal de la muerte celular programada en estadios tempranos de la retina embrionaria de pollo (isothanas). A partir de de retinas montadas en plano marcadas con TUNEL, se construyeron mapas de densidad de muerte (isothanas), en los que quedan representados mediante una escala colorimétrica las áreas de mayor y menor densidad de núcleos picnóticos. Cada mapa de densidad de muerte representa la media de los núcleos picnóticos cuantificados en 4-6 retinas. Barra = 500 μm.

4.2. El proceso de proliferación celular en los estadios iniciales del desarrollo de la retina neural de pollo. Elaboración de los mapas de densidad de proliferación o Isopro.

El análisis de la densidad de la proliferación celular en la retina se llevó a cabo mediante una incorporación de 6 horas de BrdU en distintos estadios iniciales del desarrollo del embrión de pollo desde HH17 hasta HH21. El número de núcleos proliferando se puso de manifiesto mediante marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-BrdU (Fig.4.7 A).

En los mapas de densidad de proliferación, las zonas de mayor número de núcleos proliferando correspondieron a las regiones cercanas al centro de la copa óptica, de forma parecida a la progresión de las isothanas. Decidimos por ello denominar a estos mapas como Isopro. También desde el primer estadio analizado (HH17) las Isopro reflejaron la proliferación activa del neuroepitelio de la retina (Fig.4.3). El mayor número de núcleos proliferativos se concentró en etapas anteriores a la neurogénesis, entre HH18 (58 horas) y HH19 (72 horas) y fue disminuyendo a partir de HH19 (72 horas). De nuevo la distribución presentó un patrón espacial centro-periférico, pero además cuantificamos en todos los estadios una mayor densidad de células proliferando en la región temporal de la retina. La mayor densidad de células en fase S en torno a la salida del nervio óptico correspondió al estadio HH18 con valores superiores a las 17.000 células/mm^2. A partir de HH21, la proliferación disminuyó de forma drástica en toda la retina, especialmente en la región central, área correspondiente a las zonas de progresión de la diferenciación y la MCP, tal y como se puede apreciar en las Fig.4.7 B y C.

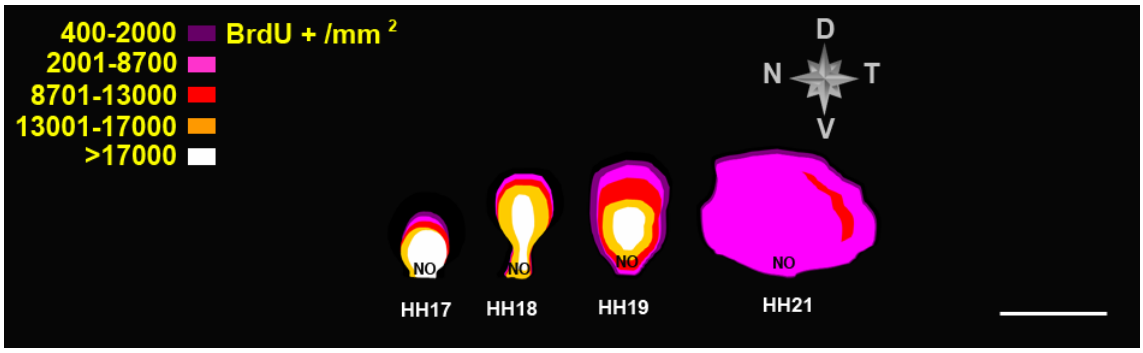


Figura 4.3. Distribución y densidad espacio-temporal de células proliferando en estadios tempranos de la retina embrionaria del pollo (Isopro). A partir de imágenes de retinas montadas en plano y marcadas con BrdU, se construyeron mapas de densidad de proliferación (Isopro), en los que quedan representados mediante una escala colorimétrica las densidades de células en proliferación. Cada mapa de densidad de muerte representa la media del número de núcleos BrdU positivos cuantificados en 3 retinas. Barra = 500 μm.

4.3. La diferenciación temprana en el desarrollo de la retina de pollo. Elaboración de los mapas de densidad de diferenciación o Isoislet.

Para realizar el análisis de la progresión de la diferenciación sobre las retinas montadas en plano, empleamos un anticuerpo contra el factor de transcripción Islet1/2 (Fig.4.4). Este anticuerpo ha sido empleado previamente como marcador de células ganglionares en pollo (Austin *et al.,* 1995) y presenta la ventaja de ser un marcador nuclear facilitando la cuantificación.

En cuanto a los procesos de diferenciación, las curvas de densidad Isoislet (Fig.4.5) mostraron un avance de diferenciación centro-periférico y un aumento progresivo de las células diferenciadas a lo largo del desarrollo. Las primeras neuronas diferenciadas se visualizaron en HH19 y su número en valores por densidad de área estaba en torno a las 130-150 células/mm^2. La diferenciación siguió una progresión dorsal-ventral y temporal-nasal que se puso de manifiesto especialmente en las retinas de estadios más jóvenes, entre HH19 y HH21.

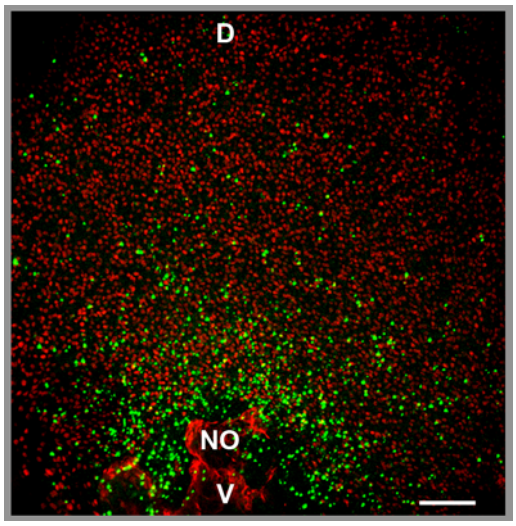


Figura 4.4. Marcaje TUNEL-Islet 1/2 en retina embrionaria de pollo de estadio HH23. La imagen, tomada mediante microscopia confocal muestra los procesos de diferenciación, visualizados con un anticuerpo anti-Islet, marcador nuclear de neuronas recién salidas de ciclo (rojo), y de MCP mediante TUNEL (verde). Ambos marcajes sirvieron de base para construir los mapas de densidad de diferenciación y muerte celular en retinas completas de diferentes estadios. NO, nervio óptico; V, ventral; D, dorsal. Barra = 80 μm.

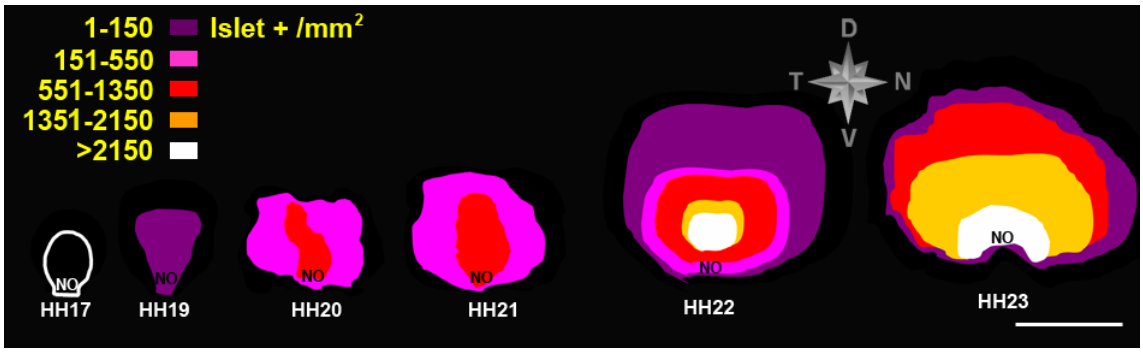


Figura 4.5. Distribución y densidad espacio-temporal de neuronas en estadios tempranos de la retina embrionaria del pollo (Isoislet). A partir de retinas montadas en plano marcadas con anti-Islet1/2, se construyeron mapas de densidad de diferenciación (Isoislet), en los que quedan representados mediante una escala colorimétrica las áreas de mayor y menor densidad de células diferenciadas. Cada mapa de densidad de muerte representa la media del número de núcleos Islet positivos cuantificados en 4-6 retinas. Barra = 500 μm

En retinas de HH22 y HH23 encontramos una mayor densidad de distribución de células diferenciadas en la región central (aproximadamente unos 3.000 núcleos Islet-positivos/mm^2). En HH23, además, el patrón espacial centro-periférico para las Isoislet fue muy similar al encontrado en las isothanas del mismo estadio. A pesar de esta correlación espacial centro-periférica, las densidades celulares de MCP y

diferenciación no fueron similares, siendo mucho mayor el número de núcleos TUNEL-positivos por área. Esta mayor densidad no sólo se apreció en las retinas de HH23 sino en todos los estadios embrionarios.

4.4. Caracterización de las poblaciones celulares afectadas por los procesos de muerte en el desarrollo temprano de la retina de pollo.

En los estadios más tempranos de desarrollo, la retina está formada por un neuroepitelio pseudoestratificado en la que los procesos de proliferación, muerte celular y diferenciación coexisten (Fig.4.6 A-C). Mediante marcaje específico es posible visualizar las células en proceso de proliferación, de muerte y de diferenciación neuronal en retinas montadas en plano de estadios tempranos del desarrollo de la retina: HH19 (Fig.4.6 A-B) y HH21 (Fig.4.6 C).

La comparación de los tres tipos de mapas de densidad nos permitió comprobar que la mayor densidad de células proliferando ocurría en estadios previos (entre HH17 y HH19) a aquellos en los que había un mayor número de células muriendo y diferenciándose (HH22 y HH23). Además, la observación de las isothanas e Isoislet de los estadios HH22 y HH23 mostró un solapamiento en la distribución de células muertas y diferenciadas, especialmente notable en HH23 (Fig. 4.2 y 4.5).

Quisimos comparar las curvas de muerte y diferenciación en los estadios estudiados. Para ello, asumiendo que el proceso de muerte transcurría en el periodo de aproximadamente 1 hora, calculamos también el incremento total de neuronas recién diferenciados en 1 hora para cada estadio.

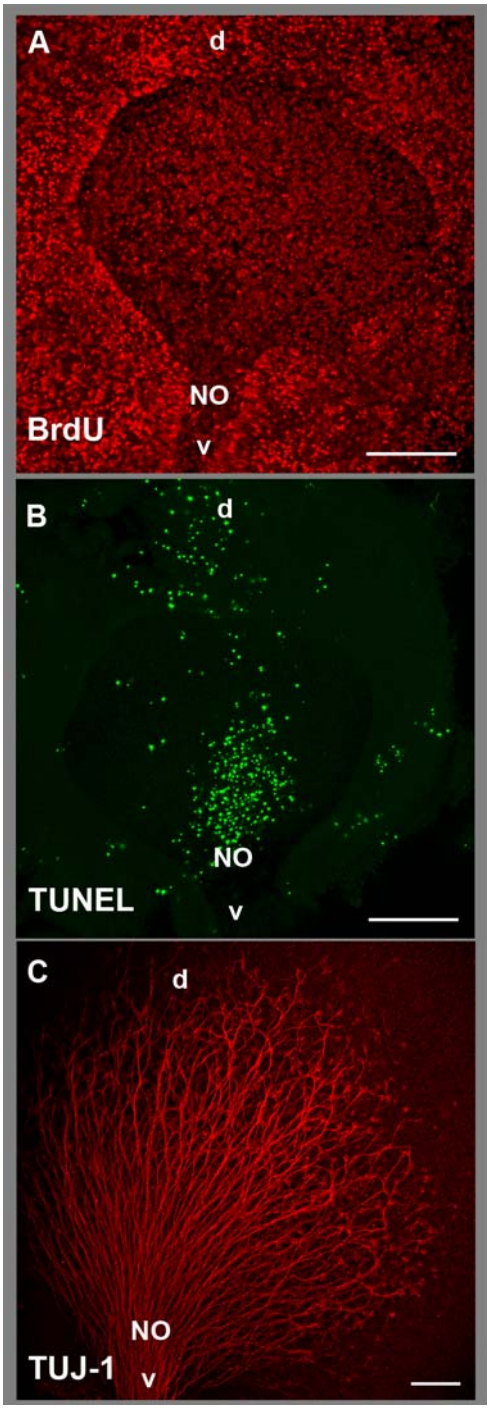


Figura 4.6. Proliferación, muerte celular programada y diferenciación en etapas tempranas del desarrollo de la retina embrionaria de pollo. Las imágenes tomadas mediante microscopia confocal muestran los procesos de: proliferación, medida como la incorporación de BrdU en una retina de estadio HH19 (A), apoptosis mediante la técnica TUNEL en una retina de HH19 (B) y diferenciación mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-TUJ-1, marcador de citoesqueleto neuronal en una retina de HH21 (C). d, dorsal; v, ventral; NO, nervio óptico; Barra 150 μm en A y B, 80 μm en C.

La cuantificación en retinas completas del número de células muriendo (TUNEL-positivas), diferenciadas (Islet-positivas) y proliferando (BrdU-positivas) por hora de incubación (Fig.4.7), nos permitió determinar la correlación temporal de los tres procesos. De esta forma comprobamos que la MCP (línea verde en Fig.4.7) y la neurogénesis (línea roja en Fig.4.7) eran procesos con perfiles de incidencia paralelos, mientras que la proliferación (línea azul en Fig.4.7), precedía a ambos en el desarrollo.

Nuestros resultados, por tanto, sugerían una correlación de la MCP con los procesos de neurogénesis, como también lo indicaban trabajos previos del grupo (Mayordomo *et al.,* 2003). Con esto en mente, nos planteamos estudiar qué poblaciones celulares se veían afectadas por los procesos de MCP en estadios de vesícula óptica y en estadios en los que las primeras fibras ópticas abandonan la retina neural.

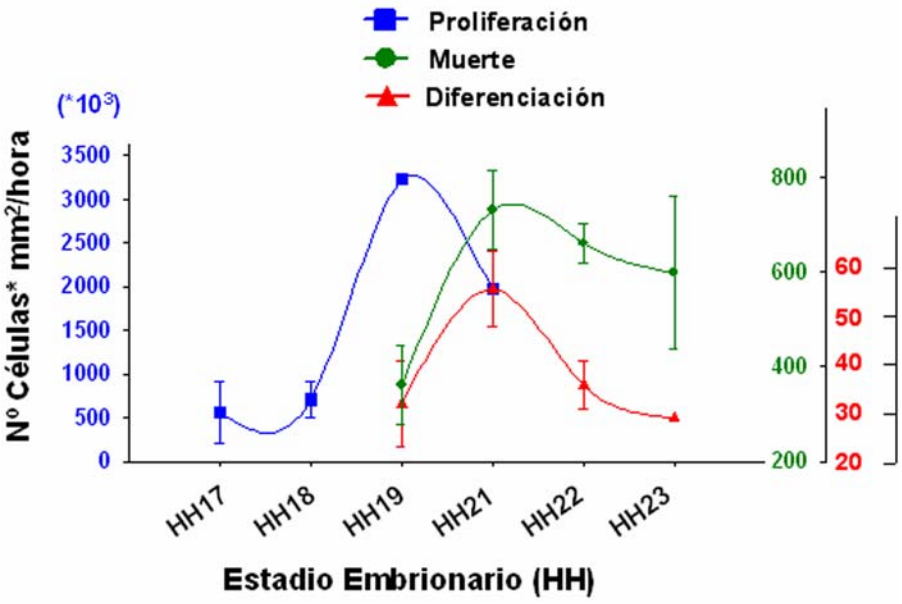


Figura 4.7. Curso temporal proliferación, muerte celular programada y la diferenciación en estadios tempranos del desarrollo de la retina embrionaria de pollo. Las gráficas representan la cuantificación del número de células BrdU positivas (cuadros azules), TUNEL-positivas (círculos verdes) y Islet-positivas (triángulos rojos) en retinas completas de embriones de estadios comprendidos entre HH17 y HH23. El número de células positivas para cada uno de los procesos se representa por área y por hora de incubación, adoptando una escala diferente en cada caso. Cada punto representa la media ± SD de 4 a 6 retinas.

4.4.1. La muerte celular programada afecta a una población de células proliferativas en retinas de HH19 y HH21.

Elegimos los estadios HH19 y HH21 para estudiar la progresión de los procesos de MCP que afectaban a las poblaciones de precursores proliferativos en estadios iniciales de la neurogénesis.

En HH19 ya se ha producido la invaginación de la vesícula óptica y se observa una elevada densidad de células TUNEL-positivas en las regiones ventral y dorsal de la retina, así como las primeras células ganglionares que se están diferenciando (véase isothanas e Isoislet de las Fig. 4.2 y 4.5 respectivamente). Quisimos caracterizar las células que, siendo proliferativas, estaban a su vez en proceso de muerte en el estadio HH19, ya que casi la totalidad de la retina está formada por un neuroepitelio proliferativo.

Para poder cuantificar los precursores proliferativos que estaban afectados por el proceso de muerte en un intervalo temporal, realizamos la técnica de marcaje en ventana de 1 hora con BrdU ya referida en material y métodos. Como control del método comprobamos que el exceso de timidina añadida cerraba la ventana adecuadamente y que, tanto ésta como la cantidad de BrdU añadida no inducían muerte. Para ello realizamos ensayos de marcaje en ventana con 3 y 6 horas de incubación tras el cierre de la ventana. En la Fig.4.8 A-B, se muestra el resultado de la cuantificación de la proliferación sobre secciones de retina central. Pudimos comprobar que tanto a 3 como a 6 horas, el número de células proliferando no presentaba diferencias significativas (Fig.4.8 B) y que, como era de esperar, la proliferación transcurría en la región ventricular del neuroepitelio mientras que los neuronas recién diferenciados se localizaban en la región vitreal, que es la capa más cercana al vítreo (Fig.4.8 A).

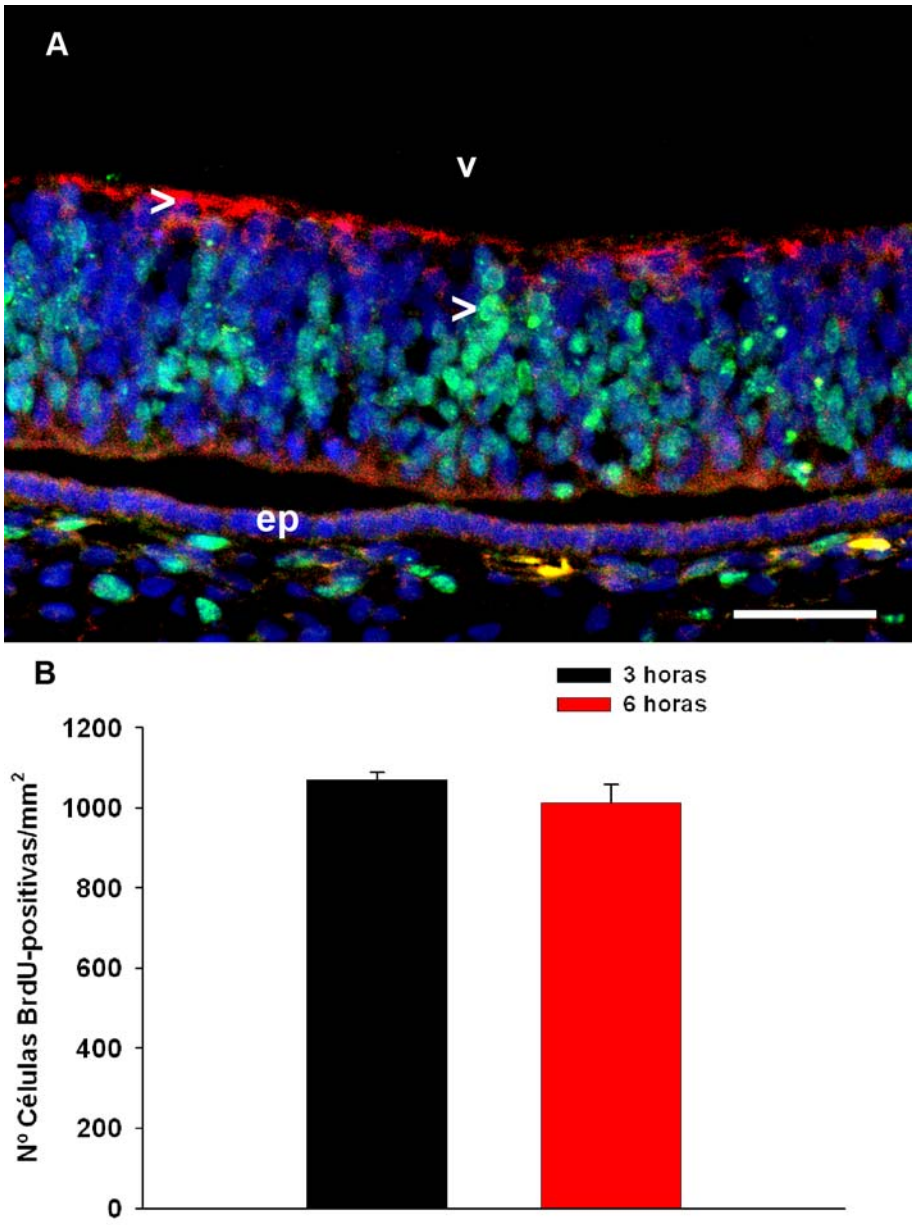


Figura 4.8. Marcaje en ventana en retina embrionaria de pollo de estadio HH21. La imagen en (A), tomada mediante microscopia confocal muestran los procesos de proliferación, medida como la incorporación de BrdU (núcleos verdes), y diferenciación, visualizada con un anticuerpo anti-TUJ-1, (somas en rojo). Los núcleos celulares se visualizan con el colorante DAPI. La gráfica en el panel B muestra los valores correspondientes al número de núcleos BrdU-positivos/mm^2 transcurridas 3 y 6 horas de incubación tras el marcaje en ventana. La cuantificación se llevó a cabo en tres secciones de retina central de dos embriones independientes para cada grupo o tratamiento. ep, epitelio pigmentario; v, vitreal. Barra = 40 μm.

Una vez comprobado que el método de la ventana se adecuaba a nuestro sistema, realizamos nuevos ensayos con incubaciones de 3 y 9 horas posteriores al marcaje con BrdU. En este caso se llevaron a cabo cuantificaciones en retinas completas montadas en plano de estadio final HH19. El número de núcleos TUNEL-positivos, núcleos proliferativos BrdU-positivos y núcleos doblemente marcados TUNEL-BrdU-positivos fueron cuantificados por unidad de área mediante el doble marcaje BrdU-TUNEL (Fig.4.9). A su vez fueron cuantificados y representados mediante mapas de isopros y de isothanas la distribución de las células proliferativas que estaban muriendo en la retina.

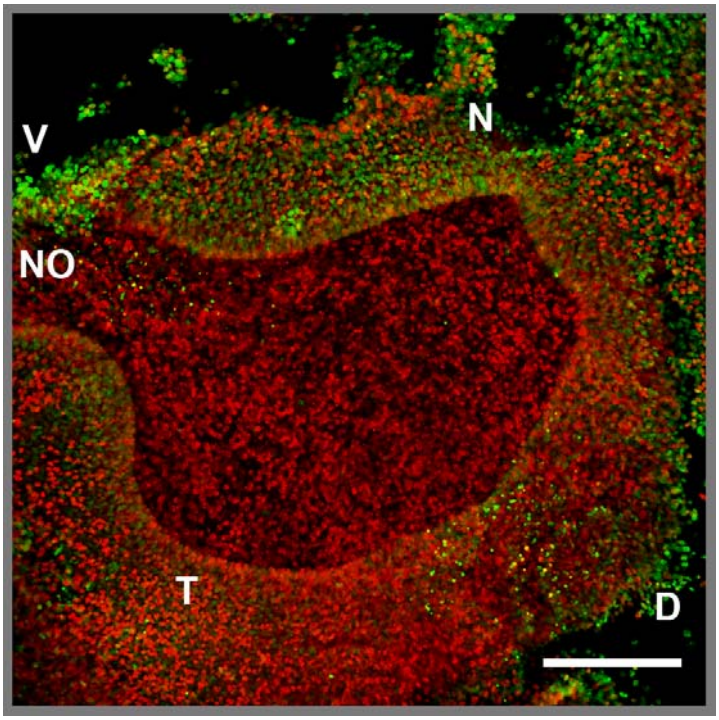


Figura 4.9. Marcaje TUNEL-BrdU en retina embrionaria de pollo de estadio HH19. La imagen, tomada mediante microscopia confocal, muestra las células BrdU-positivas (rojo) tras 9 horas de incubación posteriores a un marcaje en ventana. También se visualizan los núcleos apoptóticos mediante TUNEL (verde). El doble marcaje permitió cuantificar los núcleos BrdU-positivos, TUNEL-positivos y TUNEL-BrdU positivos, tanto en retinas de HH19 como de HH21. NO, nervio óptico; V, ventral; D, dorsal; N, nasal; T, temporal. Barra = 150 μm.

En la Fig.4.10 queda representado el patrón de distribución de células en proceso de muerte, de proliferación, y células proliferativas muriendo a las 3 y las 9 horas posteriores a la incorporación de BrdU. Tanto a 3 como a 9 horas, la distribución de núcleos TUNEL-positivos presentó de nuevo un patrón de muerte ventral, próximo a la salida del nervio óptico, y un patrón de muerte en la región dorsal de la retina. Ese mismo patrón es el que se observó en la distribución espacial de núcleos doblemente marcados TUNEL-BrdU positivos. El número de células proliferativas muriendo en la región ventral de la retina (en torno a los 200-250 núcleos TUNEL-BrdU-positivos/mm^2) fue mayor comparativamente con la región dorsal (130-150 TUNEL-BrdU-positivos/mm^2). Sin embargo, normalizando los núcleos doblemente marcados por la superficie del área de las regiones ventrales y dorsales de forma independiente, se observó que el porcentaje de núcleos TUNEL-BrdU positivos en la región dorsal con respecto al total de núcleos TUNEL-positivos de esa misma área fue significativamente mayor (53 ± 14 %) que el mismo porcentaje calculado en la región ventral (29 ± 4 %) tras 9 horas del cierre de la ventana. Así pues, encontramos una mayor proporción de células BrdU muriendo en la zona dorsal de la retina. El mismo cálculo realizado a las 3 horas del cierre de la ventana no mostró diferencias significativas.

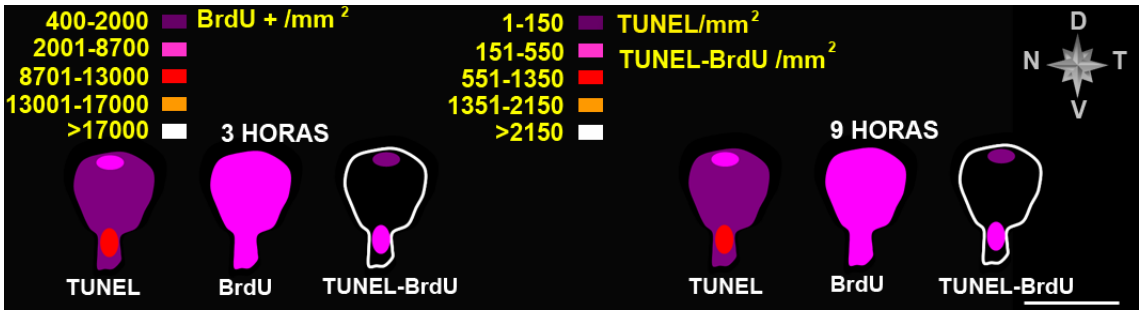


Figura 4.10. Distribución espacial del número de células proliferativas que mueren en retinas embrionarias de estadio HH19. La figura muestra los mapas de densidad de células en proceso de muerte (TUNEL), de proliferación (BrdU), y células proliferativas muriendo (TUNEL-BrdU) después de 3 y 9 horas de marcaje en ventana con BrdU. Lo más representativo es la distribución de núcleos TUNEL-BrdU positivos en las zonas ventral y dorsal de las retinas. No hubo cambios entre las 3 y 9 horas de incubación tras el marcaje. Cada mapa representa la media de 3 retinas izquierdas de embriones diferentes. Barra = 500 μm.

Teniendo en cuenta la superficie completa de la retina, el porcentaje total de núcleos doblemente marcados TUNEL-BrdU con respecto al total de células TUNEL-positivas por área para este estadio fue de 35 ± 8% a las 3 horas y de 32 ± 9% (Fig.4.11), no habiendo diferencias significativas entre ambas horas de incubación.

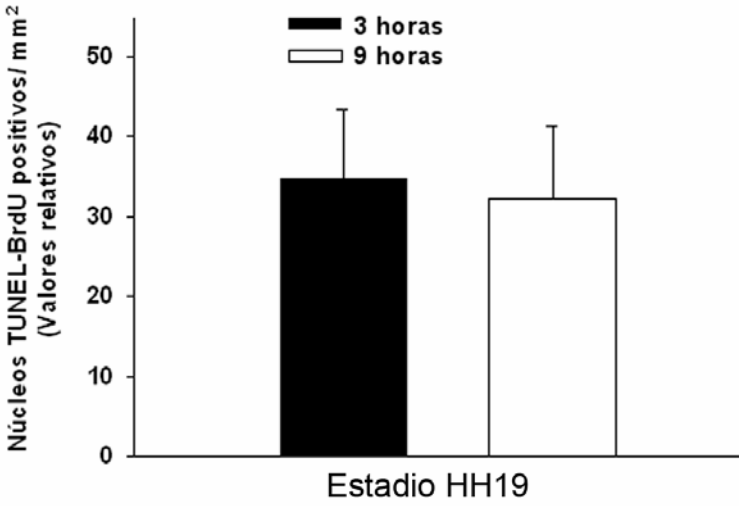


Figura 4.11. Cuantificación del porcentaje de núcleos proliferativos muriendo en retinas embrionarias de estadio HH19. La gráfica representa la cuantificación del número de núcleos picnóticos TUNEL-BrdU con respecto al total de núcleos TUNEL-positivos después de 3 y 9 horas de marcaje en ventana *in ovo* con BrdU. Cada bloque representa la media ± SD de 4 retinas izquierdas de embriones diferentes. No hubo diferencias significativas entre las 3 y las 9 horas de marcaje.

Por lo tanto, las retinas de HH19 presentaban una población de células proliferativas en proceso de muerte distribuidas en dos áreas concretas: en la región ventral, cerca de la salida del nervio óptico y en la región dorsal. Además teniendo en cuenta sólo la superficie de la retina correspondiente a la zona de muerte, la proporción de células proliferativas muriendo en la región dorsal resultó mayor que en la región ventral. En las retinas de HH21 se produce una disminución notable en el número de células proliferativas, a la vez que la neurogénesis progresa y se produce un incremento de la MCP (Fig. 4.7). Además, las primeras células ganglionares comienzan a proyectar sus axones a través de la fisura óptica (Fig. 4.12).

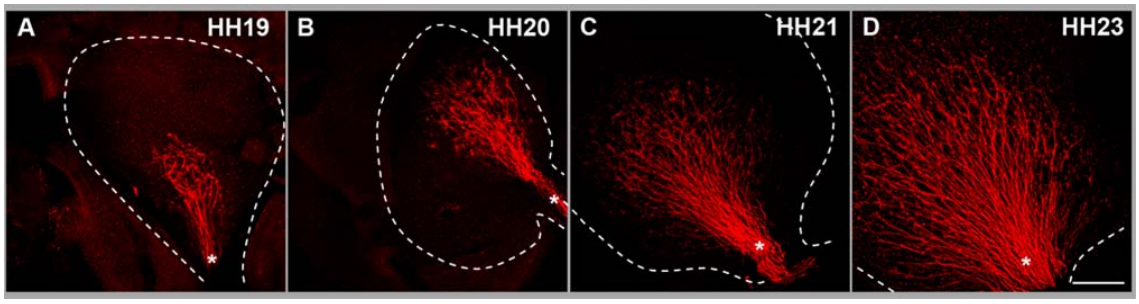


Figura 4.12. Proyección axonal de neuronas en retinas de estadios tempranos del desarrollo. Las imágenes tomadas mediante microscopia confocal muestran mediante el marcador TUJ-1 los axones de neuronas desde los estadios HH19 hasta HH23 (A-D). La proyección de los primeros axones a través de la fisura óptica comienza a partir de los estadios HH20+ y HH21 tal y como muestran los paneles en C y D. El asterisco señala la zona del nervio óptico. La línea punteada delimita el área correspondiente a retina neural.
Barra = 300 μm.

Quisimos caracterizar, al igual que en el estadio HH19, la magnitud y la distribución de las células proliferativas que se veían afectadas por el proceso de muerte. Para ello, de nuevo mediante marcaje en ventana con BrdU con 3 y 9 horas de incubación posteriores al cierre, cuantificamos y representamos el número de núcleos TUNEL-positivos, BrdU-positivos y doblemente marcados mediante mapas de densidad de muerte y proliferación. En la Fig.4.13, se muestran las isothanas e isopros a 3 y 9 horas. La distribución de la muerte siguió el patrón centro-periférico encontrado en retinas *in vivo* sin tratamiento (ver isothanas de la Fig. 4.2). A 3 horas localizamos una mayor densidad de núcleos TUNEL-positivos que a 9 horas en la zona de la salida del nervio óptico. Aunque las diferencias en la densidad de células muriendo no resultó ser significativa, es posible que este aumento de muerte se debiera a la manipulación de los embriones durante los ensayos. En cuanto al número de núcleos TUNEL-BrdU-positivos, hubo un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en la distribución de la densidad al cabo de 9 horas de incubación en la zona central próxima a la salida del nervio óptico

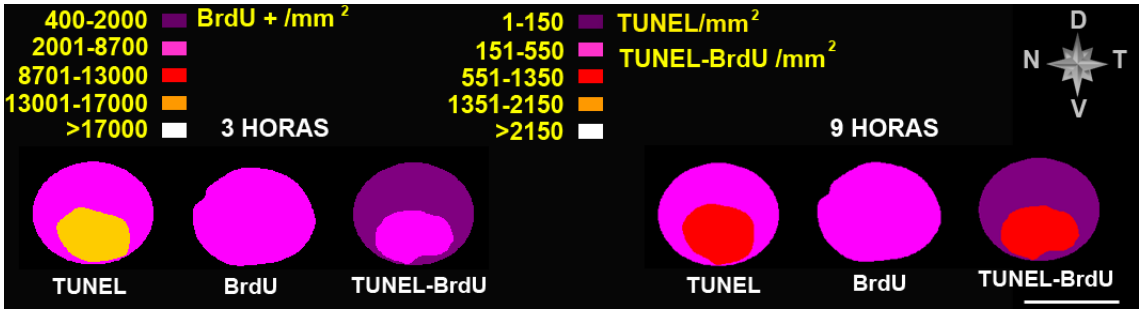


Figura 4.13. Distribución espacial del número de células proliferativas que mueren en retinas embrionarias de estadio HH21. La figura muestra los mapas de densidad de distribución de células en proceso de muerte (TUNEL), de proliferación (BrdU), y células proliferativas muriendo (TUNEL-BrdU) después de 3 y 9 horas de marcaje en ventana con BrdU. Tras 9 horas de incubación del marcaje en ventana, hubo un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de núcleos TUNEL-BrdU positivos en la zona central de la retina. Cada mapa representa la media de 3 retinas izquierdas de embriones diferentes. Barra = 500 μm.

Con los resultados de nuestras cuantificaciones representamos también la densidad de núcleos TUNEL-BrdU-positivos con respecto al total de núcleos TUNEL-positivos en retinas completas de HH21 (Fig. 4.14). En la gráfica podemos ver como el porcentaje de células proliferativas que mueren pasa de 16 ± 4 % a 3 horas a un 34 ± 1 % al cabo de 9 horas. Este aumento en el porcentaje de núcleos doblemente marcados resultó ser significativo ($p \leq 0,04$), coincidiendo además con la mayor densidad de núcleos TUNEL-BrdU-positivos en la zona cercana al nervio óptico de la retina (Fig. 4.13).

Comparando los números totales de núcleos TUNEL, BrdU y TUNEL-BrdU positivos normalizados por el área total de retinas de HH19 y HH21 (Tabla 4.1.) observamos como entre las 3 y 9 horas sólo hubo cambios significativos ($p \leq 0,03$) en el número de núcleos TUNEL-BrdU positivos/mm^2 en las retinas de HH21.

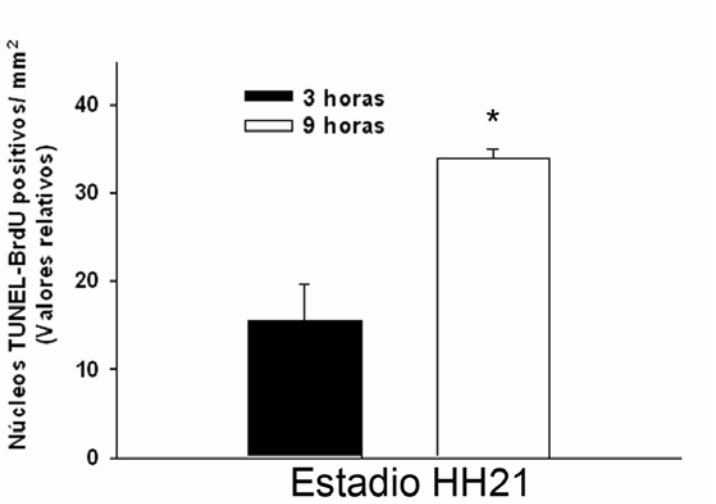


Figura 4.14. Cuantificación del porcentaje de núcleos BrdU-positivos en apoptosis en retinas embrionarias de estadio HH21. La gráfica representa la cuantificación del número de núcleos TUNEL-BrdU-positivos con respecto al total de núcleos TUNEL-positivos después de 3 y 9 horas de marcaje en ventana *in ovo* con BrdU. Cada bloque representa la media ± SD de 4 retinas izquierdas de embriones diferentes. El asterisco indica diferencias significativas para $p \leq 0,04$.

Tabla 4.1. Cuantificación de núcleos TUNEL-positivos, BrdU-positivos y BrdU-TUNEL-positivos por área en retinas completas de HH19 y HH21 después de 3 y 9 horas del cierre del marcaje en ventana.

Nº de núcleos positivos/mm^2		BrdU	TUNEL	BrdU-TUNEL
3 horas	HH19	3.356±622	684±73	238±21
	HH21	2.758±576	685±120	**(*)**102±9
9 horas	HH19	3.499±256	793±113	256±43
	HH21	3.361±231	691±34	**(*)**254±37

En HH21 por tanto, se produce un aumento significativo en la densidad de núcleos TUNEL-BrdU-positivos después de 9 horas de incubación tras el cierre de la ventana, lo que indica una acumulación de células muertas según se incrementa el tiempo después de una fase S (cuando se incorpora la BrdU). Este aumento de muerte se produce selectivamente en la zona central de la retina, en el área más próxima al nervio óptico, mostrando mejor correlación espacial con el proceso de diferenciación

que con el propio de proliferación, bastante uniformemente distribuido en toda la retina (Ver figuras 4.2., 4.3., y 4.5.).

4.4.2. La muerte celular programada afecta a una población de neuronas recién diferenciadas en retinas de HH21.

Los resultados anteriores demuestran que la MCP afecta a precursores proliferativos poco después de una fase S, tanto en retinas de HH19 como de HH21. No obstante, la acumulación de células TUNEL-positivas en HH21 ocurre según se distancian de fase S y en regiones de neurogénesis, según muestran también las gráficas de muerte y diferenciación de la Fig.4.8, con perfiles paralelos entre los estadios HH19 y HH21. Para estudiar una posible relación causal entre MCP y diferenciación, elegimos el estadio HH21 por corresponder en las gráficas de la Fig.4.8 al pico máximo de células muriendo y saliendo de ciclo por hora.

Para estudiar si la población de células diferenciadas estaba sometida al programa de muerte celular llevamos a cabo tres aproximaciones:

a) La detección y cuantificación de células diferenciadas que estuvieran muriendo (doblemente marcadas TUNEL-TUJ-1).
b) La detección y cuantificación de células que se acabaran de dividir, estuvieran recién diferenciadas y estuvieran muriendo (triples marcadas picnóticas-BrdU-TUJ-1-positivas).
c) La detección y la cuantificación de células que habiendo terminado su último ciclo de división se acabaran de diferenciar (doblemente marcadas TUJ-1-BrdU-positivas).

a) MCP de células diferenciadas (TUNEL-TUJ-1) en retinas montadas en plano.

Para abordar este punto llevamos a cabo el protocolo de doble inmunohistoquímica para detectar células muriendo mediante TUNEL y neuronas con el anticuerpo contra TUJ-1 (β-III tubulina). En la Fig.4.15 se observa una retina de HH21 con una distribución de la muerte en torno a la salida del nervio óptico y otra zona de núcleos picnóticos más periférica. Tras realizar barridos con el microscopio en toda el área diferenciada de la retina llegamos a la conclusión de que la búsqueda de células TUNEL-TUJ-1 positivas debía realizarse en áreas próximas al frente de diferenciación que correspondía, además, con la zona más periférica de núcleos picnóticos. Para visualizar las células dobles marcadas se realizaron series de 7-8 μm de espesor con cortes confocales de 1μm en la capa de somas de las células TUJ-1-positivas. De esta forma fue posible detectar el núcleo marcado y el soma de la célula diferenciada en el mismo plano confocal (Fig.4.16 A y B). Los valores de densidad obtenidos parecían mostrar una población muy pequeña de células diferenciadas muriendo (Tabla 4.2.).

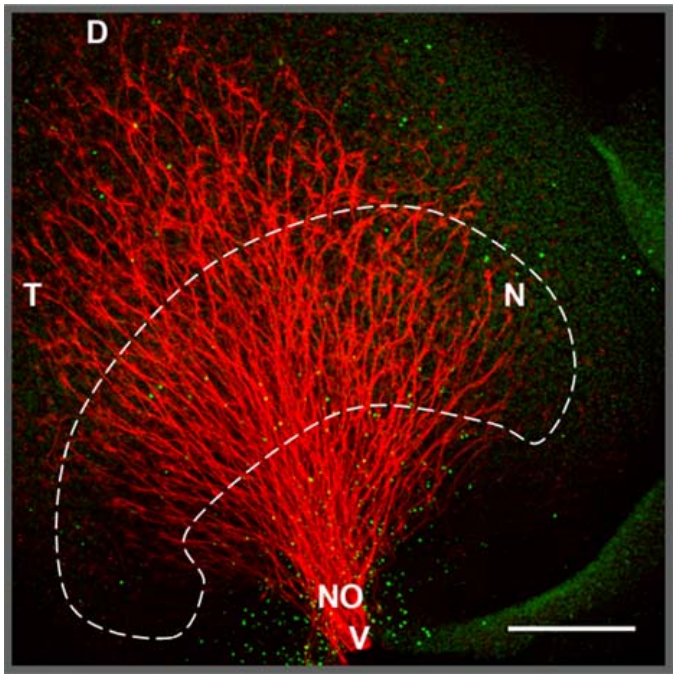


Figura 4.15 Marcaje TUNEL-TUJ-1 en retina embrionaria de pollo de estadio HH21. La imagen, tomada mediante microscopia confocal, muestra las neuronas ganglionares TUJ-1-positivas (rojo) proyectando sus axones hacia la salida del nervio óptico. También se visualizan los núcleos apoptóticos mediante TUNEL (verde). La mayor densidad de núcleos TUNEL-positivos coincide con la salida del NO. La línea punteada corresponde a la zona estudiada para buscar las células dobles marcadas TUNEL-TUJ-1-positivas. NO, nervio óptico; V, ventral; D, dorsal; N, nasal; T, temporal. Barra = 150 μm.

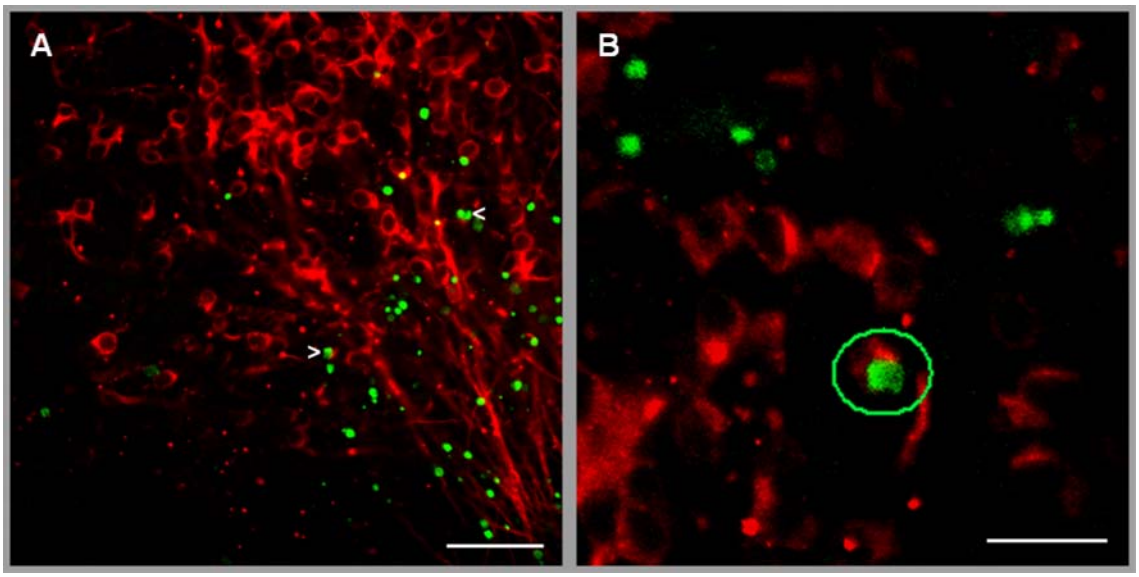


Figura 4.16. Marcaje TUNEL-TUJ-1 en retina embrionaria de pollo de estadio HH21. Las imágenes muestran series de 7 μm en A y 1 μm en B mediante microscopia confocal en las que se aprecian células doblemente marcadas con TUJ-1 (rojo) y TUNEL (verde). El campo en A corresponde al área ventro-temporal de una retina de HH21 tomada con el objetivo de 40X. La imagen en B pertenece a un campo de la región dorsal de la retina tomada con el objetivo de 63X. Barra 75 μm en A y 20 μm en B.

Tabla 4.2. Cuantificación de núcleos TUNEL-positivos, TUJ-1-positivos y TUNEL-TUJ-1-positivos por área en retinas completas de HH21 después de 3 y 9 horas del cierre del marcaje en ventana. Se emplearon para los contajes entre 4 y 5 retinas. .

Nº de núcleos positivos/mm^2		TUJ-1	TUNEL	TUJ-1-TUNEL
3 horas	HH21	2057 ± 9	1977 ± 282	0 ± 0
9 horas	HH21	2136 ± 335	1757 ± 150	62 ± 8

b) Cuantificación en secciones de retina de neuronas recién diferenciadas sufriendo procesos de MCP.

Como segunda aproximación nos planteamos tratar de cuantificar células que hubieran acabado su último ciclo de división, se hubieran diferenciado y entraran en el programa de muerte celular. Se realizaron marcajes con BrdU en ventana, con 3 y 6 horas de incubación posteriores a la ventana, para determinar la evolución de una población celular de estas características. Realizamos cuantificaciones de células triples marcadas (Fig.4.17), en secciones de retina de embriones de HH21 al ser técnicamente muy complicado dicho abordaje en retina montadas en plano. No se pudo observar un número estadísticamente significativo de células que acabaran de realizar su último ciclo de división celular, estuvieran recién diferenciadas y hubieran muerto. En la Fig.4.17 se muestra una sección de retina de HH21 en la que el asterisco señala una célula apoptótica, recién diferenciada y que acaba de realizar su último ciclo de división. La cuantificación se realizó sobre secciones seriadas del área diferenciada de la retina. En ningún caso obtuvimos diferencias significativas entre el número de células BrdU/TUJ-1/DAPI positivas entre 3 y 6 horas, obteniendo valores de densidad de 2 a 6 células/mm^2 pero con enormes desviaciones debido a que en muchas secciones no lográbamos encontrar ninguna célula triple marcada. Cuantificamos el número de células BrdU-DAPI, TUJ-1-DAPI y dobles marcadas TUJ-1-BrdU así como los valores de las densidades de células apoptóticas, diferenciadas y

proliferativas en las secciones de retinas. En la Tabla 4.3 se muestran los valores de dichas cuantificaciones por densidad de área. Las tendencias más claras muestran un aumento en el número de núcleos BrdU-Apoptóticos, tal y como habíamos visto en plano entre 3 y 9 horas, así como una disminución en el número de células doblemente marcadas BrdU-TUJ-1-positivas.

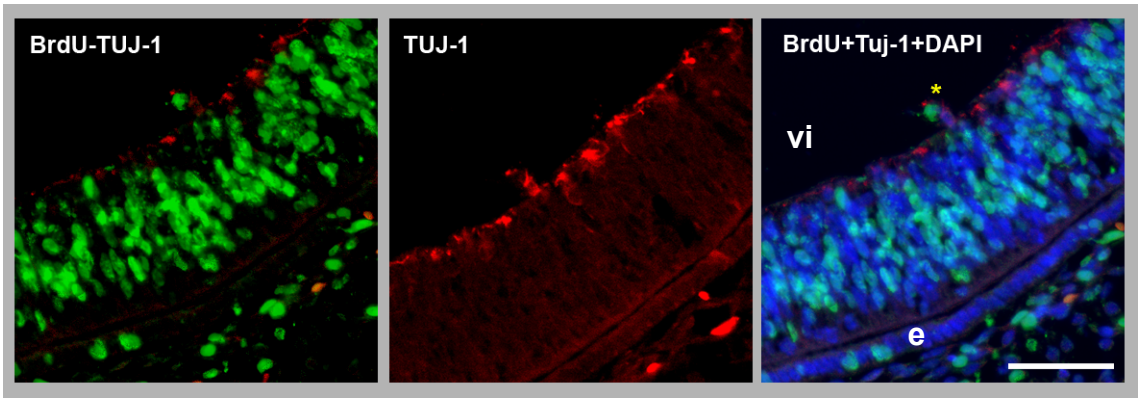


Figura 4.17. Proliferación, diferenciación y apoptosis en sección de retina embrionaria de HH21. El panel corresponde a la imagen confocal de una sección de retina teñida contra el marcador de proliferación BrdU (verde), el marcador citoplasmático de neuronas TUJ-1 (rojo) y el marcador nuclear de DNA, DAPI (azul). El asterisco señala una célula apoptótica, que ha terminado su último ciclo de división y se ha diferenciado. vi, vitreal; e, epitelio pigmentario. Barra = 75 μm.

Este dato, aunque no fue significativo, nos indicó la tendencia a desaparecer de una población muy pequeña de células que durante el periodo de marcaje de la ventana estaban terminando su último ciclo de división, se diferenciaron en el transcurso de la incubación, y entraron en apoptosis. Como la aproximación de cuantificar en secciones de retina no había resultado significativa decidimos abordar el mismo procedimiento pero cuantificando retinas montadas en plano con 3 y 9 horas de incubación después del marcaje en ventana.

Tabla 4.3. Cuantificación de núcleos apoptóticos, BrdU-positivos, TUJ-1-positivos y doblemente marcados (apoptóticos-BrdU positivos, apoptóticos-TUJ-1-positivos y BrdU-TUJ-1-positivos) por área en secciones de retinas de HH21. Transcurrieron 3 y 6 horas de incubación tras cierre del marcaje en ventana con BrdU. Se emplearon para las cuantificaciones entre 3 y 4 retinas de embriones diferentes para cada grupo. Las cuantificaciones son el resultado de 3 a 5 secciones por retina.

Nº de núcleos positivos/mm^2		Apoptóticas	BrdU	TUJ-1	Apop. BrdU	Apop. TUJ-1	BrdU-TUJ-1
3 horas	HH21	67 ± 5	1069 ± 19	325 ± 58	13 ± 9	4 ± 1	61 ± 7
6 horas	HH21	174 ± 25	1013 ± 46	310 ± 30	16 ± 5	5 ± 1	15 ± 4

c) *Cuantificación en retinas montadas en plano de células que habiendo terminado su último ciclo de división se acabaran de diferenciar.*

Como tercera aproximación, tratamos de cuantificar cambios en el número de células proliferativas recién salidas de ciclo a lo largo del periodo de incubación. La idea era comparar el número de neuronas recién salidas de ciclo después de 3 y 9 horas de incubación tras del marcaje en ventana. Una disminución o un aumento del número de células doblemente marcadas (BrdU- y TUJ-1-positivas) en un mismo estadio embrionario podría dar una idea de la incidencia del proceso de muerte en la neurogénesis. Decidimos realizar los marcajes sobre retinas montadas en plano para poder visualizar un mayor número de células en cada experimento y obtener valores estadísticamente fiables. Por el contrario, el triple marcaje empleado en el apartado anterior fue técnicamente muy complicado en este sistema. Las cuantificaciones se realizaron sobre series de 7-8 μm de espesor abarcando el soma de las neuronas, con cortes cada 1-1,5 μm, para asegurarnos de nuevo que los dos marcajes estuvieran en el mismo plano. En la Fig.4.18 se muestran imágenes del doble marcaje BrdU (verde) y TUJ-1 (rojo), en una retina completa de HH21. Con estas imágenes se pudo apreciar claramente una disminución del marcaje de núcleos proliferativos en la zona donde la

retina estaba diferenciada. En esta imagen, la proyección de los axones no se aprecia en su totalidad ya que la serie fue tomada para distinguir únicamente los somas de las neuronas (Fig.4.18 A-C).

Las cuantificaciones se hicieron con el objetivo de 63X (Fig.4.18 D) en diferentes áreas de la retina. Así, cuantificamos el número de células dobles marcadas en las regiones dorsal, ventral, temporal y nasal tomando entre 3 y 4 imágenes por cada retina estudiada. Normalmente, las células dobles marcadas se encontraban en grupos de dos y hasta tres células muy próximas entre ellas. (Fig.4.19 A-C). La mayor densidad de células dobles marcadas se localizó en las regiones dorso-temporal (Fig.4.20) y ventro-temporal de la retina para este estadio. La cuantificación de las células BrdU-positivas, TUJ-1-positivas y células doblemente marcadas BrdU-TUJ-1 positivas se resume en la Tabla 4.4. No hubo cambios significativos en la densidad de células BrdU-positivas y TUJ-1-positivas entre las 3 y 9 horas de incubación. Sin embargo, si hubo una disminución significativa ($p \leq 0,049$) en el número de células dobles marcadas BrdU-TUJ-1-positivas. Esta disminución nos indicó que, transcurridas 9 horas desde que incorporaron BrdU durante marcaje, los precursores neurales terminaron su última división mitótica, se diferenciaron y, posiblemente, entraron en un proceso de muerte celular.

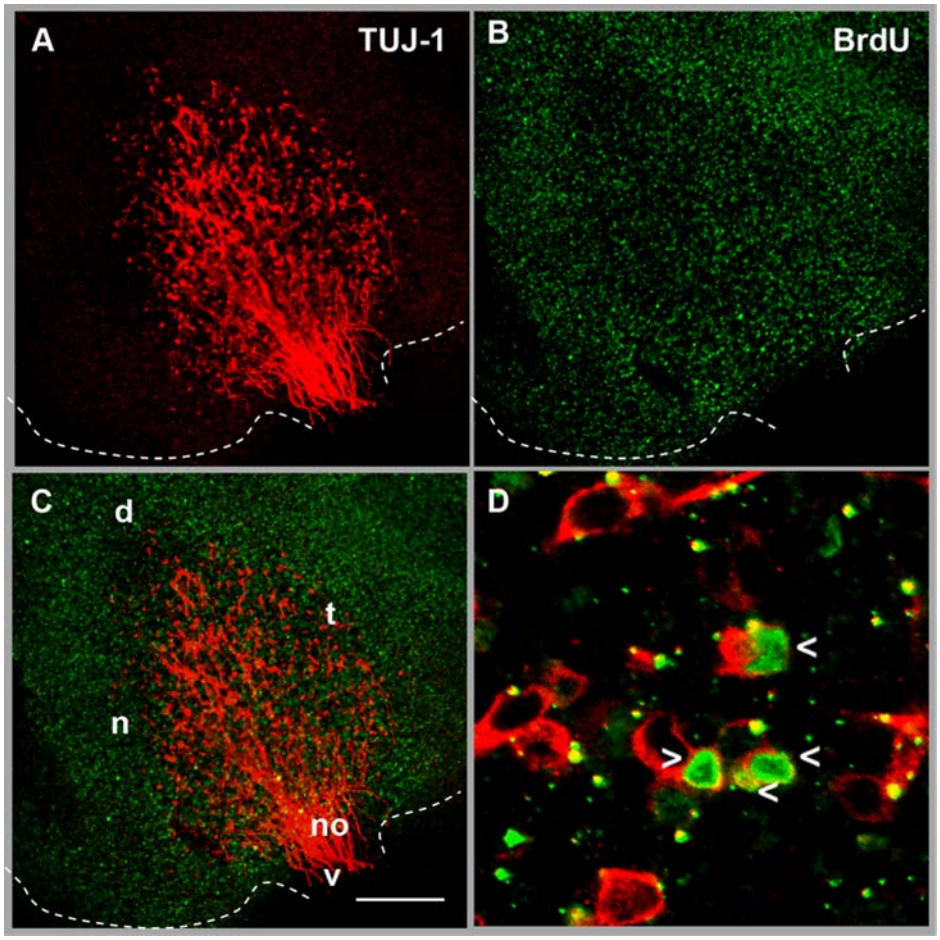


Figura 4.18. Doble marcaje TUJ-1/BrdU en retinas montadas en plano de HH21. Imágenes tomadas mediante microscopia confocal de los marcadores de neuronas TUJ-1 (A) y proliferación contra BrdU (B) y la colocalización de ambas proyecciones (C), tras un marcaje en ventana de 9 horas de incubación. Para determinar el número de neuronas recién salidas de ciclo (TUJ-1/BrdU positivas) se tomaron series confocales correspondientes a los somas de las células TUJ-1 con el objetivo de 63X (D). Así, se identificaron como dobles marcadas sólo aquellas células TUJ-1 positivas que además presentaran un núcleo BrdU positivo (D).
d, dorsal; v, ventral; n, nasal; t, temporal; no, nervio óptico. Barra 150 μm en A-C y 5 μm en D.

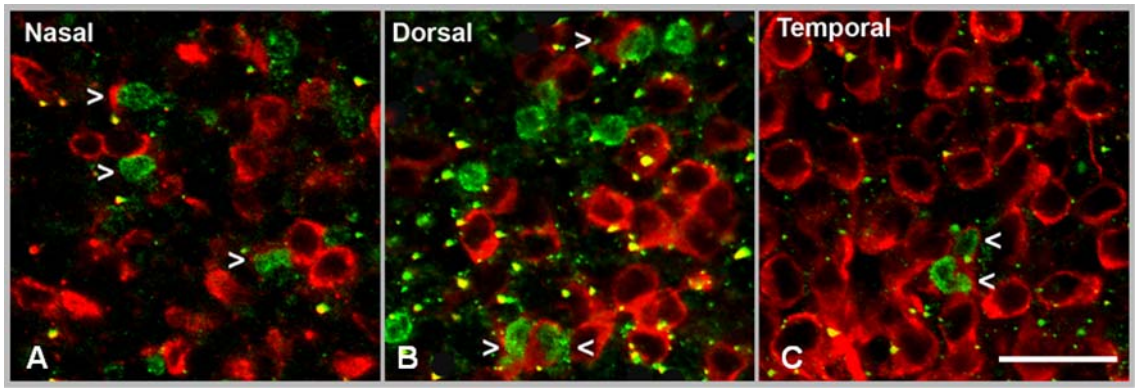


Figura 4.19. Doble marcaje TUJ-1/BrdU en áreas de retina nasal, dorsal y temporal de HH21. La figura muestra campos representativos del área nasal (A), dorsal (B) y temporal (C) de la retina montada en plano tras un marcaje en ventana de 3 horas. Las células están marcadas para TUJ-1 (rojo) y BrdU (verde). Las flechas señalan células doblemente marcadas TUJ-1-BrdU positivas que se encuentran en el mismo plano confocal con el objetivo de 63X. Barra = 10 μm.

El primer objetivo planteado dentro del proyecto de tesis era la caracterización de la incidencia de la MCP y de las poblaciones afectadas por este proceso durante el desarrollo temprano de la retina embrionaria de pollo. Nuestros resultados indican que en estadios tempranos del desarrollo existe una población de precursores neuronales afectados por el proceso de muerte celular. Todos los experimentos fueron realizados con embriones de pollo *in vivo* en consideración a que, a pesar de la dificultad de las manipulaciones, nuestros resultados se aproximaban a las condiciones fisiológicas del sistema.

Conociendo la magnitud del proceso y las poblaciones afectadas, nuestro siguiente objetivo iba a ser la caracterización de los posibles mecanismos de regulación de la MCP y la supervivencia de dichas poblaciones.

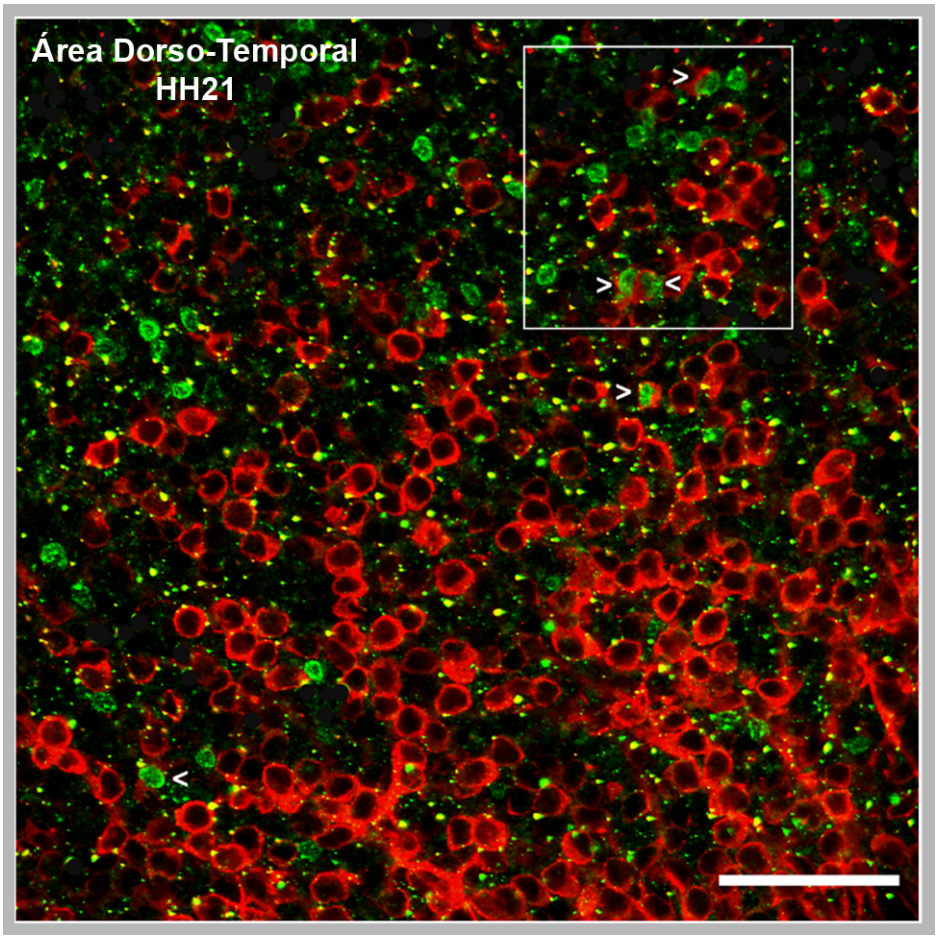


Figura 4.20. Doble marcaje TUJ-1/BrdU en el área dorso temporal de la retina de HH21. La figura muestra un campo representativo de la zona dorsal retina montada en plano tras un marcaje en ventana de 3 horas. Las células están marcadas para TUJ-1 (rojo) y BrdU (verde). Las flechas señalan células doblemente marcadas TUJ-1-BrdU positivas que se encuentran en el mismo plano confocal con el objetivo de 63X. Barra = 20 μm.

Tabla 4.4. Cuantificación de núcleos BrdU-positivos, TUJ-1-positivos y doblemente marcados BrdU-TUJ-1-positivos por área en retinas de HH21 después de 3 y 9 horas del cierre del marcaje en ventana. Se emplearon para las cuantificaciones entre 3 y 4 retinas de embriones diferentes para cada grupo. Las cuantificaciones son el resultado de las proyecciones de una serie de 7-8 µm con cortes cada 1-1,5 µm. El asterisco representa diferencias significativas entre las 3 y las 9 horas posteriores al marcaje en ventana ($p \leq 0{,}049$).

Nº de núcleos positivos/mm^2		BrdU	TUJ-1	BrdU-TUJ-1
3 horas	HH21	639±332	1907±334	62±13
9 horas	HH21	1384±523	1397±125	(*) 34±9

4.5. Mecanismos de señalización de la muerte celular programada en una línea celular inmortalizada de retina de codorniz (RTC5).

Como segundo objetivo dentro del proyecto de Tesis nos planteamos caracterizar posibles mecanismos de regulación de la MCP y la supervivencia de las poblaciones neurales durante el desarrollo temprano de la retina. No obstante, estudiar las vías de regulación de la MCP asociada a las poblaciones de precursores proliferativos y neuronales en un sistema *in vivo* de nuestras características entrañaba varias complicaciones metodológicas derivadas de la heterogeneidad del tejido y la coexistencia de procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Por tanto decidimos abordar el estudio de las vías de señalización y regulación de la MCP asociada a la neurogénesis *in vitro,* empleando como sistema la línea celular RTC5 obtenida a partir de un cultivo primario de retina temporal embrionaria de codorniz de E3,5 (Elisabeth Pollerberg; Max Planck-Institute for Developmental Biology, Tübingen, Alemania). La línea, inmortalizada por transfección del gen viral v-myc fusionado al dominio de unión al receptor de estrógeno (ER), permite la regulación de la actividad inductora de proliferación de myc con β-estradiol (Pollerberg *et al.,* 1995). Además, la línea es positiva para el marcador neuroepitelial vimentina, lo que sugiere su naturaleza de precursor neuroepitelial. Las células RTC5 podían, además, inducirse a diferenciación neuronal con la adición de FGF-2 (20 ng/mL) y las células diferenciadas presentaban marcadores de células ganglionares (Pollerberg *et al.,* 1995). La línea presentó también la ventaja de producir de forma autocrina proinsulina (resultados de Catalina Hernández-Sánchez), por lo que era probable que presentara receptores para insulina y para los factores relacionados con la familia, de forma similar a la retina embrionaria de pollo (Díaz *et al.,* 1999 y 2000). Esto nos permitiría realizar

experimentos de señalización con insulina y factores de la familia como proinsulina e IGF-I.

4.5.1. Cambios en la susceptibilidad a muerte en condiciones de proliferación y diferenciación.

La línea RTC5 podría ser, por tanto, un sistema *in vitro* adecuado para llevar a cabo experimentos de señalización celular por múltiples razones. Era un sistema obtenido a partir de un cultivo primario inmortalizado de retina embrionaria en una fase de neurogénesis temprana. Era posible inducir su diferenciación de forma exógena con FGF-2. Por último, si la insulina y otros factores de la familia eran capaces de inducir supervivencia (tal y como ocurría en retina embrionaria de pollo), contábamos con una herramienta adecuada para estudiar las vías de señalización de MCP y supervivencia. En primer lugar buscamos cómo establecer dos protocolos diferentes que enriquecieran, por una parte, la población de precursores proliferativos y, por otra parte, la población de neuronas recién salidas de ciclo. Esto nos permitiría estudiar por separado y de manera controlada los mecanismos de señalización de MCP y supervivencia de una población celular en proliferación y otra en diferenciación.

La línea celular RTC5 fue mantenida en un medio de cultivo MS10 (3.6.1) con β-estradiol, 0,5 μg/mL de laminina y una mezcla de 2% (v/v) de suero de pollo y 8% (v/v) suero fetal bovino. La adición de β-estradiol era necesaria para mantener el cultivo en fase crecimiento. Adicionalmente establecimos dos protocolos diferentes para aumentar la población de precursores proliferativos y la población de células ganglionares de la línea RTC5 (3.6.2). El primero, llamado protocolo de proliferación, consistió en mantener las células creciendo en el medio MS10 durante 72 horas. El segundo, llamado protocolo de diferenciación consistió en el crecimiento inicial de la línea en medio MS10 durante 48 horas, periodo tras el cual el medio MS10 era renovado y se inducía diferenciación con FGF-2 20ng/mL durante 24 horas.

4.5.1.1. La insulina ejerce un papel antiapoptótico en la línea RTC5 en condiciones de proliferación.

Como primera aproximación, quisimos comprobar si el sistema *in vitro* era capaz de responder a la insulina de pollo. Estudios previos en el laboratorio habían demostrado que, tanto *in vivo* como en cultivos organotípicos de retinas embrionarias, la insulina ejercía un papel en la supervivencia y la proliferación celular (Díaz *et al.,* 1999 y 2000). Para corroborar estos datos en la línea RTC5, cultivamos las células durante 72 horas bajo condiciones de proliferación en un medio con suero (MS10), seguidas de 6 horas en un medio definido (MN2), en presencia de insulina de pollo 100nM y añadiendo BrdU 5μM durante la última hora de incubación (Fig.4.21 A).

Tras el cultivo, las células fueron procesadas para la cuantificación del número de células TUNEL-positivas y BrdU-positivas. En el caso de las células sometidas al protocolo de proliferación, la insulina ejerció un papel antiapoptótico reduciendo los valores de muerte un 50% (de 10 ± 0,6 % a 5 ± 0,7 %) y de manera significativa ($p \leq 0,004$) con respecto al control (Fig.4.21 B).

En cuanto a los valores de proliferación, no hubo cambios significativos en los porcentajes de células BrdU-positivas en presencia de insulina (25 ± 8 % frente 30 ± 4 % en el control). El mismo análisis cuantitativo realizado sobre las células cultivadas con el protocolo de diferenciación (Fig.4.22 A y B), mostró que la presencia de insulina no disminuía los niveles de apoptosis con respecto al tratamiento control de forma significativa, siendo los porcentajes en ambos casos muy bajos (0,6 ± 0,04 % de apoptosis en el control frente a un 0,2 ± 0,02 % en el tratamiento con insulina).

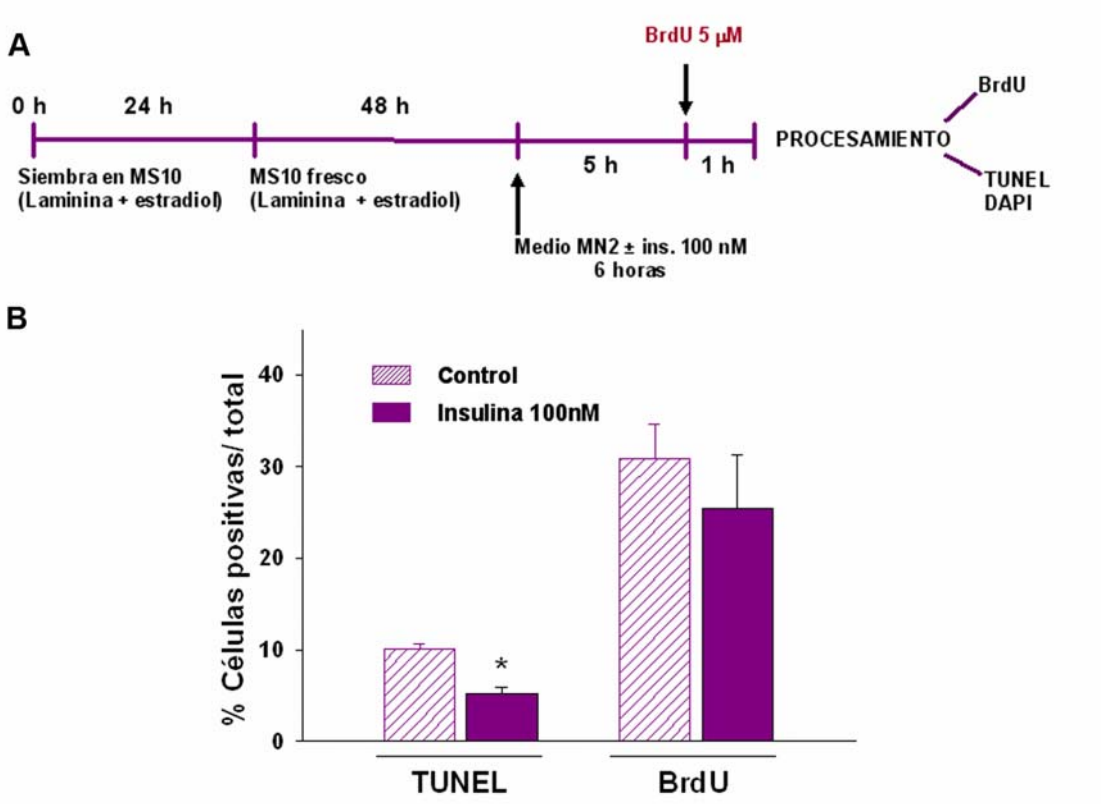


Fig.4.21. Cuantificación de la MCP y la proliferación sobre la línea RTC5 creciendo bajo el protocolo de proliferación. Las células se sembraron y se mantuvieron durante 72 horas en medio MS10 con suero, laminina y estradiol. Se trataron con o sin insulina100 nM en un medio definido MN2 sin suero durante 6 horas, añadiendo BrdU 1 hora antes de terminar el tratamiento con insulina (A). Las células se procesaron para cuantificar los porcentajes de MCP, representados como el % de células TUNEL-positivas, y los porcentajes de proliferación, representados como % de células BrdU-positivas, tanto en ausencia (control) como en presencia de insulina 100nM (B). La gráfica es el resultado de tres experimentos independientes empleando para cada grupo experimental cuatro pocillos de una cámara portaobjetos de 8 pocillos. Los valores son el resultado de la media ± ESM. El asterisco señala una diferencia significativa con respecto al control p≤0,004.

No obstante, el tratamiento con FGF-2 en el cultivo, redujo de forma muy significativa los niveles basales de muerte con respecto al cultivo en condiciones de proliferación (los porcentajes bajan de un 10 % a un 0,6 % de apoptosis). En cuanto a la cuantificación del número de células BrdU positivas, la presencia de insulina en condiciones de diferenciación no aumentó de forma significativa la proliferación con respecto a la condición control. Sin embargo, la adición de FGF-2 en el cultivo

aumentó los niveles basales de proliferación de forma significativa ($p \leq 0,004$) cuando lo comparábamos con el protocolo de proliferación (Fig.4.23).

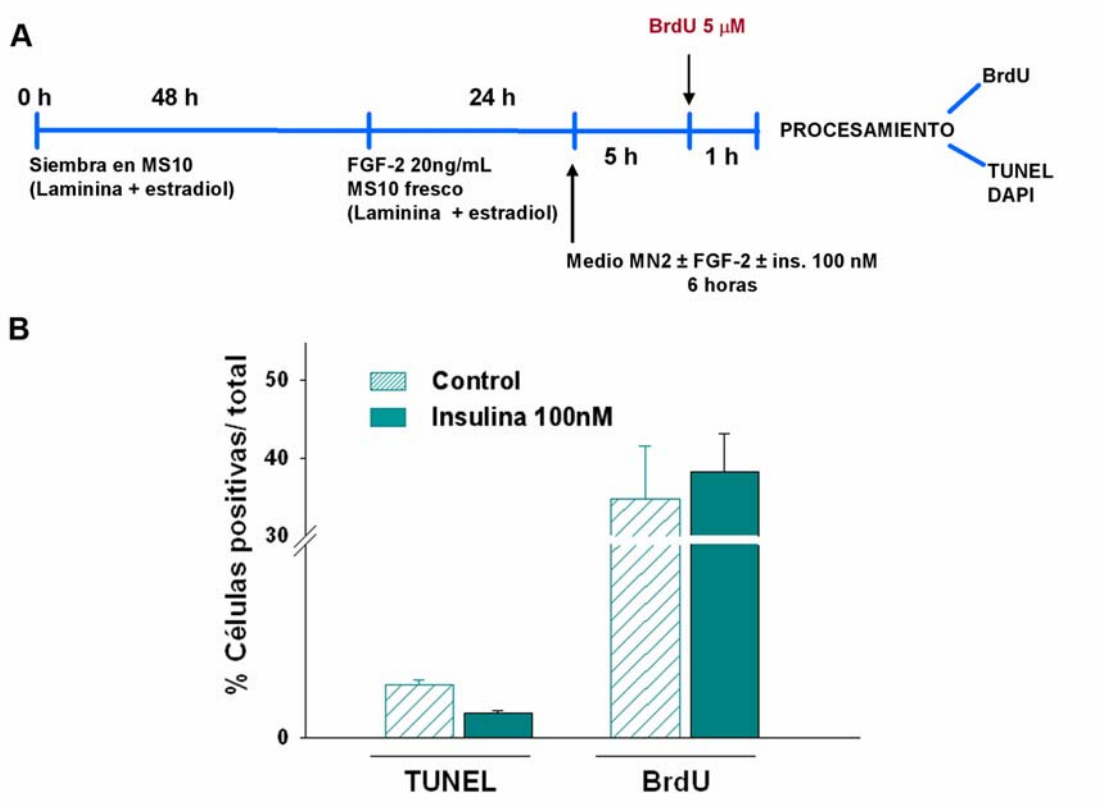


Fig.4.22. Cuantificación de la MCP y la proliferación sobre la línea RTC5 creciendo bajo el protocolo de diferenciación. Las células se sembraron y mantuvieron durante 48 horas en medio MS10 con suero, laminina y estradiol. Se trataron durante 24 horas con FGF-2 20 ng/mL. Finalmente con o sin insulina 100 nM en un medio definido MN2 sin suero durante 6 horas, añadiendo BrdU 1 hora antes de terminar el tratamiento (A). Las células se procesaron para cuantificar los porcentajes de MCP, representados como el % de células TUNEL-positivas, y los porcentajes de proliferación, representados como el % de células BrdU-positivas tanto en ausencia (control) como en presencia de insulina 100nM (B). Se realizaron dos experimentos independientes empleando por grupo cuatro pocillos de una cámara portaobjetos de 8 pocillos. Los valores son el resultado de la media ± ESM. No hubo diferencias significativas ($p \leq 0,14$).

La insulina era capaz inducir una respuesta antiapoptótica en la línea creciendo bajo condiciones de proliferación. El factor FGF-2, además, parecía estar induciendo una disminución de la susceptibilidad a morir en los cultivos de la línea RTC5, disminuyendo los porcentajes de núcleos TUNEL-positivos cuando se cultivaban las

células en presencia del factor. Además, FGF-2 aumentaba los porcentajes de núcleos BrdU-positivos con respecto al crecimiento en condiciones de proliferación.

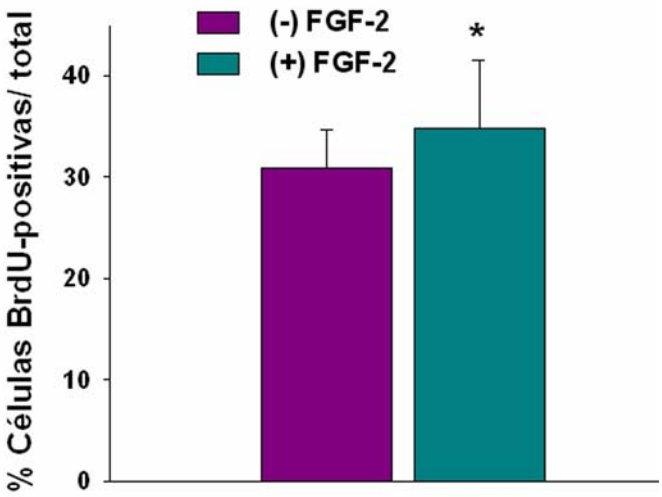
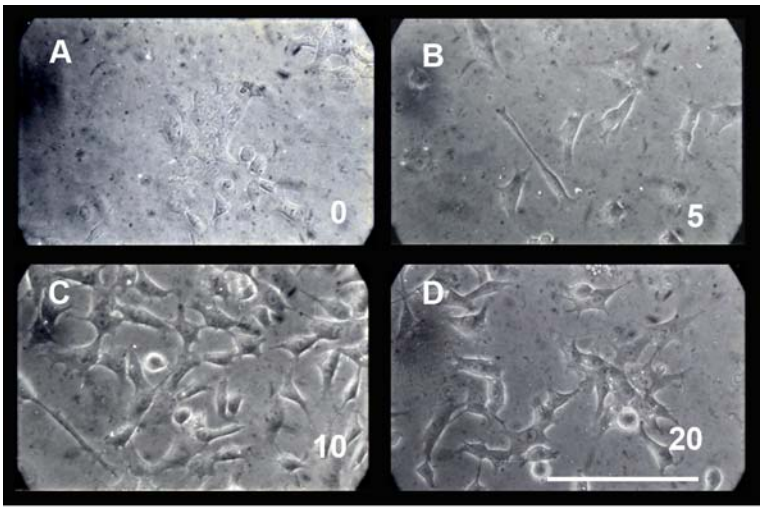


Figura 4.23. Cuantificación de la proliferación en la línea RTC5 creciendo bajo las condiciones de proliferación y diferenciación. La gráfica muestra los porcentajes de células BrdU-positivas tras someterlas al crecimiento en condiciones de proliferación (-) FGF-2 (barra magenta) y diferenciación (+) FGF-2 (barra ciano). Después fueron tratadas en un medio MN2 sin suero en presencia o ausencia de FGF-2 durante 6 horas. Se añadió BrdU al medio de cultivo 1 hora antes de finalizar el tratamiento. La gráfica es el resultado de dos experimentos independientes empleando para cada grupo experimental cuatro pocillos de una cámara portaobjetos de 8 pocillos. Los valores son el resultado de la media ± ESM. El asterisco corresponde a diferencias significativas($p \leq 0{,}004$).

4.5.1.2. El factor FGF-2 ejerce un papel antiapoptótico y proliferativo en la línea RTC5.

Dado que la presencia de FGF-2 en el cultivo debía inducir diferenciación, independientemente de que la proliferación fuese también elevada, decidimos diseñar un experimento que nos permitiera cuantificar el efecto mitogénico, antiapoptótico e inductor de la diferenciación de FGF-2 sobre la línea RTC5. Para ello, las células fueron cultivadas durante 120 horas en medio MS10 en presencia de distintas

concentraciones de FGF-2. Los efectos de la presencia de FGF-2 en el cultivo se detectaron a nivel morfológico mediante microscopía óptica invertida de contraste de fases (Fig.4.24 A-C). En la figura se muestran imágenes de 4 campos representativos con las concentraciones 0, 5, 10 y 20 ng/mL de FGF-2 empleadas. En ellas se observa como la morfología de las células cambió desde la concentración más baja. Estas adoptaron formas alargadas y presentaron prolongaciones citoplasmáticas a modo de neuritas. Estas características se vieron acentuadas a medida que se aumentó la concentración de FGF-2. Los efectos del factor a nivel cuantitativo se caracterizaron a través de los porcentajes de células proliferando, muriendo y diferenciando (Fig.4.24 E-F y Fig.4.25 respectivamente). La presencia de FGF-2 en el cultivo aumentó los porcentajes de núcleos BrdU-positivos de forma significativa con respecto al control en todos los casos (Fig.4.24 E). En cuanto a los porcentajes de apoptosis, todas las dosis estudiadas redujeron de manera significativa los porcentajes de células apoptóticas, siendo la concentración más alta, la de mayor efecto antiapoptótico (Fig.4.24 F). Quedaba por confirmar los efectos de las distintas concentraciones de FGF-2 en los porcentajes de neuronas TUJ-1-positivas. Su cuantificación permitió comprobar que el máximo porcentaje de neuronas se consiguió con la concentración intermedia 10 ng/mL, alcanzándose tan sólo un 2% de diferenciación (Fig.4.25).



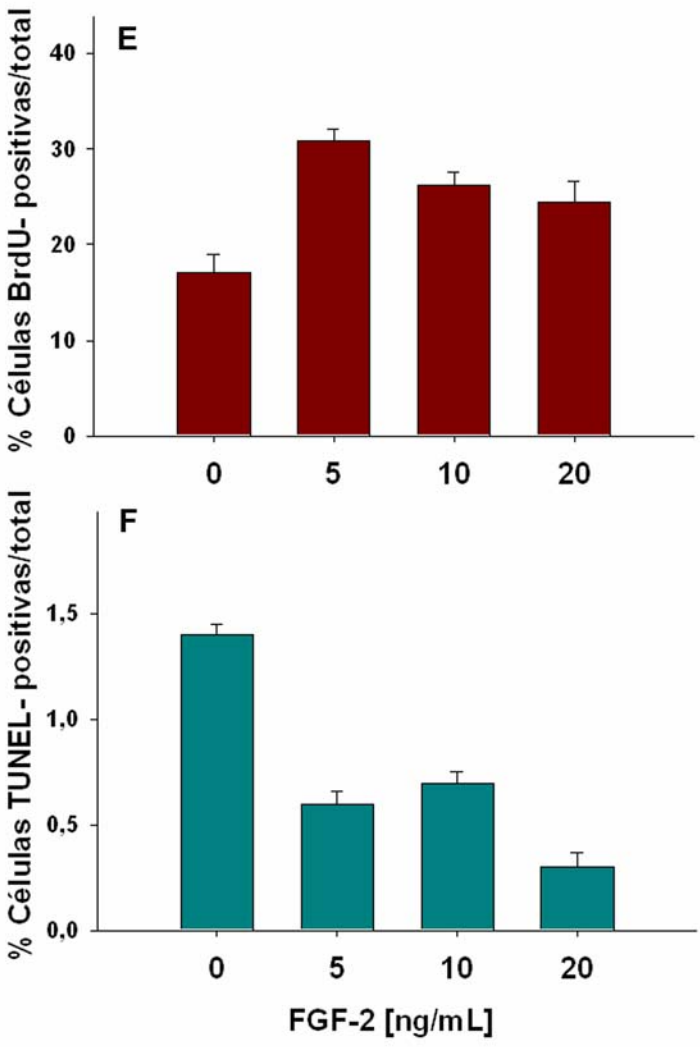
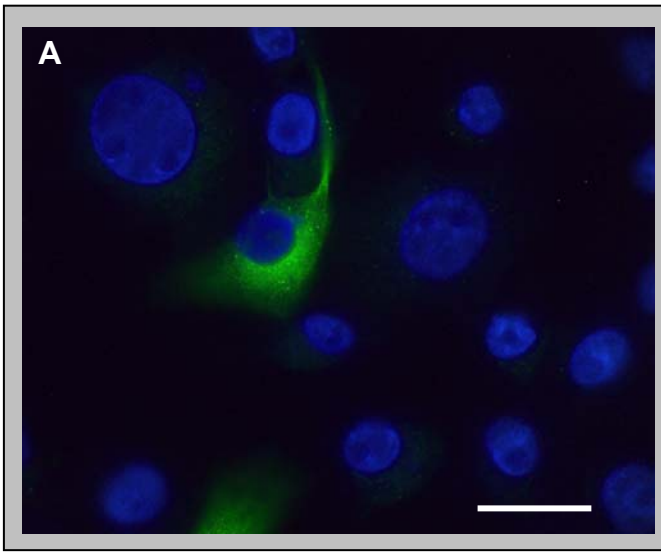


Fig. 4.24 Dosis-respuesta a FGF-2 en proliferación y MCP de la línea RTC5. Cambios morfológicos en la línea RTC5 tras 120 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de FGF-2 (A-D). Efecto de FGF-2 en proliferación cuantificada como la incorporación de BrdU (5μM) 1 hora antes del procesamiento de las células (E). Efecto anti-apoptótico de FGF-2 a diferentes concentraciones tras 120 horas de cultivo, cuantificado como el porcentaje de núcleos picnóticos TUNEL-positivos (F). Barra = 75 μm.



B

FGF-2 [ng/mL]	% células TUJ-1-positivas
0	0
5	0
10	2,1
20	1,3

Fig. 4.25. Dosis respuesta de FGF-2 en la diferenciación de la línea RTC5. La imagen obtenida con un microscopio de fluorescencia muestra un campo representativo de la inmunotinción para el marcador de neuronas TUJ-1 (verde) en la línea RTC5 tras el tratamiento con FGF-2 20 ng/mL durante 120 horas (A). Cuantificación del porcentaje de neuronas TUJ-1-positivas tras el cultivo de 120 horas en presencia de diferentes concentraciones de FGF-2 (B). Los valores obtenidos son el resultado de un único experimento empleando para cada dosis dos pocillos de una cámara portaobjetos de 8 pocillos.
Barra = 10 μm.

La línea RTC5 era capaz de responder a la insulina como factor antiapoptótico tanto bajo condiciones de proliferación como de diferenciación. No obstante, el factor FGF-2 también ejercía un papel potenciador de la supervivencia y la proliferación de estas células, mayor que su efecto diferenciador en nuestras manos. Las observaciones combinadas de la baja proporción de células diferenciadas obtenidas, más bajas que las esperadas y publicadas previamente, y del solapamiento de efectos proliferativos y antiapoptóticos nos llevó a decidir abandonar este sistema *in vitro*. Nuestro siguiente objetivo sería estudiar la regulación de la muerte en dos poblaciones celulares (proliferativas y diferenciadas) en el desarrollo empleando de nuevo como sistema modelo la retina embrionaria de pollo.

4.6. Caracterización de las vías de regulación y ejecución de la muerte celular programada en sus fases temprana y tardía durante el desarrollo de la retina.

La caracterización del proceso de muerte temprana que afecta a precursores proliferativos y a neuronas recién diferenciadas nos permitió plantearnos su posible regulación diferencial respecto al proceso de muerte neurotrófica que afecta más tardíamente a las neuronas de proyección. Moléculas implicadas en el proceso de ejecución de la muerte, tales como caspasas y catepsinas, y moléculas inductoras de supervivencia, entre ellas la insulina, eran posibles candidatas para una regulación diferencial de la cascada de señales pro- y anti-apoptóticas que determinan el balance entre muerte y supervivencia celular.

Debido a la imposibilidad de emplear un sistema *in vitro* que fuera razonablemente fisiológico y homogéneo, y que proporcionara porcentajes de proliferación y diferenciación adecuados, decidimos emplear la técnica de cultivo organotípico de retinas embrionarias para el estudio de la señalización de muerte y supervivencia. Esta técnica ya había dado con anterioridad resultados que correlacionaban con las observaciones *in vivo* (Díaz *et al.,* 1999 y 2000). Decidimos por tanto emplear los cultivos organotípicos en dos edades embrionarias; una que pertenecieran a una etapa de muerte temprana y alta proliferación, y otra que correspondiera a una etapa de muerte tardía y de diferenciación avanzada.

4.6.1 Muerte celular programada a lo largo del desarrollo de la retina embrionaria del pollo.

Empleando la técnica TUNEL quisimos visualizar la muerte celular a lo largo del desarrollo de la retina en secciones de criostato. De esta forma, podríamos comparar la incidencia de los procesos de muerte entre los primeros días de desarrollo –desde día de desarrollo embrionario 3 (E3)- y las etapas más tardías del mismo – hasta E19. Realizamos el marcaje TUNEL en secciones de retina y cuantificamos el número de células TUNEL-positivas en la zona central de la retina. En la Fig.4.26 se muestran imágenes representativas de las secciones en la zona de retina central (secciones realizadas y cuantificadas según el esquema detallado en material y métodos Fig.3.6).

La MCP visualizada mediante TUNEL resultó ser un proceso presente a lo largo de todos los estadios de desarrollo estudiados. Se visualizaron células TUNEL-positivas en estadios básicamente proliferativos de la retina (E3-E5) (Fig.4.26 A-C). También observamos núcleos TUNEL-positivos en estadios de diferenciación intermedia (E9-E11) y en aquellos en los que ya se ha establecido la sinaptogénesis (E16-E17) (Fig.4.26 F-K). Apenas se detectaron núcleos TUNEL-positivos al final del desarrollo, en E19, estadio en la que la retina es capaz de generar una respuesta eléctrica al estímulo por luz (Fig.4.26 L). La localización (Fig.4.26) y la cuantificación (Fig.4.27) del número de células TUNEL-positivas en las secciones de retina mostraron variaciones en cuanto a su distribución y magnitud a lo largo del desarrollo. El neuroepitelio (NE) central de la retina, en la zona próxima a la salida del nervio óptico, presentó una elevada densidad de núcleos marcados en edades entre E4 y E5 (Fig.4.26 A y B). El número de núcleos TUNEL-positivos/mm^2 fue de 11.666 ± 1.677 en E4 y disminuyó a 2.586 ± 300 en E5 (Fig.4.27 A). Entre E6 y E8, se detectó un descenso significativo en el número de células TUNEL-positivas (Fig.4.26 D y E, y Fig. 4.27 A).

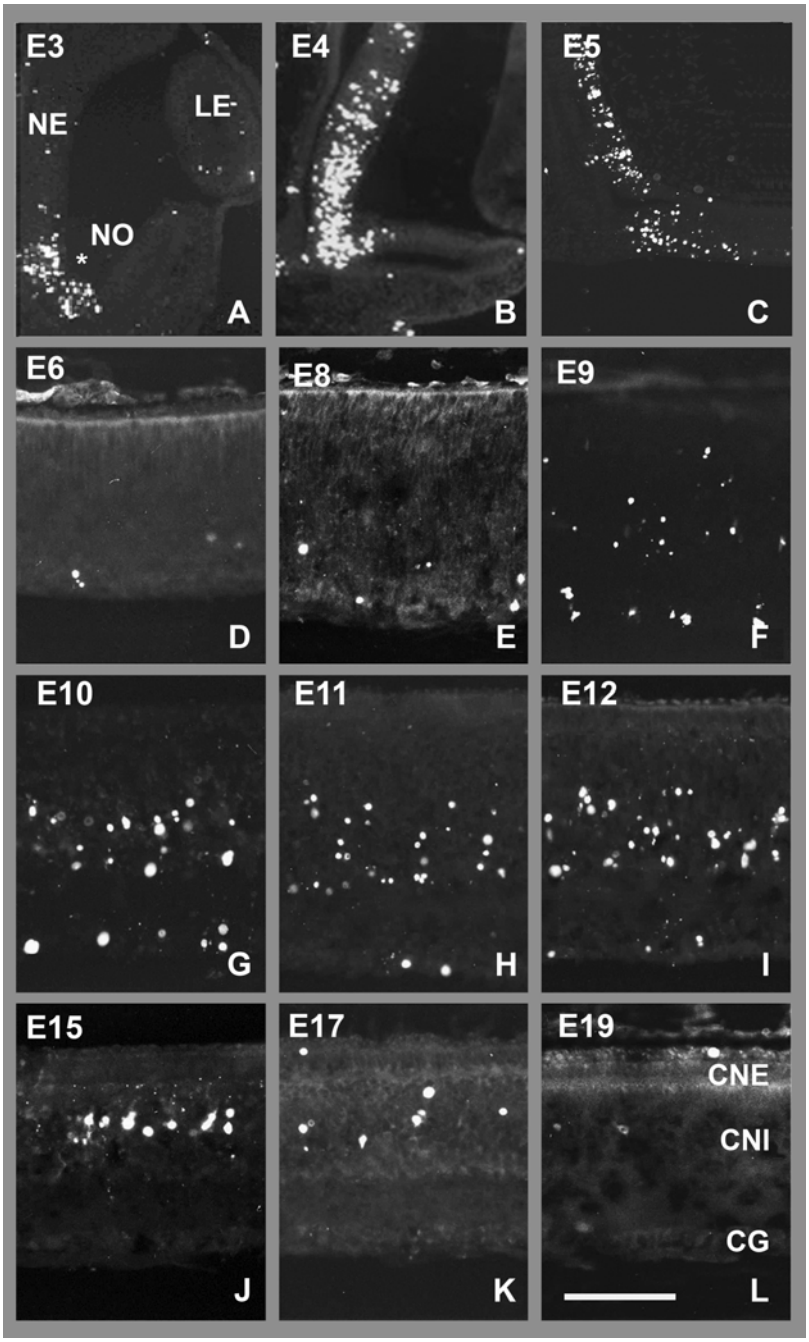


Figura 4.26. Muerte celular programada a lo largo del desarrollo de la retina embrionaria de pollo. Los paneles muestran la distribución de la muerte celular detectada mediante la técnica TUNEL en diferentes estadios de desarrollo de la retina, desde E3 hasta E19. Las imágenes fueron tomadas con microscopia confocal en criosecciones de 10 μm de retina centra, paralelas al eje óptico. Las distintas capas de la retina (CG, capa de ganglionares; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa), se forman de forma secuencial durante el desarrollo. El asterisco indica la salida del nervio óptico en los estadios más tempranos. NE, neuroepitelio; LE, lente; NO, nervio óptico. La barra representa 400μm para paneles A-C, 200μm para paneles D-L.

Los valores de núcleos TUNEL-positivos/mm^2 en estas edades oscilaron entre 148 ± 31 (E6), 255 ± 59 (E7) y 272 ± 28 (E8). Tras este periodo, hubo un nuevo aumento de muerte celular afectando a células localizadas en las distintas capas de la retina. De forma secuencial se vieron afectadas células localizadas en la capa de ganglionares (CG) (Fig.4.26, E-H) y cuyo pico se puso de manifiesto en E9 con un número de núcleos TUNEL-positivos/mm^2 de 539 ± 135 (Fig.4.27 B). Las células localizadas en la capa nuclear interna (CNI) (Fig.4.26 F-K) presentaron un pico de muerte celular en E11 con un valor de 2.229 ± 121 núcleos TUNEL-positivos/mm^2 (Fig. 4.27 B). Apenas se detectaron células TUNEL-positivas localizadas en la capa nuclear externa (CNE), donde están localizados los núcleos de los fotorreceptores, aunque en E11 pudimos observar un pico de 6 núcleos TUNEL-positivos/mm^2 en dicha capa.

La densidad relativa de los núcleos TUNEL-positivos cuantificados en el pico de muerte temprana de E4 fue 24 veces mayor que la el pico de muerte localizada en la capa de ganglionares (CG) de E9 y 5 veces mayor que el pico de muerte localizada en la capa nuclear interna (CNI) en E11. La incidencia de la muerte en estadios de desarrollo temprano resultó ser, por tanto, significativamente mayor que la densidad de muerte en estadios de desarrollo más tardíos.

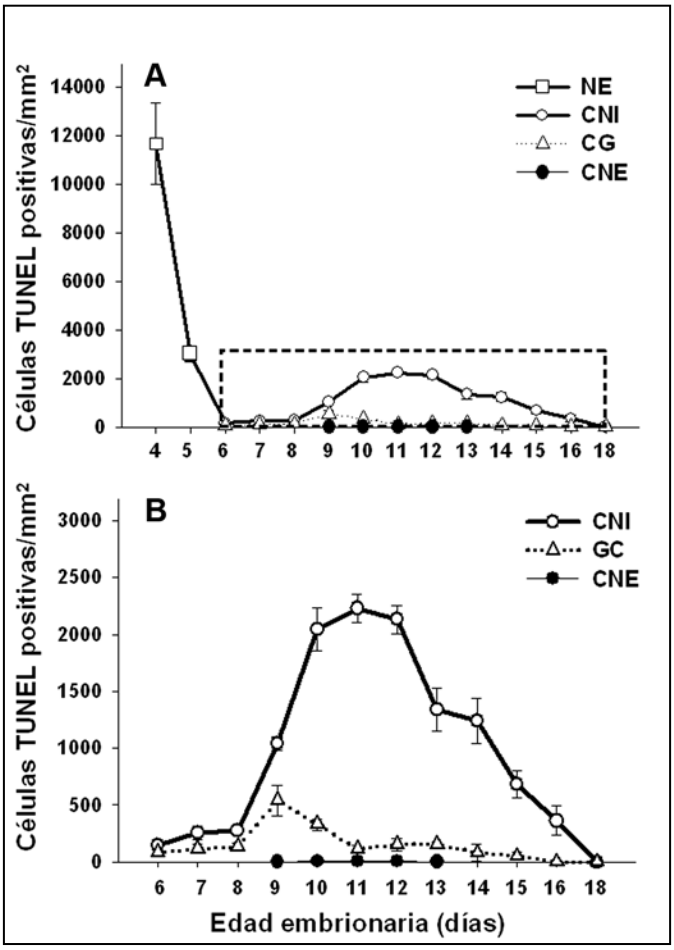


Figura 4.27. Cuantificación de la MCP a lo largo del desarrollo embrionario de la retina de pollo. La densidad de muerte fue cuantificada como el número de células TUNEL-positivas/mm^2 en 4 campos centrales de 4 secciones de criostato de retina desde E4 hasta E18 (A). En los estadios embrionarios tempranos (E4-E6) se incluyó todo el neuroepitelio (NE) en la cuantificación. A partir de E6, a medida que la retina se estructuraba en las diferentes capas la densidad relativa de muerte se cuantificó de manera independiente en cada una de ellas. El rectángulo punteado se amplia a escala con el objetivo de visualizar mejor la muerte dentro de cada capa (B). NE, neuroepitelio; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CG, capa de ganglionares. Los valores representan las media ± SD de 4 campos de la región central en 4 retinas independientes por edad.

4.6.2 Proliferación y muerte celular programada en dos estadios del desarrollo de la retina: E5 y E9.

Basándonos en la caracterización de la distribución y magnitud de la muerte a lo largo del desarrollo, optamos por realizar el estudio de las vías de señalización en retinas de embriones de día 5 y 9. Elegimos E5 como edad correspondiente a una etapa de muerte celular temprana de la retina de pollo. En esta edad la retina está proliferando activamente y presenta una elevada densidad de MCP localizada en retina central alrededor de la fisura óptica (Fig.4.26 C y Fig.4.27 A). Como edad correspondiente a una fase de muerte más tardía elegimos E9. La retina de E9 se encuentra en un estado de diferenciación intermedia y de baja proliferación, y en ella observamos un pico de muerte correspondiente a la capa de células ganglionares (Fig.4.26 F y Fig.4.27 B). Quisimos comparar las densidades de proliferación en retinas de ambas edades realizando inyecciones *in vivo* con BrdU y dejando incubar durante 6 horas. En la Fig.4.28 mostramos imágenes de muerte y proliferación en retinas de ambas edades embrionarias. Las imágenes corresponden a un campo representativo de la zona central de la retina, justo por encima de la fisura óptica. En ellas se observan los núcleos TUNEL-positivos en E5 (Fig.4.28 A) y E9 (Fig.4.28 C) y los núcleos proliferativos BrdU-positivos en E5 (Fig.4.28 B) y E9 (Fig.4.28 D). Las retinas analizadas mostraron en todos los casos un marcaje abundante de núcleos proliferando en E5 comparado con E9. Para cuantificar el número de núcleos proliferando y picnóticos, decidimos abarcar cinco campos alrededor de la fisura óptica cubriendo el área central de la retina montada en plano (ver esquemas de retinas montadas en plano de Fig.4.28). El área cuantificada representa aproximadamente un 3% de la retina en E5 y un 0,4 % de la retina en E9. La cuantificación *in vivo* (sin tratamientos) del número de núcleos apoptóticos por volumen (**TUNEL-positivos/mm^3)** sobre retinas montadas en plano mostró valores similares entre E5 y E9.

Así en E5, (Fig.4.28 A) encontramos 2.220 ± 260 núcleosTUNEL-positivos/mm^3 y E9 (Fig.4.28 C), 924 ± 126 núcleosTUNEL-positivos/mm^3. En cuanto a la proliferación, el número de núcleos **BrdU-positivos/mm^3** fue de 76.220 ± 2.950 en E5 (Fig.4.28 B) y de 100 ± 2 en E9 (Fig.4.28 D). Estos datos confirmaron que la retina de E5 se encuentra en una etapa de mayor proliferación que la retina de E9. Teniendo como referencia estos valores de muerte y proliferación *in vivo*, decidimos realizar todas las cuantificaciones posteriores abarcando los cinco campos de retina central.

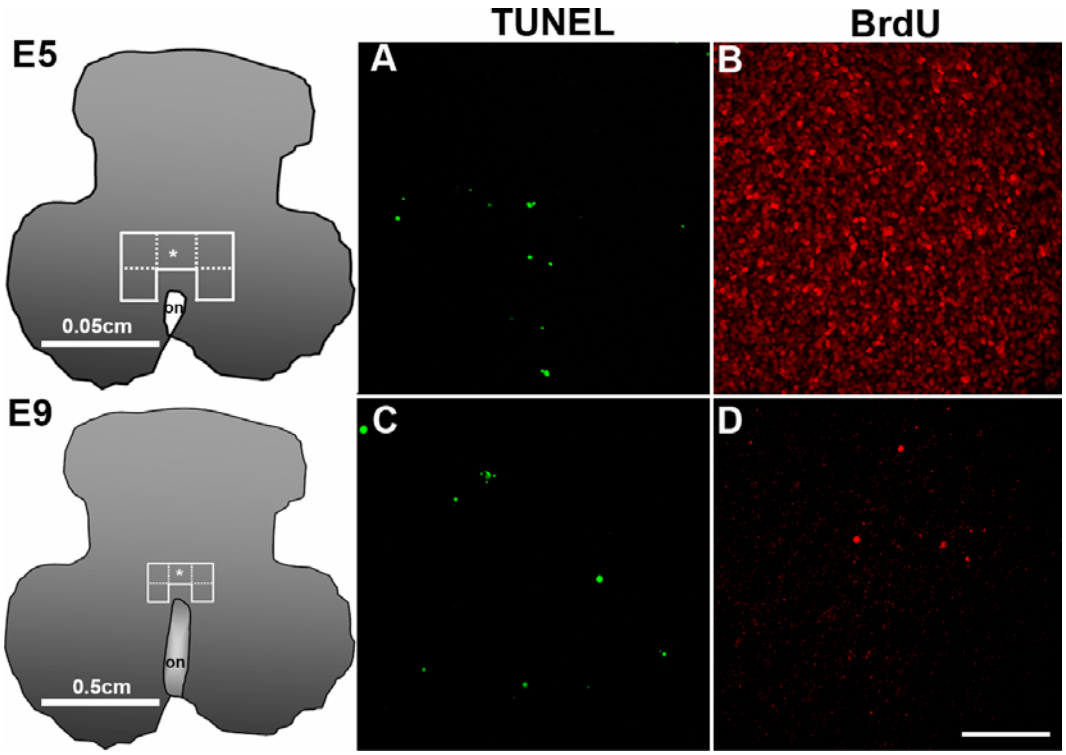


Figura 4.28. Proliferación y MCP en retina *in vivo* de E5 y E9. A la izquierda se muestran esquemas de retinas montadas en plano de E5 (superior) y E9 (inferior). La zona delimitada con la cuadrícula corresponde a cinco campos alrededor de la fisura óptica. Esta área fue utilizada para la cuantificación de núcleos picnóticos TUNEL-positivos y núcleos proliferativos BrdU-positivos. Los asteriscos señalan las áreas presentadas en los paneles A-D. El marcaje de núcleos picnóticos mediante TUNEL (verde) se realizó sobre retinas embrionarias *in vivo* y sin ningún tratamiento (A y C). La incorporación de BrdU se realizó *in vivo* durante 6 horas de incubación, periodo tras el cual las retinas fueron procesadas para la inmunohistoquímica con el anticuerpo contra BrdU (rojo) (B y D). Cada imagen corresponde a la proyección de las series confocales obtenidas para toda la retina. El mismo tipo de marcaje se obtuvo en 4 retinas de embriones diferentes. Barra = 100 μm

4.6.3 Mecanismos de ejecución de la muerte celular programada: caspasas y catepsinas.

Quisimos comprobar el papel de las caspasas y las catepsinas en la ejecución de la MCP en la neurorretina embrionaria. Las primeras son las proteasas efectoras de la gran mayoría de los procesos de MCP apoptótica. Las catepsinas son proteasas lisosomales capaces de activar vías de muerte apoptótica bien a través de la activación de caspasas o bien liberando factores pro-apoptóticos de la mitocondria. Su papel dentro de la MCP en el sistema nervioso parece cada vez más relevante.

Para comprobar si ambos tipos de proteasas estaban implicadas en la ejecución de la MCP en retinas de E5 y E9, cultivamos retinas de ambas edades en un medio definido MN2, bajo dos tipos de condiciones: ausencia de factores de crecimiento [(-) FC], o bien en presencia de inhibidores de caspasas y catepsinas. En el caso de las caspasas, empleamos como inhibidor general el compuesto Boc-D-fmk (38μM). Como inhibidores de catepsinas empleamos el inhibidor de catepsina-B, z-FA-fmk (150μM) y catepsina-L, z-FF-fmk (20μM). En las Fig.4.29 A y B se muestran las densidades relativas de inhibición de la MCP en retinas montadas en plano de E5 y E9 respectivamente. En ambos casos el tratamiento con cualquiera de los inhibidores disminuyó de manera significativa ($p \leq 0{,}0036$) la muerte causada por la ausencia de factores de crecimiento, implicando ambos tipos de proteasas en la ejecución de la muerte inducida por la ausencia de factores.

Una vez establecido el papel tanto de caspasas como de catepsinas en la ejecución de la MCP de retinas de E5 y E9, procedimos a estudiar los elementos reguladores de la supervivencia.

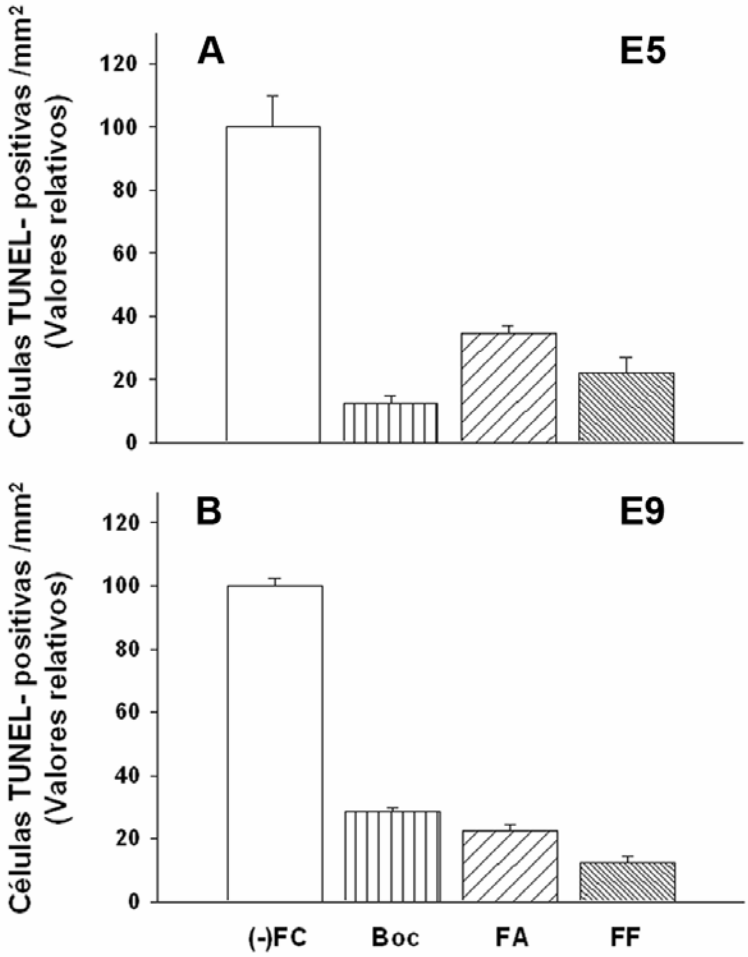


Figura 4.29. La inhibición de caspasas y catepsinas impiden la muerte celular inducida por la carencia de factores. Retinas de E5 (A) y de E9 (B) fueron cultivadas en un medio definido carente de factores de crecimiento (-FC) y en presencia de 38 μM de Boc-D-fmk, 150 μM de z-FA-fmk y 20 μM de z-FF-fmk. Tras el cultivo, las retinas fueron montadas en plano, procesadas para la técnica TUNEL y cuantificadas en cinco campos alrededor de la fisura óptica, siguiendo el esquema de la figura 4.28. La gráficas muestran los valores relativos del la densidad de núcleos TUNEL-positivos respecto a las condición de ausencia de factores (-FC). Los valores representan la media ± ESM de 4-6 retinas cultivadas independientemente para cada tratamiento. $p \leq 0.0036$ para todos los tratamientos con respecto a (–FC).

4.6.4 Acción de la insulina y la proinsulina en la supervivencia.

Experimentos previos en el laboratorio habían demostrado que la insulina y factores de crecimiento pertenecientes a la familia, tales como el IGF-I y la proinsulina, desempeñaban un papel importante en la supervivencia celular. Dichos factores fueron capaces de prevenir la MCP durante el pico que tenía lugar en E4 tanto en cultivos organotípicos como en el sistema *in vivo* (Díaz *et al.,* 1999 y 2000). Adicionalmente, habíamos comprobado el papel antiapoptótico de la insulina en los cultivos celulares de la línea de retina temporal de codorniz RTC5. Nos propusimos pues comprobar si cultivos organotípicos de retinas embrionarias de E5 y E9 eran capaces de responder a la insulina y a su precursor, la proinsulina. Cultivamos retinas de ambas edades durante en 6 horas en un medio definido en condiciones control sin factores y en medio definido con concentraciones crecientes de insulina (10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8} y 10^{-7} M) y proinsulina (10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8} M). Tras el cultivo las retinas fueron procesadas y la MCP determinada en el área central mediante la cuantificación de la densidad de núcleos TUNEL-positivos. En la figura 4.30 se muestran las gráficas de concentración-respuesta a proinsulina y las gráficas de concentración-respuesta a insulina en ambas edades (Fig.4.30 A y B respectivamente). También se hayan representado los valores de % de rescate obtenido para proinsulina e insulina (Fig.4.30 C y D respectivamente).

Tanto las retinas de E5 como las de E9 fueron capaces de responder a ambos factores a las diferentes concentraciones ensayadas. En retinas de E5, el cultivo con la mayor concentración ensayada de insulina -10^{-7}M- fue capaz de restablecer los niveles de muerte celular a los valores cuantificados *in vivo* (retinas no tratadas, extraídas directamente del embrión, montadas en plano y fijadas en el momento). Los valores *in vivo* para retinas de E5 fueron de 222 ± 26 núcleos TUNEL-positivos/mm^2). También se restablecieron los valores *in vivo* de MCP para las retinas de E9 (361 ± 63 TUNEL-positivos/mm^2 *in vivo*).

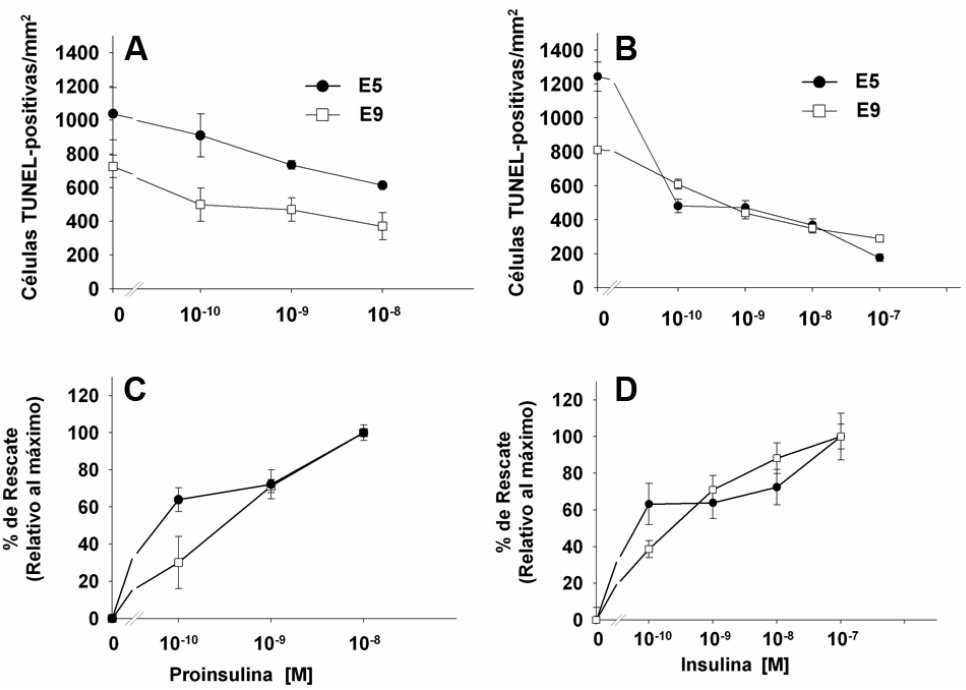


Figura 4.30. Atenuación de la muerte inducida por carencia de factores ante diferentes concentraciones de insulina y proinsulina en retinas de E5 y E9. Las retinas de E5 (●) y de E9 (□) se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de proinsulina e insulina humanas recombinantes. Tras el cultivo las retinas fueron procesadas para la técnica TUNEL y cuantificadas según se ha indicado en el panel de la figura 4.28. Los valores en los paneles A y B corresponden a las densidades absolutas del número de núcleos TUNEL-positivos y representan la media ± ESM de 6-8 retinas cultivadas independientemente por concentración. p≤ 0.0057. Los valores en los paneles C y D son relativos al máximo rescate conseguido con la concentración 10^{-8}M de proinsulina y 10^{-7} M de insulina respectivamente.

Por su parte, las concentraciones más bajas, tanto de proinsulina como de insulina (Fig.4.30 B), indujeron una disminución más acentuada de la densidad de núcleos TUNEL-positivos en E5 que en E9. Esto se observó mejor en la gráfica en la que representamos el % de rescate (Fig.4.30 D) siendo mayor el efecto antiapoptótico de la insulina a la concentración 10^{-10} M en las retinas de E5.

Por tanto, las retinas cultivadas en presencia de insulina y proinsulina fueron capaces de responder a ambos factores, produciéndose una disminución de la MCP en ambas edades embrionarias. Adicionalmente encontramos un comportamiento diferencial en la concentración más baja -10^{-10} M- siendo mayor el efecto

antiapoptótico en retinas de E5 que en retinas de E9. La mayor concentración ensayada 10^{-7} M revertió los valores de MCP a aquellos encontrados *in vivo*.

4.6.5 Modulación de los procesos de proliferación y diferenciación por insulina.

Además de su efecto de supervivencia en retinas de E5 y E9, la insulina podría también modular los procesos de proliferación y diferenciación. Para estudiar este aspecto cultivamos las retinas en un medio definido en ausencia del factor de crecimiento o en presencia de insulina 100nM, concentración que mayor efecto de supervivencia ejerció en las curvas de concentración-respuesta (Fig.4.30 B y D). Tras el cultivo, las retinas se disociaron y se calcularon los porcentajes de muerte, proliferación y diferenciación mediante marcajes inmunocitoquímicos sobre citoespines de células disociadas. En la figura.4.31 se muestran los resultados para retinas de E5 de los porcentajes de MCP cuantificada en células disociadas mediante la tinción de los núcleos picnóticos con DAPI, los porcentajes de células proliferativas BrdU-positivas y de neuronas TUJ-1-positivas. Confirmando el efecto de supervivencia de las concentración ensayada, hubo diferencias significativas ($p \leq 0,04$) en los porcentajes de núcleos apoptóticos entre la condición de cultivo carente de factores (-FC) y cultivo en presencia de insulina para retinas de E5 (Fig. 4.31 A). En cuanto a los porcentajes de proliferación y diferenciación en E5, no hubo modificaciones en los niveles de células proliferativas (BrdU-positivas) (Fig.4.31 B) ni diferenciadas (TUJ-1-positivas) (Fig.4.31 C) entre ambas condiciones. En la figura 4.32 se muestran el efecto de la insulina en E9. La presencia de insulina en los cultivos de retinas de E9 también disminuyó de forma significativa ($p \leq 0,039$) los porcentajes de núcleos apoptóticos (Fig.4.32 A). No obstante no moduló los porcentajes de células proliferativas (Fig.4.32 B) y neuronas (Fig.4.32 C).

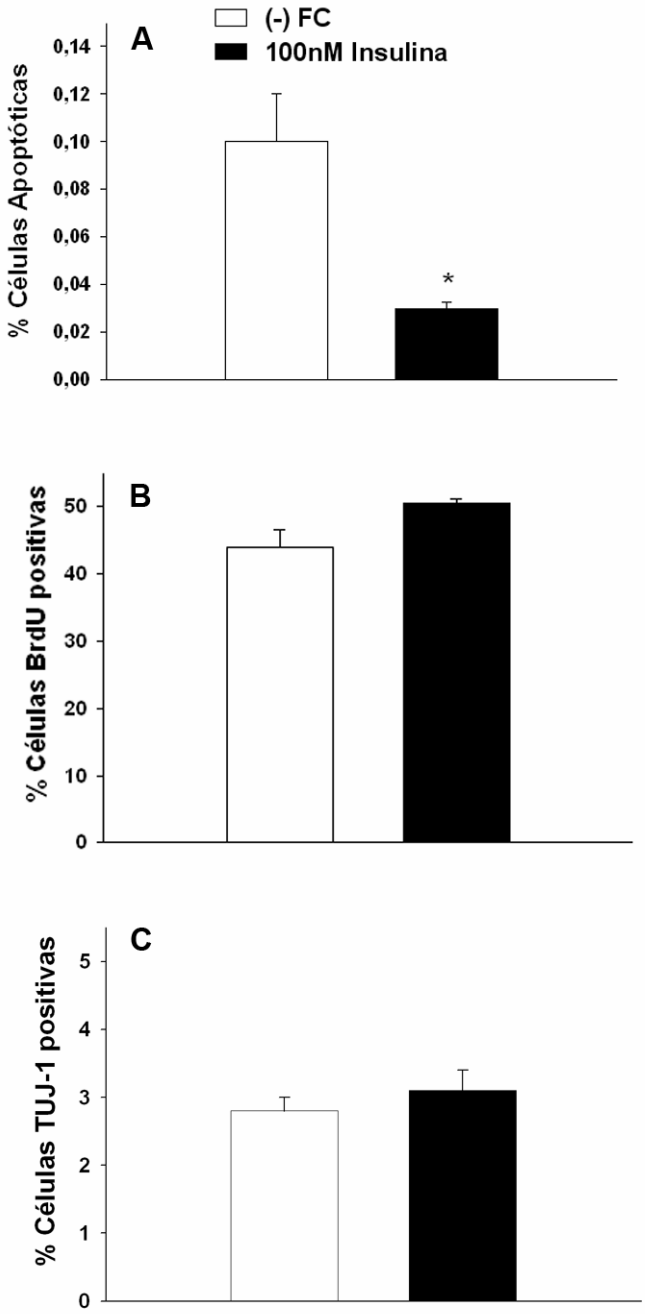


Figura 4.31. Implicación de la insulina en los procesos de muerte celular, proliferación y diferenciación en retinas de E5. Las retinas de E5 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia insulina 100 nM y BrdU 5 μM. Tras el cultivo, las retinas fueron disociadas y procesadas para la visualización y cuantificación de núcleos apoptóticos mediante la tinción con nuclear con DAPI (A), de núcleos proliferativos mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-BrdU (B) y de neuronas mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-TUJ-1 (C). Los valores son relativos al total de células contadas y representan la media ± ESM de cuatro retinas por grupo. El asterisco representa diferencias significativas ($p \leq 0,04$).

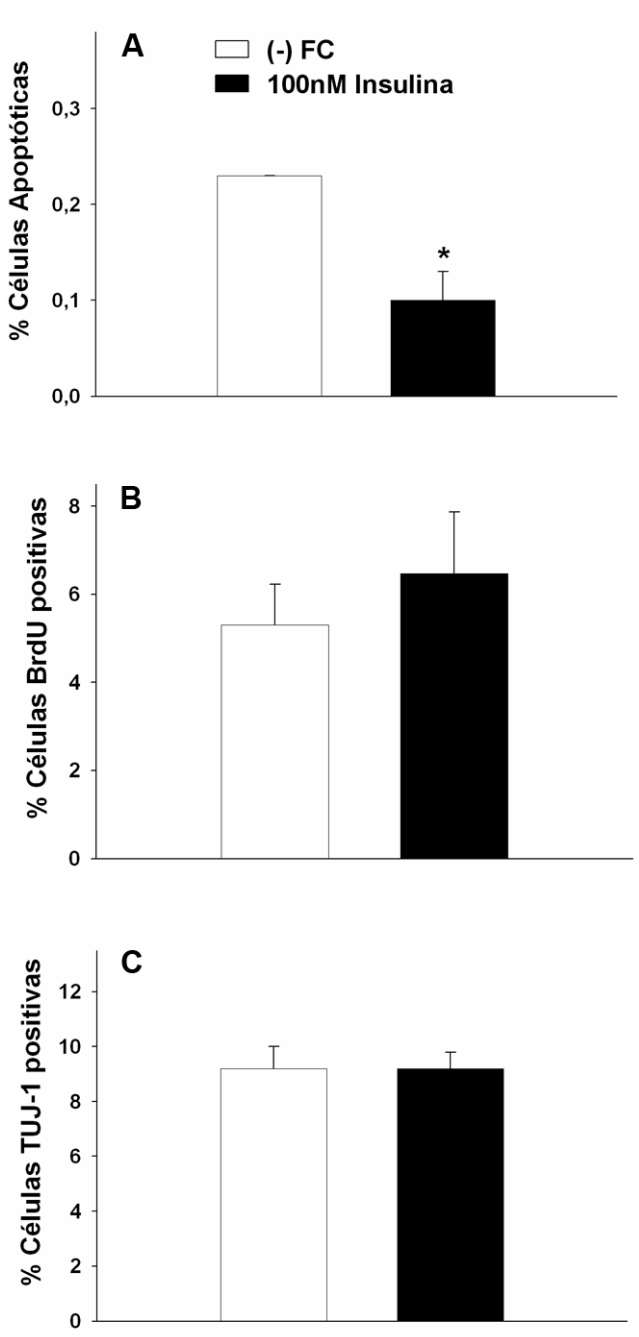


Figura 4.32. Implicación de la insulina en los procesos de muerte celular, proliferación y diferenciación en retinas de E9. Las retinas de E9 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia insulina 100 nM y BrdU 5 μM. Tras el cultivo, las retinas fueron disociadas y procesadas para la visualización y cuantificación de núcleos apoptóticos mediante la tinción nuclear con DAPI (A), de núcleos proliferativos mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-BrdU (B) y de neuronas mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-TUJ-1 (C). Los valores son relativos al total de células contadas y representan la media ± ESM de cuatro retinas por grupo. El asterisco representa diferencias significativas ($p \leq 0{,}039$).

Estos resultados nos indicaban que el efecto de la insulina en los cultivos de 6 horas era muy selectivo a nivel de la supervivencia celular, sin modificar apreciablemente los procesos de proliferación y diferenciación, tanto en retinas de E5 como de E9.

4.6.6 La insulina como factor de supervivencia: señalización a través de PI3K-Akt y MEK-ERK.

Sabiendo que las retinas de E5 y E9 se comportaban de manera diferente en cuanto al porcentaje de rescate por insulina en la dosis más baja empleada (Fig.4.30 D), decidimos explorar si los mecanismos a través de los cuales el factor regulaba los procesos de muerte temprana y tardía presentaban también diferencias a nivel de vías de señalización. Las vías de activación inducidas por insulina más comunes son la vía de la quinasa de los inositoles 3-fosfato (PI3K) y la vía de las quinasas inducidas por estrés (ERK) (revisado en Varela-Nieto *et al.,* 2003). Ambas vías juegan un papel esencial en la regulación de procesos de proliferación, neurogénesis y supervivencia celular a través de los receptores de la insulina y los factores pertenecientes a la familia. Para caracterizar la contribución de ambas vías en los efectos de supervivencia inducidos por insulina, cultivamos retinas embrionarias en presencia de Ly-294002, inhibidor de PI3K, la quinasa responsable de la activación por fosforilación de Akt. Como inhibidores de la vía de las MEK-ERK, empleamos dos inhibidores específicos de las quinasas responsables de la activación por fosforilación de ERK1/2: U-0126 y PD-98059.

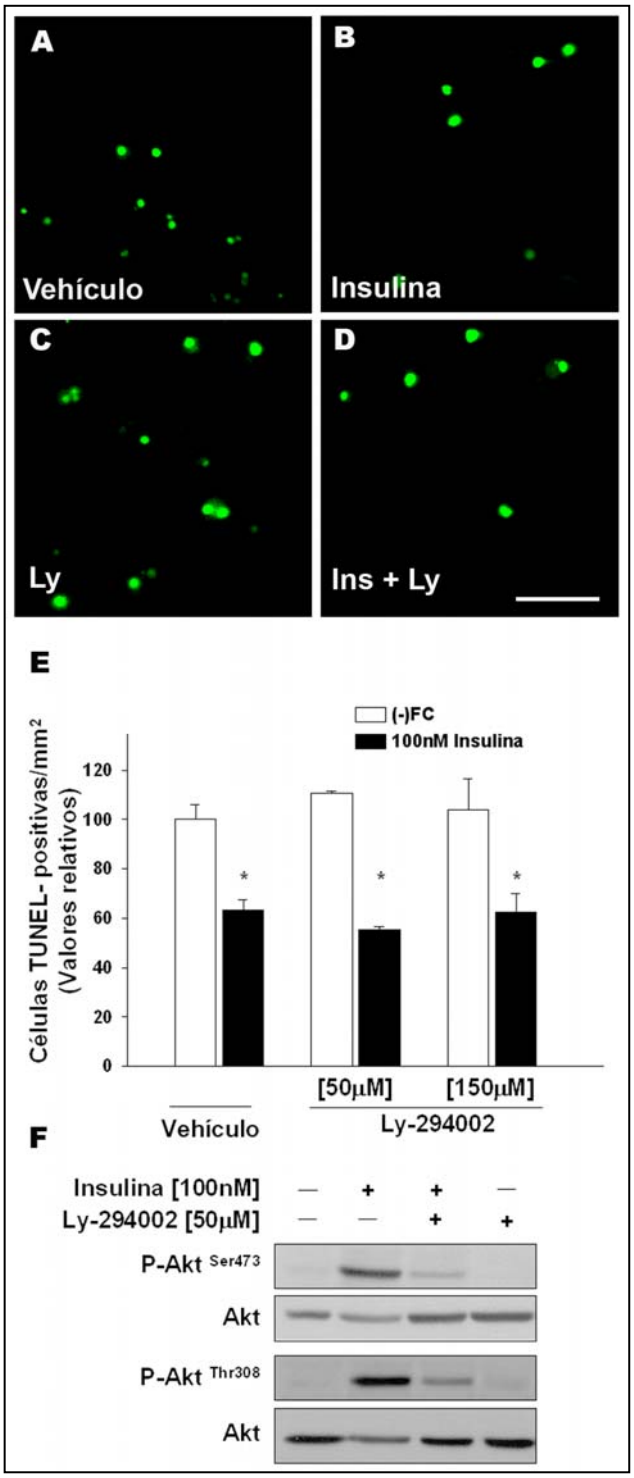


Figura 4.33. Señalización de la supervivencia inducida por insulina independiente de PI3K-Akt en retinas de E5. Las retinas de E5 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de insulina y Ly-294002. Tras el cultivo las retinas fueron procesadas para la técnica TUNEL (A-D), cuantificadas según indicado en la figura 4.28 o procesadas para "western blot" con anticuerpos específicos contra Akt y P-Akt en los residuos Ser^{473} y Thr^{308}. Los valores en el panel (E) son relativos a la densidad de núcleos TUNEL-positivos del grupo (-FC) y representa la media ± ESM de 6-8 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas para un valor de $p \leq 0.0057$ en todos los grupos. El panel (F) muestra una membrana representativa de dos experimentos independientes. Barra = 50 μm.

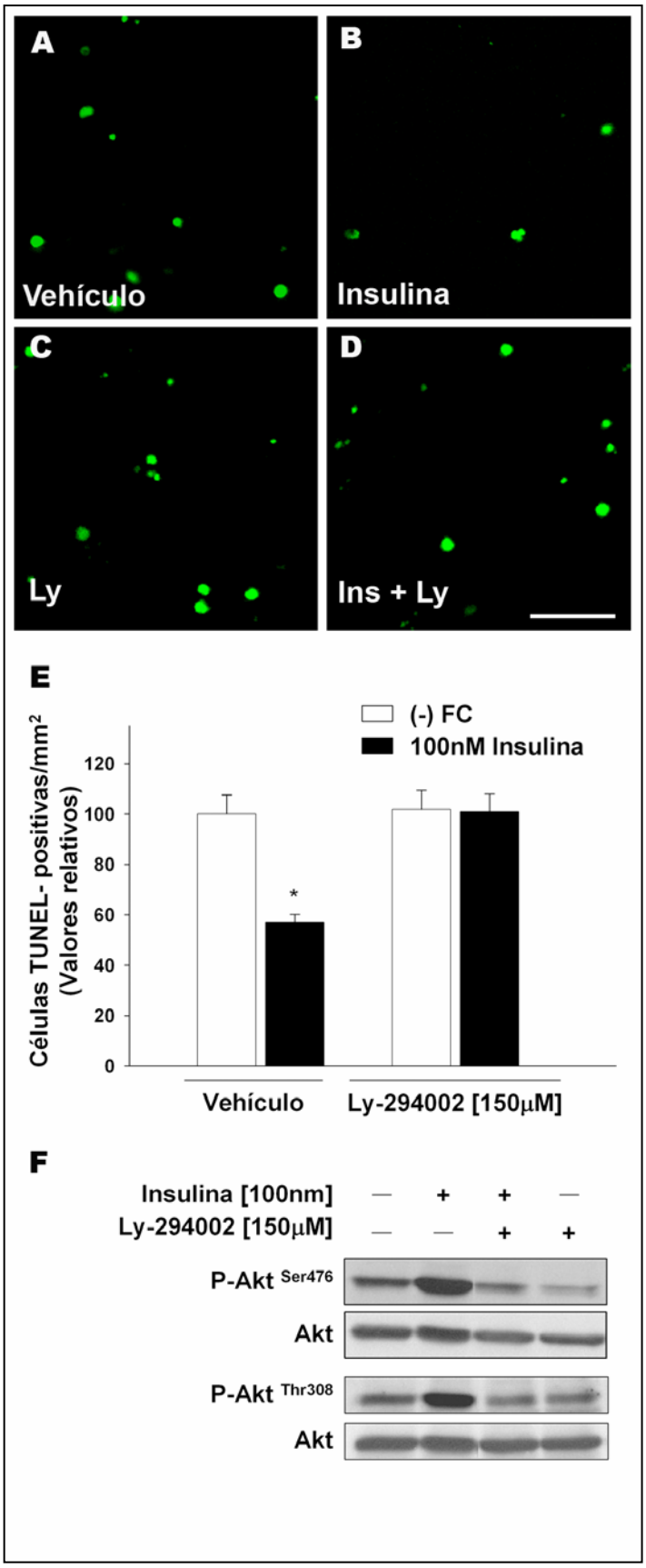


Figura 4.34. Señalización de la supervivencia inducida por insulina dependiente de PI3K-Akt en retinas de E9. Las retinas de E9 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de insulina y Ly-294002. Tras el cultivo las retinas fueron procesadas para la técnica TUNEL (A-D), cuantificadas según indicado en la figura 4.28 o procesadas para "western blot" con anticuerpos específicos contra Akt y P-Akt en los residuos Ser^{473} y Thr^{308} (F). Los valores en el panel (E) son relativos a la densidad de núcleos TUNEL-positivos del grupo (-FC) y representa la media ± ESM de 6-8 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas para un valor de $p \leq 0.0057$ en todos los grupos. El panel (F) muestra una membrana representativa de dos experimentos independientes. Barra 50 μm.

En E5, la presencia del inhibidor Ly-294002, no impidió el rescate inducido por insulina, manteniéndose la densidad de células TUNEL-positivas a los niveles de las retinas tratadas en presencia de insulina (Fig.4.33 A-E). El análisis de los niveles de fosforilación de p-Akt mostraron que Ly-294002 era capaz de inhibir activación inducida por insulina en los dos residuos susceptibles de fosforilación, tanto Ser^{473} como Thr^{308} (Fig.4.33 F). Esto nos indicó que la activación de PI3K-Akt no era necesaria para mediar los efectos de supervivencia inducidos por insulina en este estadio del desarrollo.

Cuando se realizó el mismo ensayo en E9, tuvimos que emplear una concentración de Ly-294002 de 150 μM (Fig. 4.34). En una retina de esta edad, el número de capas celulares y su grosor es muy superior al de una retina de E5. Dicha concentración inhibió la fosforilación de p-Akt inducida por insulina en E9 (Fig.4.34 F). También fue capaz de inhibir la supervivencia inducida por insulina (Fig. 4.34 E) mientras que había sido inefectiva en E5 (Fig.4.33 E), lo que nos indicó claramente que, en el caso de las retinas de E9, la vía de supervivencia inducida por insulina era dependiente de PI3K-Akt.

Estábamos, por tanto, frente a dos mecanismos de señalización cuya activación por el mismo factor era dependiente de la edad: en E9 la supervivencia implicaba activación dependiente de PI3K-Akt y en E5 era una activación independiente. Para dilucidar la vía de señalización en E5, cultivamos retinas en presencia de los inhibidores de MEK-ERK, U-0126 y PD-98059. En este caso, el efecto antiapoptótico de la insulina fue completamente bloqueado por U0126 (Fig.4.35 A-E) y por PD-98059 (Fig. 4.36 A-E). También se produjo la inhibición de la fosforilación de ERK inducida por insulina en presencia del inhibidor U-0126 (Fig.4.35 F).

Para comprobar si en E9 había algún efecto en la vía de señalización de ERK, cultivamos retinas en presencia de una concentración efectiva de U-0126 para esta edad, de nuevo 150 μM. La presencia del inhibidor en los cultivos con insulina no

impidió el efecto de supervivencia de la misma (Fig.4.37 A-E) aunque sí produjo inhibición a nivel de fosforilación de ERK1/2 (Fig.4.37 F).

Todos estos resultados demostraron que el efecto de supervivencia de la insulina parecía estar mediado por la activación de la vía ERK1/2 en E5 y por la activación de la vía de PI3K-Akt en E9.

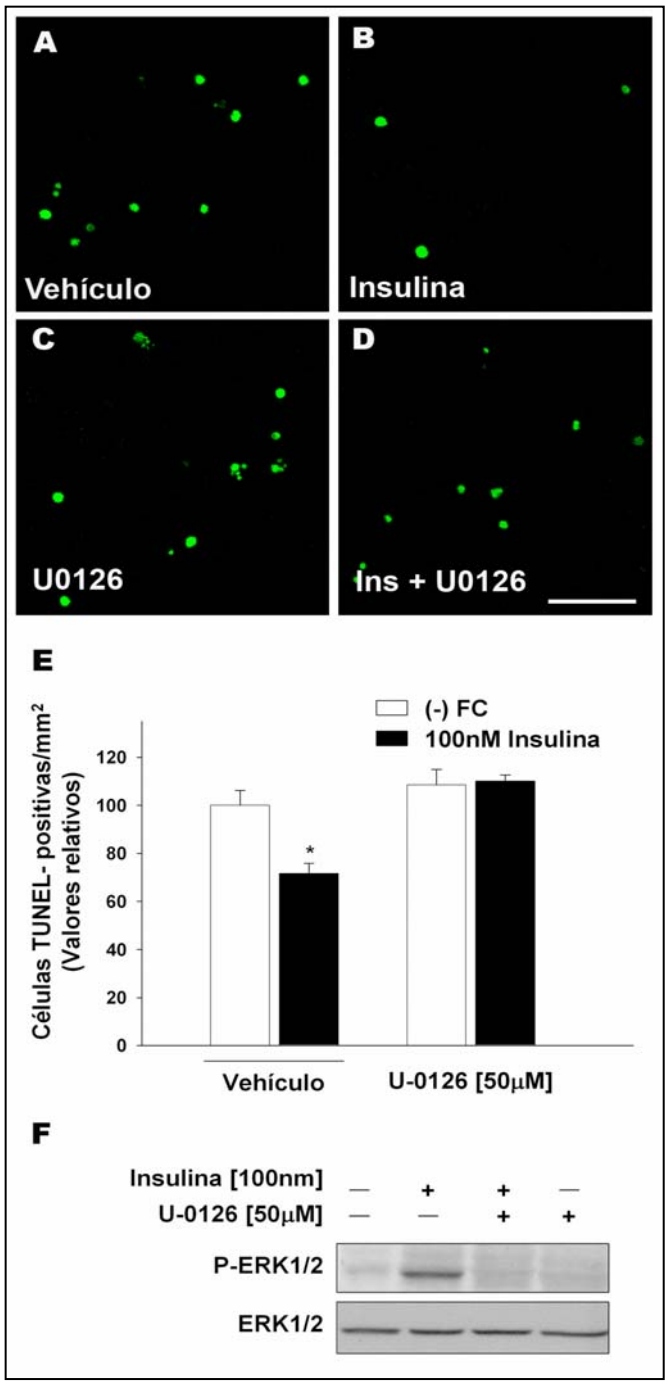


Figura 4.35. Señalización de supervivencia inducida por insulina a través de MEK-ERK en retinas de E5. Las retinas de E5 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de insulina y U-0126. Tras el cultivo, las retinas fueron procesadas para la técnica TUNEL (A-D), cuantificadas o procesadas para "western blot" con anticuerpos específicos contra P-ERK1/2 y ERK resultando una banda intermedia de 41kDa (F). Los valores en el panel (E) son relativos a la densidad de núcleos TUNEL-positivos del grupo (-FC) y representa la media ± E4.SM de 6-8 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas para un valor de ($p \leq 0.009$) en todos los grupos. El panel (F) muestra una membrana representativa de tres experimentos independientes. Barra = 50 μm.

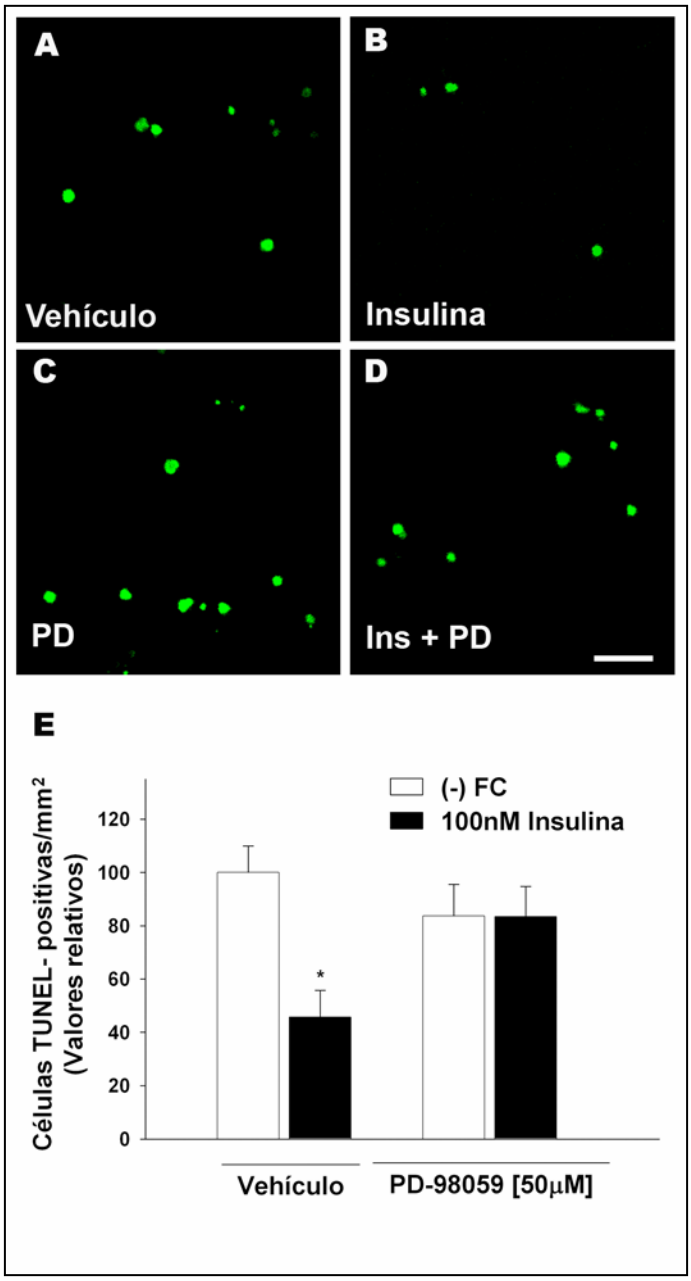


Figura 4.36. Señalización de supervivencia inducida por insulina a través de MEK-ERK en retinas de E5. Las retinas de E5 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de insulina y PD-98059. Tras el cultivo las retinas fueron procesadas para la técnica TUNEL (A-D) y cuantificadas según indicado en la figura 4.28. Los valores en el panel (E) son relativos a la densidad de núcleos TUNEL-positivos del grupo (-FC) y representa la media ± ESM de 6-8 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas para un valor de ($p \leq 0.0027$) en todos los grupos.
Barra = 50 μm.

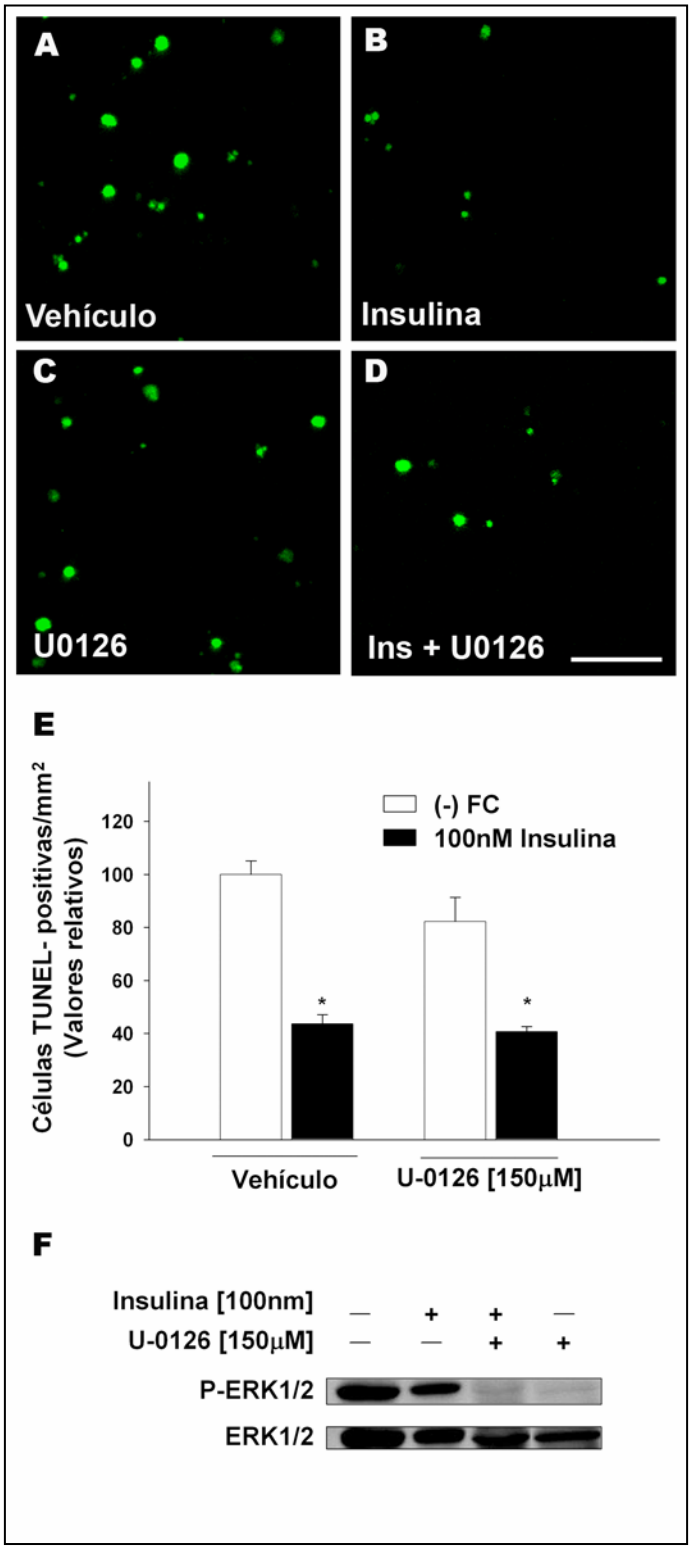


Figura 4.37. Señalización de la supervivencia inducida por insulina a mediada por ERK en retinas embrionarias de E9. Las retinas de E9 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de insulina 100nM y U-0126. Tras el cultivo las retinas fueron procesadas para la técnica TUNEL (A-D), cuantificadas según indicado en la figura 21 (E) o procesadas para "western blot" con anticuerpos específicos contra ERK1/2, resultando una banda intermedia de 41kDa (F). Los valores en el panel (E) son relativos a la densidad de núcleos TUNEL-positivos del grupo (-FC) y representa la media ± ESM de 6-8 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas para un valor de ($p \leq 0.009$) en todos los grupos. El panel (F) muestra una membrana representativa de tres experimentos independientes. Barra = 50 μm.

4.6.7 Efecto de la inhibición de las vías de supervivencia en los procesos de proliferación y diferenciación.

Quisimos comprobar si el bloqueo con los inhibidores de las vías de supervivencia inducidas por insulina producía cambios en los porcentajes de proliferación y diferenciación. Para ello, cultivamos las retinas de E5 y de E9 en presencia o ausencia del factor y los inhibidores U-0126 y Ly-294002, respectivamente, y calculamos los porcentajes de células apoptóticas (mediante marcaje con DAPI), proliferativas (BrdU-positivas) y diferenciadas (TUJ-1-positivas) en células disociadas del cultivo. Corroborando el efecto de los inhibidores visto previamente en retinas montadas en plano (Fig.4.34 E y 4.35 E), en las células disociadas la presencia tanto de U-0126 en E5, como de Ly-294002 en E9, impidieron el efecto antiapoptótico de la insulina (Fig.4.38 A y Fig.4.39 A). En cuanto a los porcentajes de proliferación y diferenciación, ni el inhibidor U-0126 en E5, ni el inhibidor Ly-294002 en E9, modificaron significativamente los porcentajes de células BrdU-positivas (Fig.4.38 B y Fig.4.39 B) y TUJ-1-positivas (Fig.4.38 C y Fig.4.39 C). Estos resultados nos permitieron inferir que la señalización diferencial que veíamos afectaba selectivamente al proceso de muerte celular.

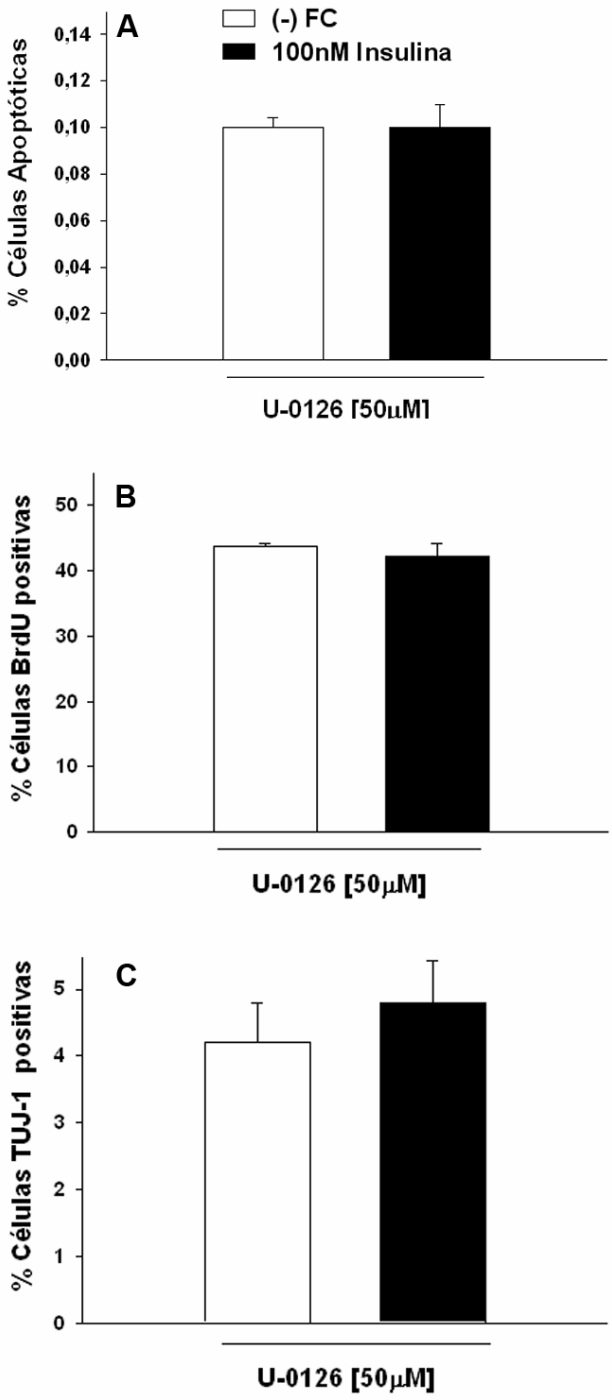


Figura 4.38. Implicación de MEK-ERK en los procesos de muerte celular, proliferación y diferenciación en retinas de E5. Las retinas de E5 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia insulina 100nM, el inhibidor U-0126 50 μM y BrdU 5 μM. Tras el cultivo, las retinas fueron disociadas y procesadas para la visualización y cuantificación de núcleos apoptóticos mediante tinción nuclear con DAPI (A), de núcleos proliferativos mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-BrdU (B) y de neuronas mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-TUJ-1 (C). Los valores son relativos al total de células contadas y representan la media ± ESM de cuatro retinas por grupo. No hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos para un valor de $p \leq 0.39$.

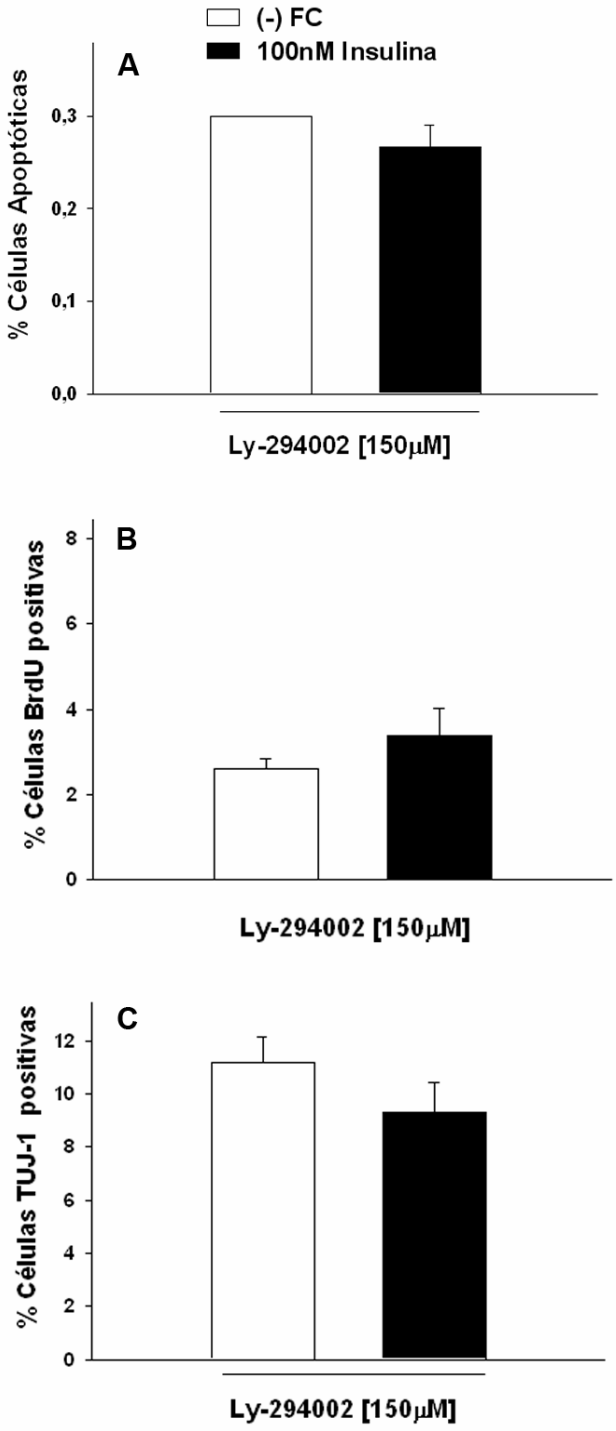


Figura 4.39. Implicación de PI3K-Akt en los procesos de muerte celular, proliferación y diferenciación en retinas de E9. Las retinas de E9 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia insulina, el inhibidor Ly-294002 y BrdU 5 μM. Tras el cultivo, las retinas fueron disociadas y procesadas para la cuantificación de núcleos apoptóticos mediante tinción nuclear con DAPI (A), de núcleos proliferativos mediante un anticuerpo anti-BrdU (B) y de neuronas mediante un anticuerpo anti-TUJ-1 (C). Los valores son relativos al total de células contadas y representan la media ± ESM de cuatro retinas por grupo. No hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos para un valor de $p \leq 0.41$.

4.6.8 Efecto de la activación de la vía de MEK-ERK inducida por insulina en retinas de E5.

La retina de E5 está formada por un neuroepitelio proliferativo, mientras que en la retina de E9 la proliferación prácticamente ha terminado y está formada por neuronas jóvenes y células de la glía (revisado por Adler, 2000 y Cepko, 2001). En la figura 4.40 se muestra la cuantificación realizada sobre secciones de retina desde E5 hasta E9 tras 12 horas de incorporación *in vivo* de BrdU (secciones realizadas y cuantificadas según el esquema detallado en material y métodos Fig.3.6).

Con los datos de esta cuantificación pudimos comprobar cómo a partir de E5 los niveles de proliferación disminuían de forma drástica. Nuestro siguiente objetivo fue buscar una correlación entre las vías de señalización y la abundancia de tipos celulares presentes en las retinas de E5 y E9. Para ello, cultivamos retinas de E5 durante 6 horas en presencia o ausencia de insulina 100 nM, del inhibidor de ERK, U-0126 50 μM, y de BrdU 5 μM. Tras los tratamientos, las retinas se procesaron siguiendo el protocolo de doble marcaje BrdU-TUNEL con el objeto de visualizar y cuantificar el número de núcleos proliferativos que estaban muriendo bajo los distintos tratamientos. En presencia de insulina hubo una disminución significativa ($p \leq 0,04$) del número de células proliferativas que estaban muriendo (BrdU-TUNEL-positivas) con respecto al cultivo en presencia de insulina y del inhibidor U-0126 o del inhibidor sólo (Fig.4.41 A-E). No encontramos, de nuevo, cambios significativos en el número de núcleos BrdU-positivos para ninguno de los tratamientos.

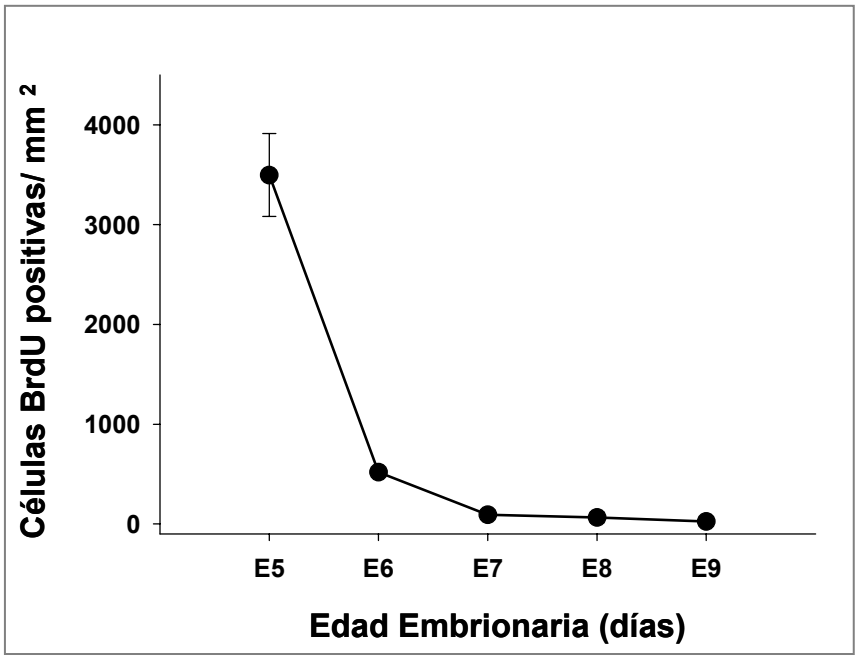


Figura 4.40. Perfil de proliferación de la retina embrionaria entre día E5 y E9 de desarrollo. Retinas desde E5 hasta E9 fueron marcadas *in vivo* con BrdU durante 12 horas y, posteriormente, procesadas para inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-BrdU. La curva presenta valores absolutos del número de núcleos BrdU-positivos en 4 secciones por retina embrionaria. Los valores corresponden a la media ± ESM de las cuantificaciones en 4 retinas independientes para cada edad.

Se realizó un ensayo paralelo *in vivo*, tratando los embriones de E5 con 25 μL de una solución de U-0126 100μM, y marcando las células con BrdU (2,5 μg/mL por huevo) con un tiempo de incubación de 6 horas (Fig.4.42 A-B). Observamos en las retinas de embriones tratadas con el inhibidor de ERK un mayor número de células proliferativas muriendo (núcleos doblemente marcados TUNEL-BrdU-positivos) en los cinco campos analizados alrededor de la retina central. No hubo sin embargo cambios significativos en las densidades de proliferación. Adicionalmente, la cuantificación de los núcleos BrdU-TUNEL-positivos (Fig.4.42 C) presentó diferencias significativas ($p \leq 0,01$) en retinas de embriones tratados con U-0126 con respecto a las retinas de embriones control.

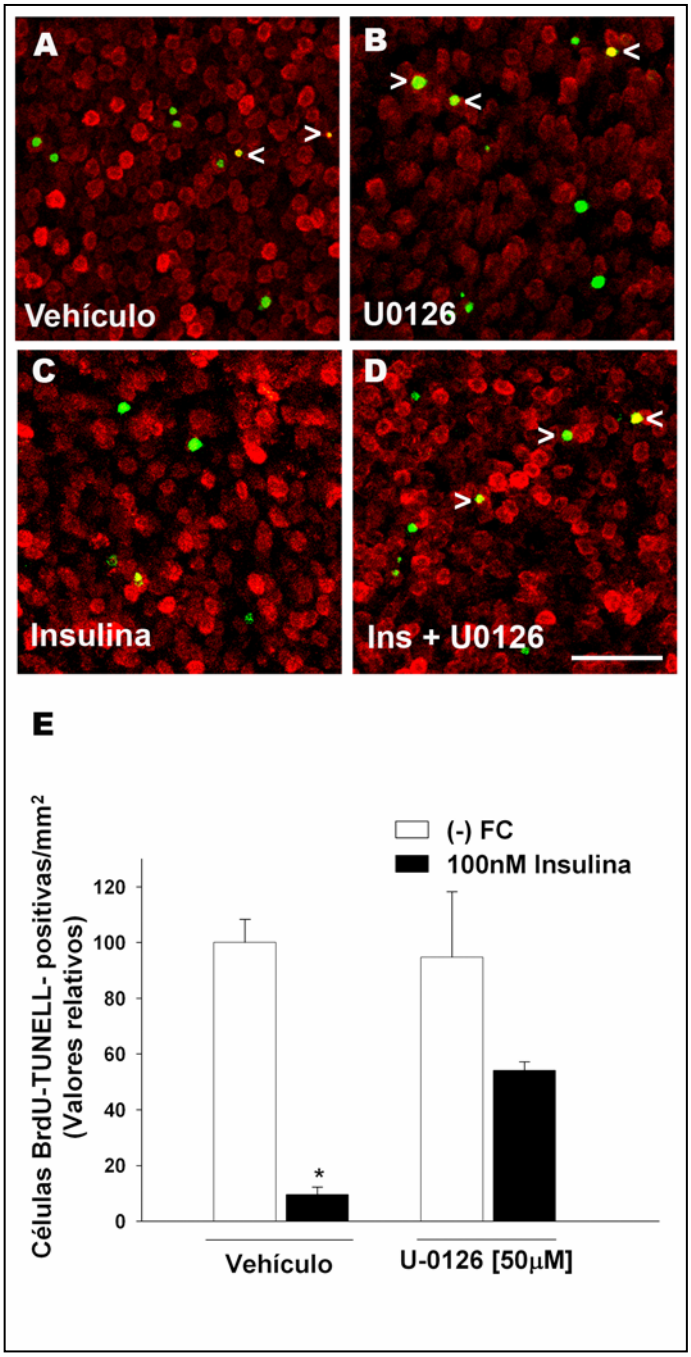


Figura 4.41. Atenuación de la muerte de células proliferativas por insulina mediada por MEK-ERK en cultivos organotípicos de retinas de E5. Las retinas de E5 se cultivaron durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de insulina y U-0126, así como de BrdU 5 μM. Tras el cultivo, las retinas fueron procesadas para el doble marcaje TUNEL-BrdU (A-D), cuantificadas según indicado en la figura 4.27 (E). Los valores en el panel (E) son relativos a la densidad de núcleos BrdU-TUNEL-positivos del grupo (-FC) y representa la media ± ESM de 3-4 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas para un valor de p≤0.04 en todos los grupos respecto a (-FC). Barra = 50 μm.

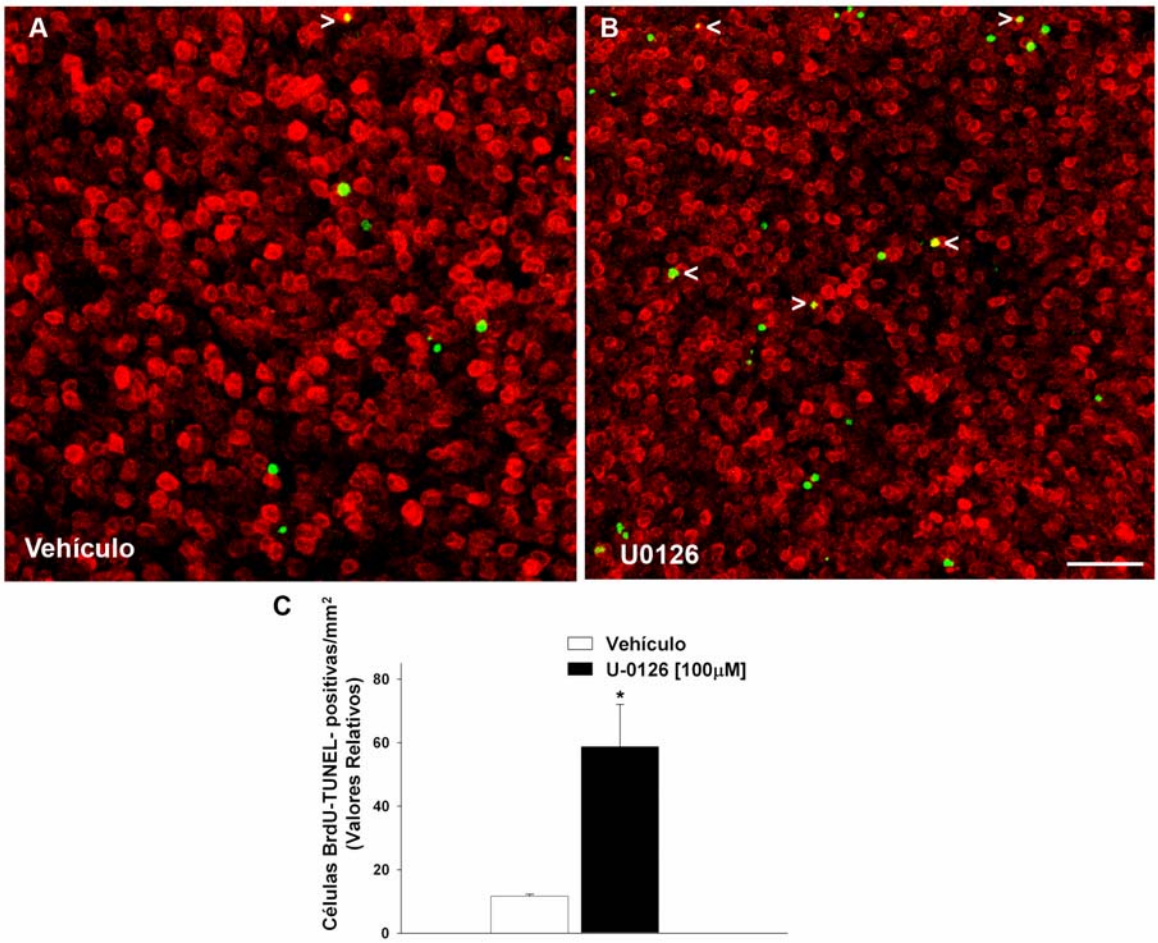


Figura 4.42. Atenuación de la muerte de células proliferativas mediada por MEK-ERK en retinas *in vivo* de E5. Las retinas de E5 fueron marcadas *in ovo* durante 6 horas con BrdU 5 μM y tratadas con 25 μL de U-0126 100μM. Tras el periodo de incubación, fueron procesadas para la doble inmunohistoquímica BrdU-TUNEL (A y B) y cuantificadas según indicado en la figura 4.27. Los valores en el panel (C) representan la media ± ESM de 2-3 retinas cultivadas independientemente por grupo. El asterisco representa diferencias significativas con un valor de p≤0.01 en todos los grupos respecto a "Vehículo". Barra = 50 μm.

En retinas de E5 tanto cultivadas como en los experimentos *in vivo*, el tratamiento con el inhibidor de MEK-ERK durante 6 horas, indujo el aumento del número de núcleos doblemente marcados TUNEL-BrdU positivos. Esto resultados nos estaban indicando que la presencia de factor inducía el mecanismo de supervivencia de una población de precursores proliferativos en retinas de dicho estadio.

4.6.9 Las ceramidas y el factor $NF_{\kappa}B$ actúan como inductores de muerte.

Además de la búsqueda de posibles mecanismos de supervivencia celular mediados por la insulina, estudiamos la implicación de otras vías que, según la bibliografía disponible, podrían tener un papel regulador dentro del sistema nervioso. Las vías exploradas preliminarmente fueron la del factor de transcripción NFκB y la de las ceramidas. El NFκB es una proteína que actúa como factor de transcripción y que, aunque tradicionalmente se activa durante procesos inflamatorios, también se ha visto que juega un papel relevante en la activación de genes anti-apoptóticos en neuronas. Las ceramidas son moléculas centrales en el metabolismo de los esfingolípidos que actúan como segundos mensajeros y pueden producir un aumento de apoptosis en diversos sistemas.

Para comprobar la implicación de NFκB, cultivamos retinas de E5 en un medio definido carente de factores de crecimiento y en presencia de insulina 100 nM, el inhibidor comercial de NFκB, SN50, y el inhibidor de NFκB mutado, SN50-M, como control de inhibición. Previo al cultivo de 6 horas en presencia o ausencia de insulina, las retinas fueron preincubadas con el inhibidor SN50 y SN50-M durante 3 horas. De esta forma nos aseguramos que hubiera transcurrido el tiempo necesario para que se produjera la translocación del factor al núcleo. En el tratamiento en presencia de insulina y el inhibidor SN50 hubo una disminución significativa e idéntica al tratamiento de insulina (Fig.4.43). El tratamiento con el inhibidor en ausencia de factores también indujo una disminución en las densidades de núcleos picnóticos. Los valores obtenidos con el inhibidor mutado (no presentados en la gráfica), indicaron que el inhibidor estaba actuando correctamente. La disminución de la MCP en presencia del inhibidor nos estaba indicando, por lo tanto, que el factor NFκB actuaba en realidad como inductor de muerte en retinas de E5.

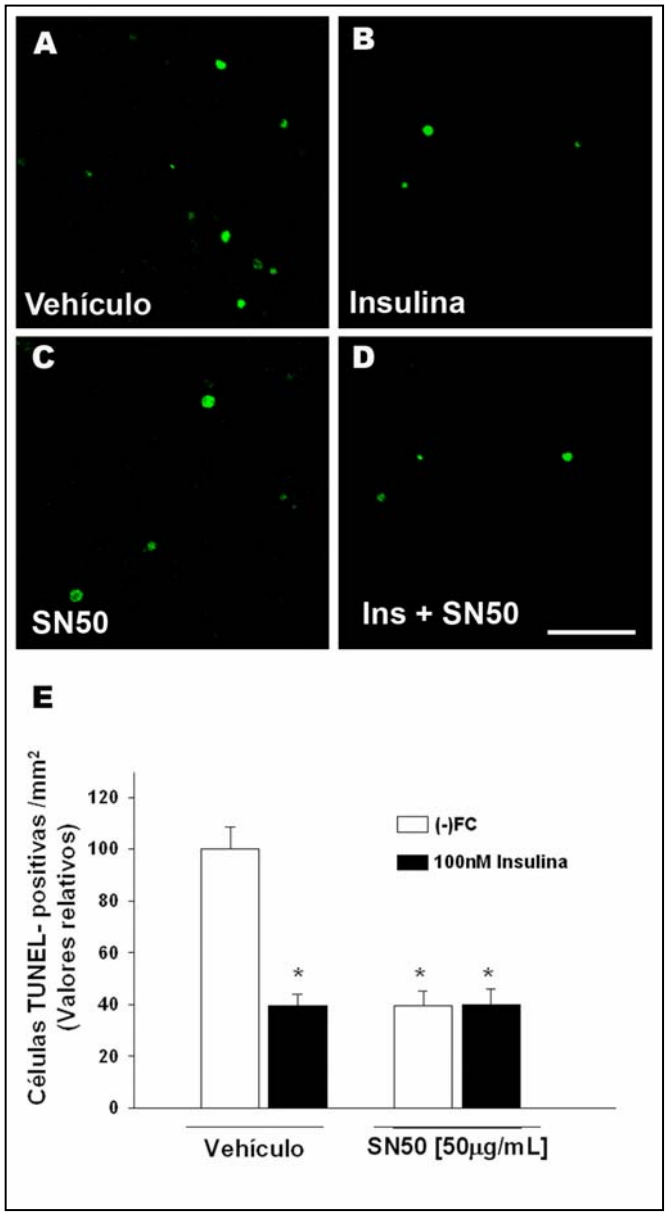


Fig. 4.43. NFκB tiene un papel inductor de muerte celular en retinas de E5. MCP en retinas de E5 preincubadas durante 3 horas con el inhibidor de la translocación al núcleo de NF_KB, SN50 50 μg/mL, y tratadas posteriormente 6 horas en presencia y ausencia de insulina 100nM. Los resultados muestran la densidad relativa del Nº de células TUNEL positivas con respecto a la condición (-FC). Los valores representan la media ± ESM de 8 retinas cultivadas independientemente por tratamiento. Diferencias significativas con respecto al control (-) FC para un valor de p≤0,001. Barra = 50 μm.

En cuanto a la vía de señalización a través de las ceramidas, quisimos comprobar si el tratamiento con el análogo ceramida-2 inducía algún tipo de respuesta en los niveles de muerte celular de las retinas de E5. Para ello se probaron concentraciones crecientes del compuesto (2, 5 y 10 μM). El efecto y la cuantificación de la densidad del número de núcleos picnóticos para los distintos tratamientos se muestra en la figura 4.44. En las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de la región central de la retina se pudo comprobar que las concentraciones bajas de de Cer-2 (2 y 5 μM) tenían un efecto inductor de muerte en dicha región (Fig.4.44 A).

La cuantificación de esta área en los cinco campos alrededor de la fisura óptica (Fig.4.44 B) mostró un aumento significativo de las MCP (medida como el número de núcleos TUNEL-positivos/mm^2), para los tratamientos con 2 y 5 μM de Cer-2. La concentración 10 μM no produjo un aumento de la densidad de núcleos TUNEL-positivos con respecto al control. Las ceramidas por tanto parecen actúan como inductoras de MCP en retinas de E5 de una manera dosis dependiente.

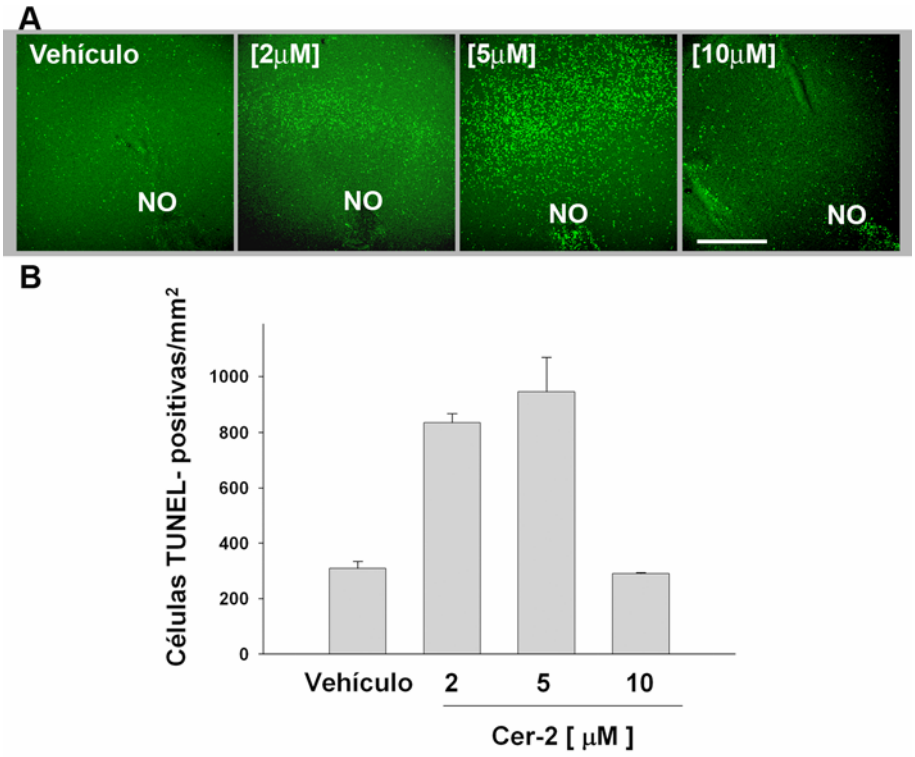


Fig. 4.44. Las ceramidas tienen un efecto inductor de muerte en retinas de E5. Retinas de E5 fueron cultivadas durante 6 horas en un medio definido carente de factores y en presencia de las concentraciones indicadas de ceramida 2-fosfato. Tras el tratamiento, fueron procesadas para la técnica TUNEL (A) y cuantificadas siguiendo las indicaciones de la figura 4.26. Las gráficas muestran el número absoluto de células TUNEL-positivas en el área de cuantificación. Los valores representan la media ≤ ESM de 6-8 retinas cultivadas independientemente. Los asteriscos corresponden a diferencias significativas con respecto al tratamiento (vehículo) para un valor de p≤0.05. Barra = 150 μm. NO, nervio óptico.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El trabajo aquí expuesto ha suministrado nuevas evidencias sobre la incidencia y la regulación de los procesos de MCP que acontecen de forma fisiológica en estadios tempranos del desarrollo del SNC de vertebrados empleando, en concreto, como sistema modelo la retina embrionaria de pollo. La descripción de la incidencia y la magnitud del proceso de MCP a lo largo de todo el desarrollo embrionario de la retina, la caracterización de las poblaciones afectadas y el estudio de los mecanismos que regulan el balance de señales pro- y anti-apoptóticas, claramente soportan la relevancia de este proceso fisiológico, poco caracterizado, que ocurre durante la neurogénesis.

5.1. Muerte celular programada durante el desarrollo de la neurorretina embrionaria de pollo.

La MCP es un proceso fisiológico que, durante el desarrollo, contribuye a la elaboración de la citoarquitectura y la conectividad del sistema nervioso (de la Rosa y de Pablo, 2000; Kuan *et al.,* 2000; Davies, 2003; Lossi y Merighi, 2003; Yeo y Gautier, 2004; Boya y de la Rosa, 2005; Buss *et al.,* 2006). La neurorretina de vertebrados, como parte del SNC, sufre varias fases de muerte celular durante su desarrollo. La más ampliamente estudiada y mejor caracterizada es la fase que tiene lugar en etapas tardías, asociada a la sinaptogénesis y conectividad neuronal, y que responde a los postulados de la Teoría Neurotrófica (Cook et al, 1998; Cole y Ross, 2001; Francisco-Morcillo *et al.,* 2004; Candal *et al.,* 2005). Varios autores, entre ellos nuestro grupo, han puesto en evidencia fases previas de MCP. La primera fase ocurre en etapas muy tempranas y está asociada a la morfogénesis de la vesícula y copa ópticas (Strongin y Guillery, 1981; Garcia-Porrero *et al.,* 1984; Navascués, 1989; Cole y Ross, 2001;

Trousse *et al.,* 2001; Candal *et al.,* 2005). Una fase posterior aparece asociada a la neurogénesis (Silver y Sapiro, 1981; Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido *et al.,* 1988; Marín-Teva *et al.,* 1999; Díaz *et al.,* 2000; Mayordomo *et al.,* 2003). Ambas fases tempranas están mucho menos definidas en términos de regulación, de poblaciones afectadas y de significado funcional que la fase tardía.

En el presente trabajo hemos profundizado en la caracterización del proceso de MCP cubriendo prácticamente todo el desarrollo embrionario de la retina de pollo. Esto incluye, en primer lugar, las etapas de mayor proliferación de la retina, en la que se suceden los cambios morfogenéticos que dan lugar a la formación de la copa óptica (estadios HH17 y HH18) (figuras 4.1, 4.2 y 4.3), cuando la neurogénesis aún no ha comenzado o está muy incipiente. Demostramos, además, la presencia de núcleos apoptóticos en los estadios iniciales de la neurogénesis, desde HH19 (E3) hasta HH23 (E 3,5), estadios en los que no sólo se ha iniciado la diferenciación de las primeras neuronas ganglionares, sino que éstas comienzan a proyectar sus axones a través del tallo óptico. La muerte encontrada en estos estadios correspondería con una segunda fase de muerte en la retina asociada a la neurogénesis (Silver y Sapiro, 1981; Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido *et al.,* 1988; Marín-Teva *et al.,* 1999; Díaz *et al.,* 2000; Mayordomo *et al.,* 2003). Esta fase se prolonga durante estadios donde coexisten proliferación y diferenciación (E4-E5) y, tras una claro periodo de muy baja muerte detectable (E6-E8; Figs.4.26 y 4.27) vuelve a aumentar la incidencia de MCP en estadios de baja proliferación en los que la retina va adquiriendo su citoarquitectura definitiva y estructurándose en sus diferentes capas (E8-E12), así como en estadios en los que comienzan a establecerse las primeras conexiones sinápticas (E12-E13) y aquellos en los que ya es posible una respuesta eléctrica de los fotorreceptores a la estimulación por luz (E17) (Mey y Thanos, 2000). La mayor densidad de muerte en los estadios más avanzados corresponde al periodo entre E9 y E15 (Fig.4.26 F-J y Fig.4.27 B). Un análisis más detallado de este periodo muestra una distribución de muerte específica en las diferentes capas de la retina. Inicialmente la muerte está

restringida a la capa de ganglionares (Fig.4.26 y 4.27 B) con un pico de muerte alrededor de E9. Otros trabajos muestran este mismo pico algo retrasado (E10-11 en Cook *et al.,* 1998; E13-E14 en Rager y Rager, 1979). No obstante, hay que tener en cuenta que nuestros datos están referidos únicamente a secciones de la región más central de la retina y no son datos absolutos de todo el neuroepitelio (ver apartado de materiales y métodos 3.7.1.2 y Fig.3.6). Debido a que en la retina los procesos de muerte, diferenciación y proliferación presentan un patrón de progresión centro-periférico (apartados 4.1, 4.2, y 4.3 de resultados) no es de extrañar que la datación del pico de muerte dependa de la aproximación experimental. En estadios posteriores, la MCP afecta a neuronas de la CNI (Hughes y La Velle, 1975; Hughes y McLoon, 1979; Cook *et al.,* 1998) y, de forma dispersa y escasa, a fotorreceptores de la CNE en total concordancia con otros trabajos en vertebrados previamente publicados (Biehlmaier *et al.,* 2001; Pequignot *et al.,* 2003; Francisco-Morcillo *et al.,* 2004; Candal *et al.,* 2005;). Las fases de muerte tardía pueden relacionarse con diferentes procesos que transcurren en el desarrollo. La muerte de células en la capa de ganglionares está asociada con los procesos de conectividad neuronal postulados por la *Teoría Neurotrófica*. Las neuronas que proyectan sobre los tejidos diana, incapaces de acceder a su factor trófico producido en una cantidad limitante, acaban entrando en el proceso de muerte programada (Oppenheim, 1991; Cole y Ross, 2001; Francisco-Morcillo *et al.,* 2004; Candal *et al.,* 2005). Por el contrario, no existe un postulado similar que explique la base fisiológica de la muerte temprana.

En resumen, el proceso de MCP coexiste tanto con los procesos de conectividad neuronal y sinaptogénesis que ocurren en la retina, como está ampliamente documentado, como con los cambios morfogenéticos y con los procesos de neurogénesis temprana, siendo, en el caso de la retina de embrión de pollo, superior la densidad de células TUNEL-positivas durante las fases tempranas de muerte (Fig. 4.27). La densidad relativa de células muriendo en E4 es superior que la muerte que acontece en cualquier otra fase de muerte más tardía, confirmando de

forma cuantitativa que la MCP temprana es un proceso relevante que ocurre de forma fisiológica en el desarrollo temprano (de Pablo y de la Rosa, 2000; Boya y de la Rosa, 2005).

5.2. Poblaciones celulares afectadas por muerte celular programada.

La muerte en retina embrionaria de pollo ya estaba descrita desde el estadio HH14 (48 horas), previa a la invaginación de la copa óptica (Martín-Partido *et al.,* 1989; Mayordomo *et al.,* 2003). En la figura 4.1 se muestran imágenes de la distribución de la MCP que afectan a la retina neural del embrión de pollo en los estadios más tempranos del desarrollo embrionario que hemos abordado. En retinas montadas en plano de HH18 (Fig.4.1 B) y HH19 (Fig.4.6 B) también localizamos una distribución de núcleos apoptóticos asociados a la región central de la retina, donde se localiza el tallo óptico. Estas observaciones se corresponden con los estudios previos de localización de MCP (Martín-Partido *et al.,* 1988). Adicionalmente, en las retinas entre HH18 y HH19 se localizaron núcleos TUNEL-positivos en la región dorsal de la copa óptica (Fig.4.6B), que coinciden con el área de células muriendo que había sido descrita previamente entre los estadios de HH15 y HH18 (García-Porrero *et al.,* 1984; Hirata y Hall, 2000). Los experimentos realizados mediante la incorporación de BrdU en retinas de HH19 (apartado 4.4 de resultados), nos han permitido demostrar que un porcentaje importante de las células en proceso de muerte corresponden a una población de precursores proliferativos. Esta población se localiza tanto en la región dorsal de la retina como en la zona central de la misma (Fig.4.10). El hecho de que el porcentaje de núcleos BrdU-TUNEL-positivos no varíe entre los dos tiempos de incubación (3 y 9 horas) posteriores al cierre de la ventana de incorporación de BrdU (Fig.4.11) nos sugiere que hay una proporción de células proliferativas destinada a

morir y que lo hace de una forma relativamente constante. Esto concuerda con la idea de que la muerte celular en estas áreas de la retina para estos estadios es un proceso programado y que, además, ocurre independientemente de que se produzca la formación de la copa óptica, tal y como demostraron en su momento los experimentos de inhibición de la invaginación de la vesícula óptica con papaverina (Garcia-Porrero *et al.,* 1987). El mismo experimento de incorporación de BrdU realizado sobre retinas de HH21 nos indica que en un estadio de desarrollo más avanzado, la población de células marcadas que mueren tras 9 horas de incubación es el doble que a 3 horas (Fig.4.14). En otras palabras, las células que incorporaron BrdU durante la ventana de marcaje, incrementan su probabilidad de entrar en el programa de muerte al alejarse de la fase S. Este aumento de muerte de precursores a medida que avanza el desarrollo podría estar afectando a las poblaciones proliferativas según inician su proceso de diferenciación, que comienza a partir de HH19 (E2). Podría tratarse tanto de un posible ajuste en el número de precursores proliferativos como de un mecanismo de control de las neuronas recién diferenciadas.

En nuestro estudio hemos demostrado la presencia en la retina de neuronas jóvenes muriendo (células TUJ-1-TUNEL-positivas, apartado 4.4.2 de resultados y Fig.4.15.). Son varios los trabajos de nuestro grupo (Mayordomo *et al.,* 2003, Díaz *et al.,* 2000) que sugieren que el proceso de muerte temprana afecta a una población de neuronas recién diferenciadas, pero todavía no se ha conseguido una cuantificación directa del proceso ni la demostración de que pudiera tener una relevancia funcional. Esto es debido, entre otras razones, a la dificultad que tiene aislar y detectar a una población de células sufriendo procesos tan dinámicos como la mitosis, la diferenciación y la MCP. Basándonos en los datos de incorporación de BrdU del presente trabajo hemos estimado que, en los estadios analizados entre HH19 y HH21, el ciclo de las células tiene una duración de unas 6,4 horas (duración ciclo = cociente entre la fracción proliferativa y el flujo celular por fase S) (Tesis Doctoral de la Dra. Begoña Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, 1999). La duración de la fase S es de

tan sólo 1-2 horas. En mamíferos, la duración del proceso de MCP de neuronas de la retina es de apenas 1 hora, periodo tras el cual las células pierden su capacidad de adhesión y migran de forma aleatoria (Cellerino *et al.,* 2000). En aves, la muerte de células neuroepiteliales en el área de la retina donde se forma el nervio óptico coincide con la presencia espacial y temporal de macrófagos que fagocitan células muertas y restos celulares (Moujahid *et al.,* 1996). Por tanto, podríamos estimar que en la retina, el proceso de muerte y posterior fagocitosis de las células apoptóticas transcurre entre 1-3 horas. Nuestros experimentos demuestran que entre HH19 y HH21 salen de ciclo aproximadamente 25 células por hora (Fig. 4.7), transcurriendo tan solo unas 4 horas de diferencia entre ambos estadios. No obstante resulta un tanto complicado cuantificar mediante TUNEL, un número estadísticamente significativo de células que acaban de salir de ciclo y estén muriendo, antes de ser fagocitadas por macrófagos y células vecinas en un entorno tan dinámico.

En un intento de aproximación más concreto, nos propusimos cuantificar variaciones en el número de células BrdU-TUJ-1 positivas entre las 3 y 9 horas posteriores al periodo de marcaje en ventana con BrdU. Nuestros resultados demuestran una tendencia a la disminución del número de células doblemente marcadas (Tabla 4.4), pudiendo indicar que esta desaparición se debe a la entrada en el programa de muerte. La poca significación estadística del proceso pudiera deberse de nuevo, al escaso número de células encontrado en cada retina en estas condiciones. Presumiblemente, en un estadio más avanzado, como HH23, la cuantificación de células que han acabado su último ciclo de división y se están diferenciando sea mayor y, por tanto, la estadística más significativa. No obstante, además de la relevancia cuantitativa que pudiera tener la muerte de neuronas recién diferenciadas, debemos preguntarnos acerca de su relevancia funcional. Son muchos los estudios que relacionan la MCP temprana con la neurogénesis. Yeo y Gautier (2005) en sus estudios de Xenopus proponen una dependencia entre la MCP y la neurogénesis temprana. En sus estudios comprobaron que la sobre-expresión del

factor neurogénico XNGNR1 inducía un aumento de muerte. De esta forma han propuesto la MCP como mecanismo de eliminación de aquellas células que estuvieran expresando niveles altos del factor, lo que resultaría en una diferenciación prematura. En nuestro laboratorio la interferencia *in ovo* con inhibidores de caspasas disminuye la MCP en un 50% y aumenta el tamaño del árbol axónico y el número de neuronas Islet-positivas (Mayordomo *et al.,* 2003). No obstante no se han observado cambios sustanciales en la proliferación y en la morfología de las retinas tratadas. Esto descartaría una función exclusiva de ajuste del número de células dentro de la retina. Una posible hipótesis funcional de la muerte de esta población de células se podría establecer a nivel de los procesos que determinan el destino final de las neuronas recién diferenciadas. El destino final de los progenitores neurales no se alcanza hasta que éstos han llevado a cabo su última mitosis (Belecky-Adams *et al.,* 1996) y, aún así, parece que es posible que retengan su capacidad de diferenciarse a neuronas o a fotorreceptores en estadios tempranos (Adler y Hatlee, 1989). Una de las posibles señales que determinarían el destino final de las neuronas jóvenes podría tener como resultado la activación del proceso de muerte. Otra alternativa más especulativa sería que la diversidad morfológica y funcional presente en las células del sistema nervioso implicase cambios genéticos (de la Rosa y De Pablo, 2000; Boya y de la Rosa, 2005). Así, durante la última mitosis, el precursor neural podría sufrir procesos de rotura de doble banda en el ADN que deberán ser reparados por la maquinaria enzimática presente en todas las células para tal fin. Un fallo en dicha reparación provocaría la entrada dentro del programa de muerte celular. Con esta hipótesis, se estaría asociando el proceso de MCP a un fallo en la maquinaria de reparación de roturas. De hecho, numerosos ratones mutantes en enzimas de reparación presentan pérdidas masivas de precursores neurales (ver referencias en Boya y de la Rosa, 2005).

5.3. La insulina como factor de supervivencia y sus vías de señalización en el desarrollo temprano de la retina neural

La MCP es un proceso controlado por un fino balance entre señales pro-supervivencia y pro-muerte, que interactúan tanto a nivel intra- como extra-celular con el objeto de definir el destino final de las células (Strasser *et al.,* 2000; Joza *et al.,* 2002; Danial y Korsmeyer, 2004). Son múltiples los mecanismos de ejecución del proceso de muerte, la mayoría de ellos, mediados por las caspasas. No obstante existen otros mecanismos de ejecución independientes de caspasas, tales como las catepsinas, las calpaínas o la granzima A y B (Leist y Jaattela., 2001a). Entre los factores de supervivencia descritos dentro del sistema nervioso, la insulina y otros factores dentro de la familia (especialmente el IGF-I) se han descrito como factores neuroprotectores en el desarrollo embrionario (De Pablo and de la Rosa, 1995; Varela-Nieto *et al.,* 2003).

La presencia de precursores neuroepiteliales proliferativos y neuronas en proceso de muerte en las etapas tempranas del desarrollo de la retina nos llevó a plantearnos también el estudio de los mecanismos de señalización que los regulan, de nuevo un aspecto mucho menos estudiado que en la muerte neuronal más tardía. En el presente trabajo, abordamos el estudio de los mecanismos de señalización que acontecen en dos etapas concretas del desarrollo, correspondientes a una fase de muerte temprana (E5) y a otra fase de muerte más tardía (E9). En la retina embrionaria de pollo de E5, la muerte afecta principalmente a células neuroepiteliales proliferativas y a neuroblastos recién diferenciados, tal como hemos discutido en el apartado anterior del presente trabajo (Díaz *et al.,* 2000; Pimentel *et al.,* 2000; Mayordomo *et al.,* 2003). En E9, la proliferación es un proceso minoritario, la generación de células ganglionares está prácticamente concluida y este tipo celular se encuentra en su pico de muerte Neurotrófica (presente trabajo, Prada *et al.,* 1991;

Bahr, 2000; Vecino *et al.,* 2004). En ambos estadios, la inhibición de caspasas y catepsinas bloquea la muerte inducida por la ausencia de factores (Fig.4.29). La implicación de ambos tipos de proteasas en el proceso sugiere la necesidad de una red muy robusta de ejecutores para llevar a cabo el proceso de MCP. Una situación parecida se ha podido encontrar en la retina embrionaria de ratón (Duenker *et al.,* 2005; Valenciano *et al.,* 2006). La implicación de las caspasas en la muerte celular temprana de la retina concuerda con los patrones de expresión de estas proteasas y sus funciones como efectoras de muerte durante el desarrollo de la retina (Kojima *et al.,* 1998; Donovan y Cotter, 2002; Mayordomo *et al.,* 2003). Cada vez son más los estudios que demuestran, además, la activación de mecanismos efectores de muerte independientes de caspasas (Leist y Jaattela, 2001b; Jaattela y Tschopp, 2003; Chwieralski *et al.,* 2006). Se ha demostrado la presencia de catepsinas en la retina adulta de mamíferos (Bernstein et la., 1989; Koike *et al.,* 2003; Wasselius *et al.,* 2003). La atrofia cerebral que presentan los ratones dobles mutantes para la catepsina B y la catepsina L también indica el papel relevante de las catepsinas dentro del sistema nervioso.

Por su parte, la insulina y su precursor proinsulina, se expresan de manera endógena a lo largo del desarrollo embrionario de la retina de pollo y ratón. Además, ambas proteínas son capaces de atenuar la MCP inducida por la ausencia de factores en cultivos organotípicos de retinas embrionarias. En nuestro trabajo, la insulina a concentración 100 nM y como único factor añadido al medio de cultivo (Fig.4.30 B y D) es capaz de rescatar toda la muerte inducida por la carencia de factores en las dos edades embrionarias estudiadas E5 y E9. Empleando cultivos organotípicos de E5 y E9, hemos estudiado las vías de señalización inducidas por insulina en ambas edades. En el estadio de mayor diferenciación neuronal, E9, el efecto de supervivencia mediado por la insulina fue claramente dependiente de la vía PI3K-Akt (Fig.4.34). Sin embargo, en el estadio de mayor proliferación, E5, la principal vía activada y responsable de mediar la supervivencia resultó ser la de MEK-ERK (Fig.4.33). PI3K-

Akt constituye la vía canónica de activación en los procesos de supervivencia inducidos por insulina y otros factores de la familia (Campana *et al.,* 1999; Gleichmann *et al.,* 2000; Varela Nieto *et al.,* 2003), aunque no está muy claro que esta activación esté implicada en los procesos de muerte celular temprana. A través de la activación de PI3K, tanto el IGF-I como la insulina previenen la muerte celular por ausencia de factores en retina embrionaria de ratón, células amacrinas de rata y en la línea de células de la retina R28 (Barber *et al.,* 2001; Polito *et al.,* 2001; Valenciano *et al.,* 2006). La activación del receptor de insulina también activa la vía de señalización MEK-ERK (Boulton *et al.,* 1991; White, 1998). Esta familia de quinasas tiene un papel bien demostrado en la regulación de procesos de proliferación y diferenciación y son cada vez más los estudios que las relacionan con los procesos de muerte (Johnson y Lapadat, 2002; Wada y Penninger, 2004; Cheung y Slack, 2004). En contraste con muchos estudios que demuestran que, en el sistema nervioso, los factores de la familia de la insulina previenen la apoptosis vía activación de PI3K (Varela-Nieto., 2003), tan sólo unos pocos atribuyen un papel a IGF-I en la mediación de la supervivencia a través de la activación de ERK (Subramaniam *et al.,* 2005; Willaime-Morawek *et al.,* 2005).

La activación de dos vías en dos edades diferentes podría estar asociada a la presencia de receptores atípicos, híbridos entre el receptor de insulina y el receptor de IGF-I, tal y como se ha descrito previamente (García de Lacoba *et al.,* 1999). La presencia de estos receptores implicaría, a su vez, diferentes afinidades por los factores de la familia. A medida que transcurre el desarrollo, la proporción de receptores híbridos disminuye, siendo sustituidos por los receptores clásicos de insulina e IGF-I (García de Lacoba *et al.,* 1999). Así, en el estadio más temprano, E5, se podría estar dando la situación de mayor abundancia de receptores híbridos capaces de unir de forma indiscriminada cualquier factor perteneciente a la familia y activando vías de supervivencia alternativas. En E9, la señalización se realizaría a través del receptor clásico que activaría la vía clásica de supervivencia. Citoquinas

como los FGF's y el CNTF, también muestran especificidades diferenciales en sus mecanismos señalización en función del estadio de desarrollo de la retina (Kinkl *et al.,* 2002; Rhee y Yang, 2003). Así como es conocida la capacidad de la insulina y el IGF-I de inducir proliferación o diferenciación en función del tipo celular durante la neurogénesis (revisado por Bateman y McNeill, 2006), en la retina del embrión de pollo estaríamos ante vías de señalización regulando en dos estadios diferentes un proceso crucial para el desarrollo de los organismos: la supervivencia celular.

La caracterización de las poblaciones celulares implicadas en el proceso de muerte en E5, demuestra que la insulina es capaz de rescatar de la muerte células proliferativas vía ERK. Este resultado concuerda con la protección de la muerte inducida por ceramidas en neuronas corticales de ratón a través de la co-activación de ERK y PI3K mediada por IGF-I. (Williame-Morawek *et al.,* 2005). De manera contraria, IGF-I previene la apoptosis de neuronas granulares de cerebro a través de la inhibición de la fosforilación de ERK (Subramaniam *et al.,* 2005). Aunque el tema resulta controvertido, las diferencias en la duración, activación y compartimentalización celular de ERK pueden traducirse en variaciones de los mecanismos de señalización que generan finalmente respuestas celulares diferentes (Ebisuya *et al.,* 2005). Esto explica de alguna manera cómo la activación de una misma proteína quinasa puede dar lugar a comportamientos diferentes.

Nuestros resultados revelan que un mismo proceso, la MCP, está regulado de forma diferencial por un mismo factor en dos momentos concretos del desarrollo. Este hecho no solo desentraña aspectos acerca de la complejidad de los mecanismos que regulan la MCP durante el desarrollo de la retina neural, sino que ponen de manifiesto la necesidad de emplear tejidos primarios para validar las vías de señalización identificadas en sistemas mucho menos fisiológicos.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

6.1. La incidencia y distribución de la MCP durante el desarrollo embrionario de la retina de pollo sigue patrones espaciales y temporales específicos. Así, en estadios tempranos encontramos una mayor incidencia de MCP en la región central de la retina con un pico de células TUNEL-positivas entre E3,5 y E4. En los estadios más tardíos, la muerte afecta sucesivamente a neuronas localizadas en las diferentes capas de la retina, encontrando un pico de MCP en la capa de células ganglionares en E9 y en la capa nuclear interna en E11.

6.2. Las curvas de densidad de proliferación (isopro) durante las etapas tempranas del desarrollo de la retina embrionaria de pollo presentan un gradiente centro-periférico, siendo la edad de mayor incidencia analizada el estadio HH19. A partir del estadio HH21 la proliferación comienza a disminuir de forma progresiva.

6.3. Las curvas de densidad de diferenciación (isoislet) muestran, en los estadios tempranos analizados, gradientes centro-periférico y naso-temporal, así como una acumulación de neuronas diferenciadas a medida que avanza el desarrollo.

6.4. La MCP temprana afecta a una población de precursores proliferativos en el estadio de copa óptica (HH19-HH21), cuando ya se ha iniciado la neurogénesis. Durante el estadio de HH19 mueren células proliferativas localizadas en la región central y en la región dorsal de la retina, mientras que en el estadio de HH21 la proporción de muerte se mantiene pero su localización se desplaza hacia la región central de la retina.

6.5. En el estadio de HH21 la MCP empieza a afectar sensiblemente a la población de neuronas jóvenes TUJ-1-positivas. Dicha muerte afecta aproximadamente a un 3,5% de las células TUJ-1-positivas.

6.6. La MCP temprana en el estadio de HH21 afecta selectivamente a la población de neuronas recién diferenciadas que acaban de terminar su último ciclo de división (TUJ-1-BrdU-positiva). Así, durante este estadio la población de células doblemente marcadas disminuye de un 61% a 15% en 6 horas de incubación.

6.7. La insulina ejerce un papel antiapoptótico en la línea inmortalizada de retina embrionaria de codorniz RTC5 sin modificar los niveles de proliferación.

6.8. El factor FGF-2, además de inducir supervivencia sobre la línea RTC5, aumenta la proliferación pero no la diferenciación.

6.9. La insulina induce mecanismos de señalización diferentes en dos edades embrionarias estudiadas, E5 y E9. Así, en la edad de mayor proliferación, E5, la supervivencia está mediada por la activación de la vía MEK-ERK, mientras que en la edad de mayor diferenciación, E9, la supervivencia está mediada por la vía PI3K-Akt. Por tanto, podríamos decir que los mecanismos que regulan los procesos de muerte temprana (neurogénesis) y tardía (conectividad) parecen presentar especificidad a varios niveles de la vía de señalización.

BIBLIOGRAFÍA

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abrams JM y White MA. (2004). Coordination of cell death and the cell cycle: linking proliferation to death through private and communal couplers. *Curr Opin Cell Biol* **16**:634-8.

Abrams JM. (2002). Competition and compensation: coupled to death in development and cancer. *Cell* **110**:403-6.

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* **12**:106-9.

Adler R, Hatlee M. (1989). Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. Science **243**:391-93.

Adler, R. (2000). A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Prog Retin Eye Res* **19**:529-57.

Alarcon C, Serna J, Perez-Villamil B y De Pablo F. (1998). Synthesis and differentially regulated processing of proinsulin in developing chick pancreas, liver and neuroretina. *FEBS Lett* **436**:361-6.

Anlar B, Sullivan KA y Feldman EL. (1999). Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. *Horm Metab Res* **31**:120-5.

Austin CP, Feldman DE, Ida JA Jr y Cepko CL. (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**: 3637-50.

Bahr M. (2000). Live or let die - retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS. *Trends Neurosci* **23**:483-90.

Barbacid M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* **25**:1386-403.

Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA y Gardner TW. (2001). Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J Biol Chem* **276**: 32814-21.

Barger SW y Mattson MP. (1996). Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. *Brain Res Mol Brain Res* **40**:116-26.

Bateman JM y McNeill H. (2006). Insulin/IGF signalling in neurogenesis. *Cell Mol Life Sci* **63**:1701-5.

Belecky-Adams T, Cook B y Adler R. (1996). Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique. *Dev Biol* **178**: 304-15.

Bernstein HG, Reichenbach A, Kirschke H y Wiederanders B. (1989). Cell type-specific distribution of cathepsin B and D immunoreactivity within the rabbit retina. *Neurosci Lett* **98**:135-8.

Biehlmaier O, Neuhauss SC y Kohler K. (2001). Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. *Cell Tissue Res* **306**:199-207.

Boulton TG, Gregory JS y Cobb MH. (1991). Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry* **30**:278-86.

Bovolenta P, Frade JM, Marti E, Rodriguez-Pena MA, Barde YA, Rodriguez-Tebar A. (1996). Neurotrophin-3 antibodies disrupt the normal development of the chick retina. *J Neurosci* **16**:4402-10.

Boya P y de la Rosa EJ. (2005). Cell death in early neural life. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**:281-93.

Bronner-Fraser M. (1995). Origins and developmental potential of the neural crest. *Exp Cell Res*. **218**:405-17.

Buhling F, Groneberg D, Welte T. (2006). Proteases and their role in chronic inflammatory lung diseases. *Curr Drug Targets* **7**:751-9.

Buss RR, Sun W y Oppenheim RW. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **29**:1-35.

Candal E, Anadon R, DeGrip WJ, Rodriguez-Moldes I. (2005). Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* **154:**101-19.

Cellerino A, Galli-Resta L, Colombaioni L. (2000). The dynamics of neuronal death: a time-lapse study in the retina. *J Neurosci* **20**:RC92.

Cheung EC y Slack RS. (2004). Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* **251**: PE45.

Chwieralski CE, Welte T y Buhling F. (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* **11**:143-9.

Clarke PG. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* **181**:195-213.

Cole LK y Ross LS. (2001). Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* **240**:123-42.

Combettes-Souverain M e Issad T. (1998). Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* **24**:477-89.

Conlon I y Raff M. (1999). Size control in animal development. *Cell* **96**:235-44.

Cook B, Portera-Cailliau C y Adler R. (1998). Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J Comp Neurol* **396**:12-9.

Coulombre AJ. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am J Anat* **96**:153-89.

Cremisi F, Philpott A, Ohnuma S. (2003). Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **13**:26-33.

Cuadros MA y Rios A. (1988). Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat Embryol (Berl)* **178**:543-51.

Danial NN y Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**:205-19.

Datta SR, Brunet A y Greenberg ME. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13:**2905-27.

Davies AM. (2003). Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *Embo J* **22**:2537-45.

de la Rosa EJ y De Pablo F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* **23**:454-8.

de la Rosa EJ, Arribas A, Frade JM, Rodriguez-Tebar A. (1994 a). Role of neurotrophins in the control of neural development: neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neuroscience* **58**:347-52.

de la Rosa EJ, Bondy CA, Hernandez-Sanchez C, Wu X, Zhou J, Lopez-Carranza A, Scavo LM, de Pablo F. (1994 b). Insulin and insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *Eur J Neurosci* **6**:1801-10.

de la Rosa EJ, Diaz B y De Pablo F. (1998). Organoculture of the chick embryonic neuroretina. *Curr Top Dev Biol* **36**:133-44.

De Pablo F y de la Rosa EJ. (1995). The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci* **18**:143-50.

De Pablo F y de la Rosa EJ. (1995). The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci* **18**:143-50.

De Pablo F y Roth J. (1990). Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem Sci* **15**:339-42.

De Pablo F, Roth J, Hernandez E, Pruss RM. (1982). Insulin is present in chicken eggs and early chick embryos. *Endocrinology* **111**:1909-16.

Deltour L, Leduque P, Blume N, Madsen O, Dubois P, Jami J, Bucchini D. (1993). Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci* **90**:527-31.

Díaz B y Moreno E. (2005). The competitive nature of cells. *Exp Cell Res* **306**:317-22.

Díaz B, Pimentel B, de Pablo F, de la Rosa EJ. (1999). Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur J Neurosci* **11**:1624-32.

Díaz B, Serna J, De Pablo F y de la Rosa EJ. (2000). In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**:1641-9.

Donovan M y Cotter TG (2002). Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ* **9**:1220-31.

Dunlop SA y Beazley LD. (1987). Cell death in the developing retinal ganglion cell layer of the wallaby Setonix brachyurus. *J Comp Neurol* **264**:14-23.

Dutting D, Gierer A y Hansmann G. (1983). Self-renewal of stem cells and differentiation of nerve cells in the developing chick retina. Brain Res **312**:21-32.

Ebisuya M, Kondoh K, y Nishida E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* **118**:2997-3002.

Ellis RE, Yuan JY y Horvitz HR. (1991). Mechanisms and functions of cell death. Annu *Rev Cell Biol* **7**:663-98.

Felbor U, Kessler B, Mothes W, Goebel HH, Ploegh HL, Bronson RT, y Olsen BR. (2002). Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci* **99**:7883-8.

Frade JM, Rodriguez-Tebar A y Barde YA. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* **383**:166-8.

Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sanchez M y Martin-Partido G. (2004). Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. *Anat Embryol (Berl)* **208**:289-99.

Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sanchez M y Martin-Partido G. (2004). Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. *Anat Embryol* **208**:289-99.

Gallera J. (1971). Primary induction in birds. *Adv Morphog* **9**:149-80.

Galli-Resta L y Ensini M. (1996). An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J Neurosci* **16**:2318-24.

Garcia-de Lacoba M, Alarcon C, de la Rosa EJ y De Pablo F. (1999). Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology* **140**:233-43.

Garcia-Porrero JA y Ojeda JL. (1979). Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study. *Experientia* **35**:375-6.

Garcia-Porrero JA, Colvee E y Ojeda JL. (1984). Cell death in the dorsal part of the chick optic cup. Evidence for a new necrotic area. *J Embryol Exp Morphol* **80**:241-9.

Garcia-Porrero JA, Colvee E y Ojeda JL. (1987). Retinal cell death occurs in the absence of retinal disc invagination: experimental evidence in papaverine-treated chicken embryos. Anat Rec **217**:395-401.

Gaze RM y Grant P. (1992). Spatio-temporal patterns of retinal ganglion cell death during Xenopus development. *J Comp Neurol* **315**:264-74.

Giddings SJ y Carnaghi LR. (1990). Selective expression and developmental regulation of the ancestral rat insulin II gene in fetal liver. *Mol Endocrinol* **4**:1363-9.

Gilbert DA. (1988). On G0 and cell cycle controls. *Bioessays* **9**:135-6.

Girbau M, Bassas L, Alemany J y De Pablo F. (1989). In situ autoradiography and ligand-dependent tyrosine kinase activity reveal insulin receptors and insulin-like growth factor I receptors in prepancreatic chicken embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5868-72.

Gorin PD y Johnson EM. (1979). Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: effects on developing peripheral sympathetic and sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5382-6.

Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne V, Culhane AC, Williams GT. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* **237**:884.

Hallböök F, Bäckström A, Kullander K, Ebendal T y Carri NG. (1996). Expression of neurotrophins and Trk receptors in the avian retina. *J. Comp. Neurol.* **364**, 664-676.

Hallböök F, Ibañez CF, Ebendal T y Persson H. (1993). Cellular localization of brainderived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA in the early chicken embryo. *Eur. J.Neurosci.* **5**, 1-14.

Hamburger V y Hamilton HL. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol **88**: 49-92.

Henderson CE. (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* **17**:579-85.

Hernández-Sánchez C, Lopez-Carranza A, Alarcon C, de La Rosa EJ y De Pablo, F. (1995). Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci* **92**:9834-8.

Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, Pollerberg GE, Martinez-Salas E, De Pablo F. (2003). Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *Embo J* **22**:5582-92.

Hernández-Sánchez C, Rubio E, Serna J, de la Rosa EJ y De Pablo F. (2002). Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes* **51**:770-7.

Hilfer SR, Yang JW. (1980). Accumulation of CPC-precipitable material at apical cell surfaces during formation of the optic cup. *Anat Rec* **197**:423-33.

Hirata M, Hall BK. (2000). Temporospatial patterns of apoptosis in chick embryos during the morphogenetic period of development. *Int J Dev Biol* **44**:757-68.

Hofer MM, Barde YA. (1988). Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* **331**:261-2.

Homma S, Yaginuma H y Oppenheim RW. (1994). Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection. *J Comp Neurol* **345**:377-95.

Hughes A. (1975). A comparison of retinal ganglion cell topography in the plains and tree kangaroo. *J Physiol* **244**:61P-63P.

Hughes WF y McLoon SC. (1979). Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction. *Exp Neurol* **66**:587-601.

Huttner WB y Kosodo Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **17**:648-57.

Jaattela M y Tschopp J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* **4**:416-23.

Jacobson MD, Weil M y Raff MC. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**:347-54.

Johnson EM Jr., Blumberg HM, Costrini NV y Bradshaw RA. (1979). Reduction by reserpine of the accumulation of retrogradely transported [125I] nerve growth factor in sympathetic neurons. *Brain Res* **178**:389-401.

Johnson GL, Lapadat R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**:1911-2.

Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthioux E, Jami J, Bucchini D. (1996). Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *Embo J* **15**:1542-7.

Joza N, Kroemer G y Penninger, JM. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* **18**:142-9.

Karlsson M, Mayordomo R, Reichardt LF, Catsicas S, Karten H, Hallbook F. (2001). Nerve growth factor is expressed by postmitotic avian retinal horizontal cells and supports their survival during development in an autocrine mode of action. *Development* **128**:471-9.

Kasik JW, Lu C y Menon RK. (2000). The expanding insulin family: structural, genomic, and functional considerations. *Pediatr Diabetes* **1**:169-77.

Kerr JF, Wyllie AH y Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-57.

Kinkl N, Hageman GS, Sahel JA y Hicks D. (2002). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) and candidate signaling molecule distribution within rat and human retina. *Mol Vis* **8**:149–60.

Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nakanishi H, Koga T, Kametaka S, Waguri S, Momoi T, Kominami E, Peters C, et al. (2003). Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* **22**:146-61.

Kojima M, Asahi M, Kikuchi H, Hashimoto N, Noda M y Hoshimaru M. (1998). Expression of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) in the developing rat retina. *Neurosci Res* **31**:211-7.

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

Kuan CY, Roth KA, Flavell RA y Rakic P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* **23**:291-7.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**:325-37.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**:368-72.

Leist M y Jaattela M. (2001a). Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* **8**:324-6.

Leist M y Jaattela M. (2001b). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**:589-98.

Leonard JR, Klocke BJ, D'Sa C, Flavell RA y Roth KA. (2002). Strain-dependent neurodevelopmental abnormalities in caspase-3-deficient mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**:673-7.

Levi-Montalcini R. (1949). The development to the acoustico-vestibular centers in the chick embryo in the absence of the afferent root fibers and of descending fiber tracts. *J Comp Neurol* **91**:209-41.

Levi-Montalcini R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**:1154-62.

Livesey FJ y Cepko CL. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* **2**:109-18.

Lossi L y Merighi A. (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* **69**:287-312.

Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J. (1998). Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* **22**:31-52.

Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascues J. (1999). Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* **412**:255-75.

Martín-Partido G, Rodriguez-Gallardo L, Alvarez IS, Navascues J. (1988). Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anat Rec* **222**:272-81.

Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. (2000). Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* **74**:443-56.

Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W y Furukawa K. (1997). Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res* **49**:681-97.

Mayordomo R, Valenciano AI, de la Rosa EJ y Hallbook F. (2003). Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur J Neurosci* **18**:1744-50.

Meller K y Tetzlaff W. (1976). Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res* **170**:145-59.

Meller K. (1964). Electron-Microscopic Findings in the Differentiation of the Receptor Cells and Bipolar Cells of the Retina and Their Synaptic Connections. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **64:**733-50.

Mey J y Thanos S. (1992). Development of the visual system of the chick--a review. *J Hirnforsch* **33**:673-702.

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

Moore GE, Abu-Amero SN, Bell G, Wakeling EL, Kingsnorth A, Stanier P, Jauniaux E, Bennett ST. (2001). Evidence that insulin is imprinted in the human yolk sac. *Diabetes* **50**:199-203.

Morrison KB, Tognon CE, Garnett MJ, Deal C, Sorensen PH. (2002). ETV6-NTRK3 transformation requires insulin-like growth factor 1 receptor signaling and is associated with constitutive IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Oncogene* **21**:5684-95.

Moujahid A, Navascues J, Marin-Teva JL, Cuadros MA. (1996). Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat Embryol* **193**:131-44.

Navascues J, Gonzalez-Ramos C, Alvarez IS, Rodriguez-Gallardo L, Martin-Partido G. (1989). Quantitative studies of mitotic cells in the chick embryo optic stalk during the early period of invasion by optic fibres. *Anat Embryol* **180**:343-51.

Nelson DA y White E. (2004). Exploiting different ways to die. Genes Dev 18:1223-6.

Oppenheim RW, Maderdrut JL y Wells DJ. (1982). Reduction of naturally-occurring cell death in the thoraco-lumbar preganglionic cell column of the chick embryo by nerve growth factor and hemicholinium-3. *Brain Res* **255**:134-9.

Oppenheim RW. (1989). The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* **12**:252-5.

Oppenheim RW. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**:453-501.

Panchision DM y McKay RD. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* **12:**478-87.

Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL. (1999). Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **274**:31734-9.

Pequignot, MO, Provost AC, Salle S, Taupin P, Sainton, KM, Marchant D, Martinou JC, Ameisen JC, Jais JP, Abitbol M. (2003). Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev Dyn* **228**:231-8.

Pettmann B y Henderson CE. (1998). Neuronal cell death. *Neuron* **20:**633-47.

Pimentel B, Sanz C, Varela-Nieto I, Rapp UR, De Pablo F, de La Rosa EJ. (2000). c-Raf regulates cell survival and retinal ganglion cell morphogenesis during neurogenesis. *J Neurosci* **20**:3254-62.

Politi LE, Rotstein NP, Salvador G, Giusto NM e Insua MF. (2001). Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. *J Neurochem* **76**:1199-211.

Pollerberg GE y Eickholt BJ. (1995). Target preference of embryonic retina cells and retinal cell lines is cell-autonomous, position-specific, early determined and heritable. *Eur J Neurosci* **7**:1431-41.

Pollerberg GE, Kuschel C y Zenke M. (1995). Generation of cell lines from embryonic quail retina capable of mature neuronal differentiation. *J Neurosci Res* **41**:427-42.

Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez R y Ramirez G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* **3**:559-569.

Raff M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* **396**:119-22.

Rager G y Rager U. (1978). Analysis of location-specific developmental and maturational differences in retinal ganglion cells. *Verh Anat Ges*:**333**.

Rager G y Rager U. (1979). Systems-matching by degeneration in the developing retino-tectal projection of the chicken. *Prog Brain Res* **51**:439-43.

Rager G. (1980). Retinotopy and order in the visual pathway of the chick embryo during development. *Folia Morphol* **28**:72-5.

Rhee, KD. and Yang, XJ. (2003). Expression of cytokine signal transduction components in the postnatal mouse retina. Mol Vis **9**:715–22.

Riedl SJ y Shi Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5:**897-907.

Rosenzweig JL, Havrankova J, Lesniak MA, Brownstein M, Roth J. (1980). Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. *Proc Natl Acad Sci* **77**:572-6.

Ross ME. (1996). Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci* **19**:62-8.

Roth KA y D'Sa C. (2001). Apoptosis and brain development. Ment *Retard Dev Disabil Res Rev* **7**:261-6.

Schultz GA, Hahnel A, Arcellana-Panlilio M, Wang L, Goubau S, Watson A, Harvey M. (1993). Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Mol Reprod Dev* **35**:414-20.

Serrano J, Bevins CL, Young SW, de Pablo F. (1989). Insulin gene expression in chicken ontogeny: pancreatic, extrapancreatic, and prepancreatic. *Dev Biol* **132**:410-8.

Silver J, Sapiro J. (1981). Axonal guidance during development of the optic nerve: the role of pigmented epithelia and other extrinsic factors. *J Comp Neurol* **202**:521-38.

Smyth MJ, Perry DK, Zhang J, Poirier GG, Hannun YA, Obeid LM. (1996). prICE: a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2. *Biochem J* **316** (Pt 1):25-8.

Strasser A, O'Connor L y Dixit VM. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**:217-45.

Strongin AC y Guillery RW. (1981). The distribution of melanin in the developing optic cup and stalk and its relation to cellular degeneration. *J Neurosci* **1**:1193-204.

Subramaniam S SN, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker KI. (2005). Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci* **25**:2838-52.

Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG. (1997). Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **17**:1075-85.

Thornberry NA y Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-6.

Trousse F, Esteve P, Bovolenta P. (2001). Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* **21**:1292-301.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* **313**:756-61.

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* **5**:2503-12.

Valenciano AI, Corrochano S, de Pablo F, de la Villa P y de la Rosa EJ. (2006). Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J Neurochem* **99**:524-36.

Varela-Nieto I, de la Rosa EJ, Valenciano AI. y Leon Y. (2003). Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol Neurobiol* **28**:23-50.

Vecino E, Hernandez M y Garcia M. (2004). Cell death in the developing vertebrate retina. *Int J Dev Biol* **48**:965-74.

Wada T y Penninger JM. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**:2838-49.

Wasselius J, Wallin H, Abrahamson M y Ehinger B. (2003). Cathepsin B in the rat eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **241**:934-42.

White MF. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**:3-11.

Wiesner DA, Kilkus JP, Gottschalk AR, Quintans J, Dawson G. (1997). Anti-immunoglobulin-induced apoptosis in WEHI 231 cells involves the slow formation of ceramide from sphingomyelin and is blocked by bcl-XL. J *Biol Chem* **272**:9868-76.

Willaime-Morawek S, Arbez N, Mariani J y Brugg B. (2005). IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2? *Brain Res Mol Brain Res* **142**:97-106.

Williams RA, Howard AG, Williams TP. (1985). Retinal damage in pigmented and albino rats exposed to low levels of cyclic light following a single mydriatic treatment. *Curr Eye Res* **4**:97-102.

Yan Q, Snider WD, Pinzone JJ, Johnson EM, Jr. (1988). Retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in motoneurons of developing rats: assessment of potential neurotrophic effects. *Neuron* **1**:335-43.

Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S, Kolesnick R. (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* **378**:307-10.

Yeo W y Gautier J. (2003). A role for programmed cell death during early neurogenesis in xenopus. *Dev Biol* **260**:31-45.

Yeo W y Gautier J. (2004). Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol* **274**:233-44.

Yeo W y Gautier J. (2005). XNGNR1-dependent neurogenesis mediates early neural cell death. *Mech Dev* **122**:635-44.

Young RW. (1984). Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* **229**:362-73.

Yuan, J., Lipinski, M. y Degterev, A. (2003). Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* **40**:401-13.

Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. (1996). Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci* **93**:5325-8.

Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**:16568-75.

APÉNDICE I: RECETARIO DE SOLUCIONES Y ANTICUERPOS.

SOLUCIONES PARA CULTIVOS.

MEDIO DE CULTIVO MN2	
Concentración final	Concentración "stock"
DMEM:F12 sin glutamina (1:1)	Producto en polvo a 4º C
$NaHCO_3$	
Glutamina (2mM)	Alícuotas 200 mM a -20º C
Gentamicina (50 μg/mL)	Solución (10 mg/mL) a 4º C
β-Estradiol (2 μM) (sólo para cultivos de RTC5)	Solución en etanol absoluto (1mM)
Apo-transferrina 100 μg/mL	Se añade fresca
Putrescina (16 μg/mL)	1,6 mg/mL en agua -20º C
Progesterona (6 ng/mL)	30 ng/mL en etanol absoluto -20º C
Selenito Sódico (5,2 ng/mL)	26 ng/mL en agua -20º C

MEDIO DE CULTIVO MS10	
Concentración final	Concentración "stock"
DMEM:F12 sin glutamina (1:1)	Producto en polvo a 4º C
Glutamina (2mM)	Alícuotas 200 mM a -20º C
Gentamicina (50 μg/mL)	Solución (10 mg/mL) a 4º C
β-Estradiol (2 μM) (sólo para cultivos de RTC5)	Solución en etanol absoluto (1mM)
Suero fetal de ternera (FCS) 8%	Alícuotas inactivadas -20º C
Suero de pollo (ChS) 2%	Alícuotas -20º C
Laminina (0,5 μg/mL) (sólo para cultivos de RTC5)	1 mg/mL en agua bidestilada 4º C
Selenito Sódico (5,2 ng/mL)	26 ng/mL en agua -20º C

- Disolver el medio en polvo junto con el $NaHCO_3$ en agua Milli-Q. Ajustar el pH a 7.15 con NaOH 1M, añadir el resto de los reactivos, enrasar al volumen final y filtrar a través de filtros de 0.22 μM.

- **Insulina humana recombinante** (Sigma): Disolver en HCL 0,01N a concentración 1mg/mL (1,6 10^{-4} M). Emplear a concentración final 100nM (10^{-7} M). Equivalencia: 4 ng = 0,1 m IU.
- **Laminina** (1mg/mL, Natural Mouse Laminin, Invitrogen): añadir 1 mL de agua bidestilada y dejar reconstituir a temperatura ambiente durante 30 minutos. Resuspender lentamente y filtrar con filtros de 0,2 μm. Guardar a 4º C y emplear a concentración final 0,5 μg/mL.

SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE "WESTERN BLOT".

- **Tampón de lisis RIPA**: Tris (50 mM pH 7.4), NaCl (150 mM) EDTA (1 mM), Tritón X-100 (1% *v/v*), Na-deoxycholate (1% *p/v*, Merck), SDS (0.1% *p/v*).
- **Solución de Na-deoxycholate**:(Deoxicolato Sódico): preparar el detergente iónico al 10% p/v en agua Milli-Q y guardar a temperatura ambiente protegido de la luz. Emplear a concentración final 1 %.
- **Solución Na_3VO_4** (Ortovanadato Sódico): el Na_3VO_4 debe ser activado para que haya una máxima inhibición de proteínas fosfotirosil-fosfatasas. Preparar una solución de Na_3VO_4 200 mM en agua. Ajustar a pH 10,0 empleando NaOH 1 N o HCL 1 N (el pH puede variar según el lote del producto). A pH 10,0 la solución es amarilla. A continuación hervir la solución durante unos 10 minutos (se volverá incolora). Dejar enfriar a temperatura ambiente. Reajustar a pH 10,0 y hervir de nuevo si la solución se vuelve amarilla. Hacer alícuotas y guardar a -20º C. Este método despolimeriza el ortovanadato potenciando su capacidad de inhibicón de las tirosín fosfatasas. (Gordon, J., Methods Enzymol. 201: 477-482, 1991).

- **PMSF** (Fluoruro de fenilmetilsulfonil): preparar una solución 200 mM en isopropanol, guardar a -20º C. Añadir fresco a concentración final 1 mM.
- **NaF** (Fluoruro Sódico): preparar una solución 200 mM en agua Milli-Q y guardar a temperatura ambiente. Añadir fresco a concentración final 1 mM.
- **EDTA**: preparar una solución 100 mM en agua Milli-Q y ajustar pH 7,4. Emplear a concentración final 1 mM.
- **Tampón de carga 2x** con SDS: Tris (100 mM), Glicerol (25 % *v/v*), SDS (2 % p/v), Azul de bromofenol (0,01 % *p/v*). Se ajusta el pH 6,8 y se añade 2-ME (10 % *v/v*.).
- **Tampón de Electroforesis 10X**

  Tris Base: 30.3 g concentración final (250 mM, pH 8.3)

  Glycine: 144.2 g concentración final (1.92 M)

  Enrasar con Agua Milli-Q hasta 1 L.

  Almacenar a 4º C.
- **Tampón de Electroforesis 1X**

  Tampón de electroforesis 10X: 100 mL.

  Agua Milli-Q: 890 mL.

  SDS 10%: 10 mL. Concentración final. (0.1%)
- **Tampón de Electrotransferencia (Tris-Glicina)**:

  Tris Base 3.03 g. Concentración final (25 mM, pH 8.3)

  Glycine 14.4 g. Concentración final (192 mM)

SOLUCIONES PARA INMUNHISTOQUÍMICA.

- **Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4:**

  Na_2HPO_4 (Merck, Mw 141,96): 5,68 g en 200 mL en agua Milli-Q. Concentración final 0,2 M.

  NaH_2PO_4 H_2O (Merck, Mw 137,99): 1,38 g en 50 mL en agua Milli-Q. Concentración final 0,2 M

  - Na_2HPO_4 (0,2 M): 162 mL.
  - NaH_2PO_4 H_2O (0,2 M): 38 mL
  - H_20: enrasar a 400 mL.
- **Colagenasa 1000 U/mL**: preparar en agua Milli-Q y guardar alícuotas de 200 μL a -20º C. Emplear a concentración final 20 U/mL.
- **Solución concentrada de poli-L-lisina (0,5 mg/mL)**: disolver 100 mg de poly-L-Lysin (Sigma) en 200 mL de agua Milli-Q. Hacer alícuotas y guardar a -20º C.
- **Solución de trabajo de poli-L-lisina (500 mL)**:
  - poli-L-lisina (0,5 mg/mL): 50 mL.
  - Tris 1 M pH 8,0: 5 mL
  - H_20 milli-Q: enrasar a 500 mL.

Lavar los portaobjetos con etanol (75% *v/v*) y dejar secar. Sumergir en la solución de trabajo de poli-L-lisina y dejar secar a temperatura ambiente. Almacenar a 4º C.

- **Tampón Borax Borato 0,1 M pH 9,0** : Preparar una solución de Borato Sódico 0,1 M y ajustar a pH 9,0 con Ácido Bórico 0,1 M.
- **BGT** (BSA-Glicina-Tritón): disolver en PBS 1X a concentración final Glicina 100 mM, BSA 3 mg/ml, Tritón X-100 0,25% (*p/v*).
- **Solución de tinción DAPI** (4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidarto): disolver 1 mg de DAPI en 1 mL de tampón fosfato, hacer alícuotas y guardar a -20º C.

Emplear a concentración final 4 μg/mL añadiéndolo al medio de montaje o en PBS si se realizan lavados. También se puede disolver 1 mg de DAPI en 1 L de tampón fosfato almacenando a 4º C. Teñir las células en esta solución durante 20 minutos.

ANTICUERPOS EMPLEADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA.

- **TUJ-1 o β-III tubulina**: anticuerpo policlonal de conejo (Covance Innovative Antibodies, EE.UU) contra la proteína del citosesqueleto β-III tubulina expresado en neuronas recién diferenciadas. En retina embrionaria de pollo tiñe perfectamente los axones de los neuroblastos que acaban de salir de ciclo. Emplear a 1/1000 en tejido y a 1/2000 en cultivos de células. Almacenar a 4º C.
- **Anticuerpo contra BrdU G3G4**: El anticuerpo monoclonal de ratón contra 5-bromo-2'-deoxiuridina fue desarrollado por Stephen J Kauffman y es mantenido por el Developmental Studier Hybridoma Bank, University of Iowa, Dpt. Of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242 (EE.UU). Generalmente a concentración 4 mg/mL. Emplear a dilución 1:500 en tejido y a 1:1000 en cultivos celulares. Tiempo mínimo de marcaje 10 horas 4º C. Al ser ascitis conviene hacer alícuotas para evitar contaminación. Almacenar a 4º C
- **Anticuerpo contra Islet 1/2**: anticuerpo moclonal de ratón contra el factor de transcripción Islet 1/2 mantenido por el Developmental Studier Hybridoma Bank, University of Iowa, Dpt. Of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242 (EE.UU). Generalmente a concentración 3,5 mg/mL. Emplear a dilución 1:500 en tejido y a 1:1000 en cultivos celulares. Tiempo mínimo de marcaje 18 horas a 4º C. Al presentarse como ascitis conviene hacer alícuotas para evitar contaminación. Almacenar a 4º C.

WILEY InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

Differential, Age-Dependent MEK-ERK and PI3K-Akt Activation by Insulin Acting as a Survival Factor During Embryonic Retinal Development

Teresa Chavarría,[1,2] Ana I. Valenciano,[1] Raquel Mayordomo,[1,2,3] Joaquim Egea,[4] Joan X. Comella,[4] Finn Hallböök,[3] Flora de Pablo,[1] Enrique J. de la Rosa[1]

[1] Department of Cellular and Molecular Physiopathology, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain

[2] Centro Universitario de Plasencia, Department of Anatomy, Cellular Biology and Zoology, Universidad de Extremadura, Plasencia, Cáceres, Spain

[3] Department of Neuroscience, Biomedical Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden

[4] Laboratori d'Investigacio, Hospital Arnau de Vilanova, Department of Ciencies Mediques Basiques, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

Received 10 April 2007; revised 21 May 2007; accepted 13 June 2007

ABSTRACT: **Programmed cell death is a genuine developmental process of the nervous system, affecting not only projecting neurons but also proliferative neuroepithelial cells and young neuroblasts. The embryonic chick retina has been employed to correlate *in vivo* and *in vitro* studies on cell death regulation. We characterize here the role of two major signaling pathways, PI3K-Akt and MEK-ERK, in controlled retinal organotypic cultures from embryonic day 5 (E5) and E9, when cell death preferentially affects proliferating neuroepithelial cells and ganglion cell neurons, respectively. The relative density of programmed cell death *in vivo* was much higher in the proliferative and early neurogenic stages of retinal development (E3–E5) than during neuronal maturation and synaptogenesis (E8–E19). In organotypic cultures from E5 and E9 retinas, insulin, as the only growth factor added, was able to completely prevent cell death induced by growth factor deprivation. Insulin activated both the PI3K-Akt and the MEK-ERK pathways. Insulin survival effect, however, was differentially blocked at the two stages. At E5, the effect was blocked by MEK inhibitors, whereas at E9 it was blocked by PI3K inhibitors. The cells which were found to be dependent on insulin activation of the MEK-ERK pathway at E5 were mostly proliferative neuroepithelial cells. These observations support a remarkable specificity in the regulation of early neural cell death.** © 2007 Wiley Periodicals, Inc. Develop Neurobiol 00: 000–000, 2007

Keywords: **programmed cell death; neuroepithelium; neurogenesis; proliferation; differentiation**

INTRODUCTION

Programmed cell death is an essential developmental process of the nervous system (de la Rosa and De Pablo, 2000; Kuan et al., 2000; Davies, 2003; Lossi and Merighi, 2003; Yeo and Gautier, 2004; Boya and de la Rosa, 2005; Buss et al., 2006). In the vertebrate neuroretina, several cell death phases occur. Cell

Correspondence to: E.J. de la Rosa (ejdelarosa@cib. csic.es).

Contract grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia; contract grant numbers: BMC2003-07751, BFU2004-02352

Contract grant sponsor: Ministerio de Sanidad y Consumo; contract grant numbers: RETIC RD-06, PI04/2364

Contract grant sponsors: Generalitat de Catalunya (Suport als Grups de Recerca Consolidats); Comunidad de Madrid

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Published online in Wiley InterScience(www.interscience. wiley.com).
DOI 10.1002/dneu.20554

death appears first associated with morphogenesis of the optic vesicle and optic cup (Strongin and Guillery, 1981; Garcia-Porrero et al., 1984; Martin-Partido et al., 1988; Cole and Ross, 2001; Trousse et al., 2001; Candal et al., 2005). Later in development, proliferative neuroepithelial cells and young neuroblasts die concomitantly with neurogenesis (Díaz et al., 1999, 2000; Marin-Teva et al., 1999; Pimentel et al., 2000; Mayordomo et al., 2003; Pequignot et al., 2003). These phases occur earlier than those affecting neurons, which are related to neuronal connectivity and synaptogenesis (Cook et al., 1998; Cole and Ross, 2001; Francisco-Morcillo et al., 2004; Candal et al., 2005). Thus, the developing retina is a dynamic system in which cell survival signaling can be characterized under different physiological conditions.

Programmed cell death is controlled by a balanced cross-talk between multiple pro-survival and pro-death signals, which interacts both intra- and extracellularly to determine the final cell fate (Strasser et al., 2000; Joza et al., 2002; Danial and Korsmeyer, 2004). Death commitment leads to caspase-dependent and -independent (including those of cathepsins, calpains and granzyme A and B) pathways of cell death execution (Leist and Jaattela, 2001a). Whereas the survival/death signaling has been exhaustively characterized in transfected cell lines, the embryonic retina provides a primary model system suitable for the analysis of regulatory and executor elements.

Among the survival factors active in the nervous system, those of the insulin family, especially IGF-I, are well-characterized neuroprotective factors whose actions span from development to aging (De Pablo and de la Rosa, 1995; Anlar et al., 1999; Varela-Nieto et al., 2003). In the nervous system, most *in vitro* studies strongly suggest that the survival effects of insulin-related growth factors appear to require an initial activation of PI3K-Akt as a common step in their intracellular signaling pathways (Varela-Nieto et al., 2003). We have previously characterized that proinsulin and insulin, prior to IGF-I expression during development, act as survival factors in the chick and the mouse retina (Diaz et al., 1999, 2000; Duenker et al., 2005; Valenciano et al., 2006). Further, we have shown that proinsulin can act independently of Akt activation (Valenciano et al., 2006). In the present report, the entire period of embryonic chick retinal development is analyzed with the aim to compare some aspects of the regulatory and executor pathways between the early and the late phases of programmed cell death in a primary model, part of the central nervous system.

MATERIAL AND METHODS

Chick Embryos

Fertilized White Leghorn eggs were incubated at 38.4°C in a humidified incubator for the desired period. Embryonic age, referred to in days of embryonic development (E), was staged according to Hamburger and Hamilton (1951). Animal experimentation follows the European Union guidelines and the ARVO statements for use of animals in ophthalmic and vision research, and was approved by the local ethics committee for experimental animals.

Neuroretina Organotypic Culture

After removal of the eyes, neuroretinas were dissected free of other tissues and incubated in a chemically defined medium (de la Rosa et al., 1998; Diaz et al., 1999) for 6 h at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. Where indicated, Boc-D-fmk (38 μM; Calbiochem, San Diego, CA), z-FA-fmk (150 μM; Calbiochem), z-FF-fmk (20 μM; Calbiochem), recombinant human insulin (at the indicated concentrations; Sigma, St, Louis, MO), Ly-294002 (50 or 150 μM; Calbiochem), worthmanine (200 μM, Calbiochem), U-0126 (50 or 150 μM; Calbiochem), PD-98059 (50 μM; Calbiochem), or 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU; 5 μM; Sigma) were added to basal medium. After culture, retinas were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove the medium and flat-mounted on nitrocellulose membranes, fixed overnight in 4% paraformaldehyde (w/v) in 0.1 *M* phosphate buffer, pH 7.4, and processed.

In Ovo Treatments

BrdU incorporation was used to quantify proliferation in E5 and E9 retinas. A small window was opened on the egg shell and an incision was made into the embryonic membranes. Cellotape was used to cover the opened window and prevent dehydration, and eggs were further incubated for 2 h before treatment to standardize manipulation. For treatments, the tape was removed and 2.5 μg of BrdU in 25 μL were injected per egg. For *in ovo* treatment with the ERK-activation inhibitor, 25 μL of 50 μM U-0126 were added to E5 embryos simultaneously with the BrdU solution. The eggs were covered again and left 6 h at 38.4°C in a humidified incubator. Embryos were sacrificed and retinas dissected and flat-mounted on nitrocellulose membranes, fixed overnight in 4% paraformaldehyde (w/v) in 0.1 *M* phosphate buffer, pH 7.4, and processed.

Detection of Apoptosis

TUNEL of fragmented DNA was performed in whole-mount retinas or in cryostat sections based on previous methods (Diaz et al., 2000; Mayordomo et al., 2003) using FITC-dUTP and following the manufacturer's instructions (Apoptosis Detection System, Promega, Madison, WI). For whole-mount retina staining, neuroretinas were first dis-

sected; then, they were flat mounted, fixed overnight in 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 *M* phosphate buffer, pH 7.4, permeated for 1 h at room temperature with 1% Triton X-100 (w/v) (Fluka, Buchs, Switzerland) for E5 retinas or 4% Triton X-100 for E9 retinas, processed for TUNEL assay, and visualized using confocal microscopy. For detection of apoptotic cells in sections, embryos were fixed as earlier, cryoprotected in 30% (w/v) sucrose, frozen, and cut into 10-μm sections parallel to the optic axis at the level of the optic nerve. Sections were processed for TUNEL assay following the manufacturer's instructions.

Immunostaining of Proliferating Cells

Fixed whole-mount retinas were permeated as earlier, washed thoroughly with PBS, then treated with 2 *N* HCl for 10 min, and neutralized in 0.1 *M* $Na_2B_4O_7$, pH 8.9, for 20 min. Retinas were blocked with Triton X-100 0.1% (w/v) and normal goat serum 10% (v/v) in PBS for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with mouse anti-BrdU (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank) in the blocking solution. The anti-BrdU antibody G3G4 was generated by S.J. Kaufman and was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank maintained by the University of Iowa Dept. of Biological Sciences, Iowa City, IA. Retinas were then incubated with Far Red-conjugated secondary antibody (1:200; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) for 2 h at room temperature, washed three times with PBS, and mounted with DABCO 4% (w/v) (Sigma), glycerol 70% (v/v) for confocal visualization.

Double immunostaining of apoptotic and proliferating cells was performed on E5 whole-mount retinas permeated as earlier and then processed following the BrdU immunostaining protocol described earlier. After overnight incubation with the G3G4 primary antibody, retinas were washed twice with PBS and TUNEL was performed following the manufacturer's instructions. Once the TUNEL reaction was stopped, retinas were washed twice with PBS and incubated with a Far Red-conjugated secondary antibody (1:200) for 2 h at room temperature. After washing three times, retinas were mounted with DABCO 4% (w/v), glycerol 70% (v/v) for confocal visualization.

Scoring of Apoptotic and Proliferating Cells

Counting of cell numbers and calculation of cell death density in cryosections were performed using a modification of the method of Dutting et al. (1983). This method allows for identification and quantization of cell death affecting the different retinal layers. TUNEL-stained nuclei were counted in four sections of the central region from the same retina. At least four different animals subjected to the same experimental treatments were analyzed. The respective areas were measured and cell death densities were calculated (TUNEL-positive cells/mm^2).

TUNEL positive-cells were also scored in whole-mount retinas. This method allows for an accurate quantization in a relatively big, precisely located area of the retina. TUNEL-stained nuclei were counted in five fields around the optic nerve, covering the central retina, using a 40× objective (using either a Zeiss Axioplan microscope, Oberkochen, Germany, or a LEICA DMRE2 confocal microscope, Heidelberg, Germany). The respective areas were measured. The area evaluated represents ~3% of an E5 whole-mount retina and 0.4% of an E9 whole-mount retina. Cell death densities were calculated with respect to the surface of the flat retina (TUNEL-positive cells/mm^2). To allow for comparison with the values obtained in cryosections, the calculated densities per area were extrapolated to volume (TUNEL-positive cells/mm^3) considering the average thickness of central retina at E5 and E9, 100 and 500 μm, respectively.

Double-labeled TUNEL-BrdU-positive cells in whole-mount retinas were visualized using confocal microscopy. Cell numbers were determined by counting double TUNEL-BrdU cells that colocalized in the same confocal plane captured with a 40× objective in five fields around the optic nerve covering the central retina.

Immunoblots

Akt, phospho-Akt, ERK, and phospho-ERK protein levels were determined by immunoblot. Cultured retinas were homogenized by passage through 21G needles (Microlance, Fraga, Spain) in RIPA buffer: Tris (50 m*M*, pH 7.4), NaCl (150 m*M*), EDTA (1 m*M*), Triton X-100 (1%, w/v), Na-deoxycholate (1%, w/v; Merck), SDS (0.1%, w/v). To prevent phosphatase and proteolitic degradation, the buffer was supplemented with the following inhibitors: sodium orthovanadate (1 m*M*; Sigma), NaF (1 m*M*; Sigma), phenylmethylsulfonyl fluoride (1 m*M*; Sigma), protease inhibitor cocktail tablets (complete Mini EDTA-free; Roche, Mannheim, Germany), and centrifuged at 20,000*g* at 4°C for 15 min. The protein concentration in the supernatant fraction was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) and an aliquot containing 30–50 μg of protein was mixed with Laemmli buffer, heated at 90°C for 10 min, fractionated by 8–10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes (Biorad, Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK). The membranes were blocked with 3% BSA (w/v), 1% Tween-20 (wt/v) in PBS for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-phospho-Akt^{Ser473} (1:2000; Cell Signaling, Beverly, MA), rabbit anti-phospho-Akt^{Thr308} (1:2000; Cell Signaling), goat anti-Akt1 (1:2000; Santa Cruz, Santa Cruz, CA), mouse anti-ERK1/2 (1:1000; Zymed, San Francisco, CA), and rabbit anti-phospho-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling). Blots were developed with the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, or 1:10,000; Sigma) using the Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce). Films were scanned and

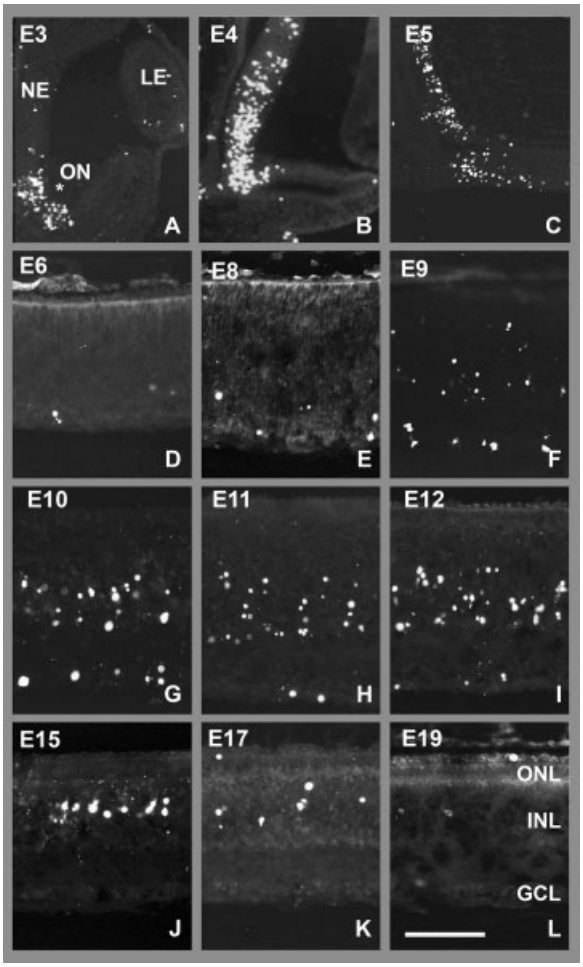


Figure 1 Developmental course of cell death in the embryonic chick retina. Dead cells were identified by TUNEL and visualized by fluorescence microscopy in 10-μm cryosections parallel to the optic axis at the level of the optic nerve. Developmental stage is referred as day of embryonic development (E). The retinal layers (GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer) are formed sequentially as development proceeds. Asterisk labels the optic nerve exit. Additional retinal features labeled: NE, neuroepithelium; LE, lens; ON, optic nerve; Bar represents 400 μm in A–C and 200 μm in D–L.

images were analyzed using a GS-800 calibrate densitometer (BioRad).

Statistical Analysis

ANOVA and Student–Newman *post-hoc* tests were used for statistical analysis of the data. Values represent standard error of the mean for all organotypic culture experiments. Values for *in ovo* experiments represent standard deviations of the media to show the variation caused by biological variability.

RESULTS

Programmed Cell Death Occurs Throughout Chick Retinal Development

Programmed cell death, as visualized by TUNEL, showed characteristic and differential distribution patterns in the embryonic chick retina throughout all stages, namely the early proliferative, the intermediate differentiative, and the late maturative and synaptogenic stages (Figs. 1 and 2), evidencing that cell death is a process associated with all phases of neural development. The level and distribution of cell

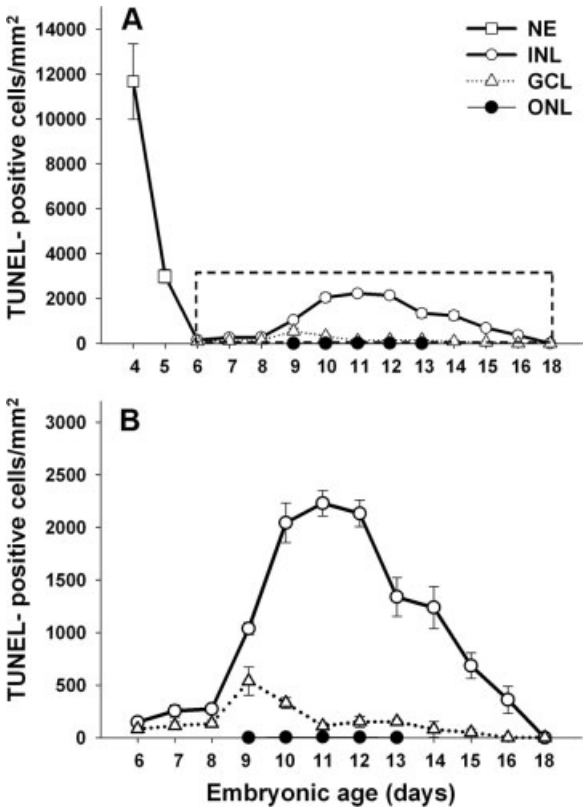


Figure 2 Magnitude of cell death throughout embryonic chick retinal development. Density of cell death as TUNEL-positive nuclei per mm^2 was quantified in the four most central fields of four sections, as those shown in Figure 1, per retina. At early stages (E4–E6), the whole neuroepithelium (NE) was scored. Relative densities in the developing retinal layers were independently considered as early as the different layers were identifiable (GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer). Panel B corresponds to the dashed-line inset in panel A with the expanded scale for better visualization of layer-specific cell death. Values represent the mean $\pm$ SD of four independent retinas per age.

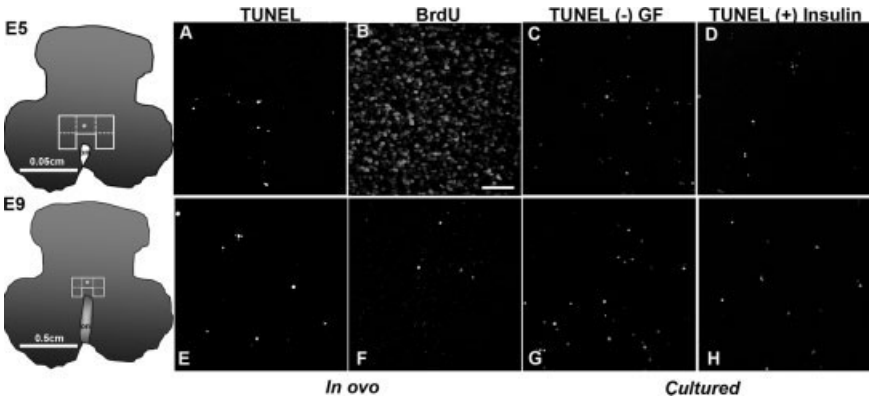


Figure 3 Cell death and proliferation in E5 and E9 chick retinas. TUNEL was performed on retinas directly dissected from the embryos (A and E) or after 6-h culture either in defined medium without growth factors (C and G) or in the presence of 100 n*M* insulin (D and H). BrdU labeling was performed for 6 h *in ovo*, prior to retina processing (B and F). A–D, E5 retinas; E–H, E9 retinas. Pictures are compiled optical sections by confocal microscopy. Schemes to the left show the scoring fields in the respective whole mount retinas. Resulting values of labeled cells were 2220 ± 260 mm^{-3} (panel A, TUNEL-positive at E5), 924 ± 126 mm^{-3} (panel E, TUNEL-positive at E9), 76,220 ± 2950 mm^{-3} (panel B, BrdU-positive at E5), 100 ± 2 mm^{-3} (panel F, BrdU-positive at E9). In all cases, values represent the mean ± SD of five *in ovo* retinas per experimental group. Bar represents 50 μm in A–H.

death, however, changed dramatically over developmental time. A very high density of apoptotic nuclei appeared in the central area of early, proliferative retinas from embryonic days 3 to 5 (E3–5) [Figs. 1(A–C) and 2(A)]. After a period of low incidence (E6–8) [Figs. 1(D,E) and 2(A)], cell death was found to increase again, sequentially affecting the ganglion cell layer (GCL; peak at E9) [Figs. 1(E–H) and 2(B)], the inner nuclear layer (INL; peak at E11) [Figs. 1(F–K) and 2(B)], and to a very small extent the outer nuclear layer (ONL). The density of TUNEL-positive nuclei in the early peak of cell death (11,666 ± 1677 mm^{-2} at E4) was clearly much higher than the density in the peak of cell death affecting the GCL (539 ± 135 mm^{-2} at E9), and than that in the peak affecting the INL (2229 ± 121 mm^{-2} at E11) (Figs. 1 and 2).

To characterize and compare the regulation of cell death in the two distinct phases of retinal development, we chose E5 as a proliferative stage, and E9 as an early differentiative stage which shows the peak of ganglion cell death. Visualization and quantification of cell death and proliferation *in ovo* revealed similar numbers of TUNEL-positive nuclei, while dramatic differences were seen in the number of BrdU-positive nuclei between the two ages [Fig. 3(A,B,E,F)]; this later observation confirmed that the E5 retina is primarily proliferative when compared with the E9 retina.

Caspases and Cathepsins are Involved in Retinal Cell Death Execution During Development

The cell death executor and regulatory mechanisms involved were determined in short-term retinal organotypic cultures, an approach that facilitates pharmacological treatments. Further, organotypic cultures previously rendered a good correlation with the *in vivo* observations (Diaz et al., 1999, 2000). Both E5 and E9 retinas cultured in a chemically defined medium and, thus, subjected to growth-factor deprivation conditions showed an increase of apoptotic cells relative to the *in vivo* situation, as visualized by TUNEL in whole-mount retinas [Fig. 3(A,C,E,G)]. The density of apoptotic cells was significantly decreased in organotypic cultures by the broad-spectrum caspase inhibitor Boc-D-fmk, as well as by selective inhibitors for cathepsin-B, z-FA-fmk, and cathepsin-L, z-FF-fmk (Fig. 4). Thus, both caspase and cathepsin pathways are needed for an efficient execution of retinal cell death in proliferative and differentiative stages.

Insulin Prevents Retinal Cell Death by Specific MEK-ERK or PI3K-Akt Activation Depending on the Embryonic Age

We have previously demonstrated that insulin plays a survival role in the early peak of retinal cell death,

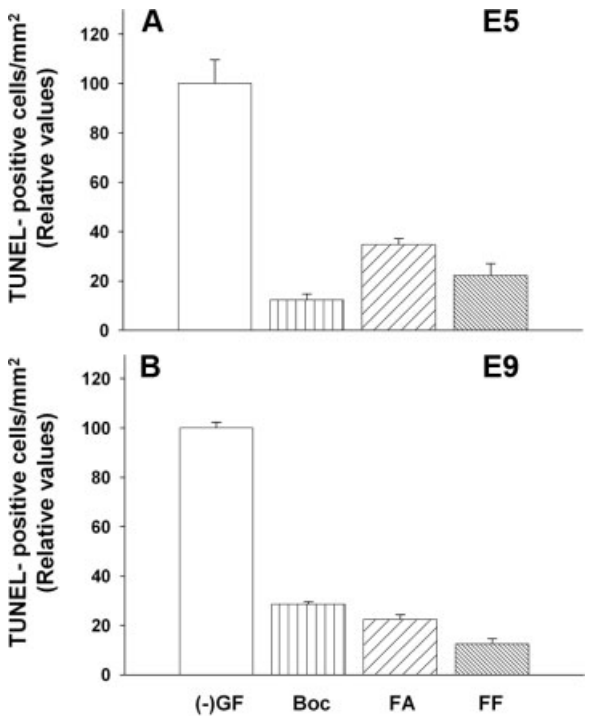


Figure 4 Caspase and cathepsin inhibition prevents growth factor-deprivation induced cell death. E5 (A) and E9 (B) retinas were cultured for 6 h in defined medium without growth factors (−GF) and in the presence of 38 μM Boc-D-fmk, 150 μM z-FA-fmk, or 20 μM z-FF-fmk. After culture, retinas were processed for TUNEL and quantified as shown in Figure 3. Values are relative to the density of TUNEL-positive nuclei under (−GF) conditions and represent the mean ± SEM of 4–7 independently cultured retinas per treatment. $p \leq 0.001$ for all treatments respect to −GF.

both in organotypic cultures and *in vivo* (Diaz et al., 1999, 2000). Cultured E5 and E9 chick retinas responded to insulin, which completely restored the levels of cell death found *in vivo* [Figs. 3(D,H) and 5].

Signaling pathway specificity in the survival effects displayed by insulin was explored at E5 and E9. Insulin activates both PI3K-Akt and MEK-ERK pathways upon binding to its receptors (Varela-Nieto et al., 2003). To determine the relative contributions of both intracellular pathways to the insulin survival effects, retinas were cultured in the presence of the PI3K inhibitors Ly-294002 and worthmanine, or the MEK inhibitors U-0126 and PD-98059. In E5 retinas, the insulin survival effect remained unaltered by the simultaneous presence of Ly-294002 at any of the concentrations tested [Fig. 6(A)]; however, this treatment prevented prominent insulin-induced Akt phosphorylation at both Ser^{473} and Thr^{308} residues [Fig. 6(B)]. A similar result was obtained with worthmanine, another PI3K inhibitor (data not shown). Thus, PI3K-Akt activation was not required for insulin survival effects at this stage of retinal development.

In contrast, the insulin survival effect at E9 was completely blocked by 150 μM Ly-294002 [Fig. 6(C)], a high concentration that was ineffective at E5 [Fig. 6(A)] but necessary to prevent Akt phosphorylation in the thick, multilayered retina of this embryonic age [Fig. 6(D)]. Thus, PI3K-Akt activation mediates the insulin survival effect at E9, but not at E5. This finding reveals differential survival mechanisms in the developing chick retina.

To elucidate the signaling pathway mediating the insulin survival effect at E5, retinas were cultured in the presence of MEK inhibitors. The insulin anti-apoptotic effect at E5 was totally blocked in the presence of U-0126 [Fig. 7(A)] and PD-98059 (data not shown). Insulin-induced ERK phosphorylation was also abolished by the simultaneous presence of these inhibitors [Fig. 7(B) and data not shown]. Conversely, MEK-inhibitors did not prevent the insulin survival effect at E9 [Fig. 7(C) and data not shown], although they reduced ERK1/2 phosphorylation [Fig. 7(D) and data not shown]. Altogether, these results demonstrate that the insulin survival effect is mediated by MEK-ERK activation at E5, whereas the same effect is mediated by PI3K-Akt at E9.

ERK Activation Mediates Insulin-Induced Survival of Proliferative Neuroepithelial Cells

As stated, the E5 chick retina mostly consists of proliferative neuroepithelial cells, whereas in the E9

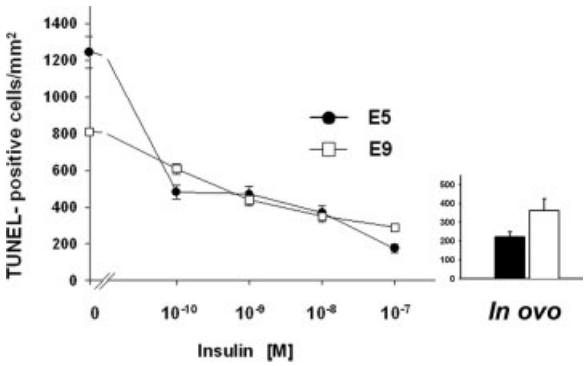


Figure 5 Dose-response curves for insulin attenuation of growth factor-deprivation induced cell death. E5 and E9 retinas were cultured for 6 h in defined medium without growth factors (0) and in the presence of the indicated concentrations of insulin. After culture, retinas were processed for TUNEL and quantified as shown in Figure 3. Inset to the right shows the *in ovo* values for both ages. Values represent the mean ± SEM of 6–8 independently treated retinas per experimental point.

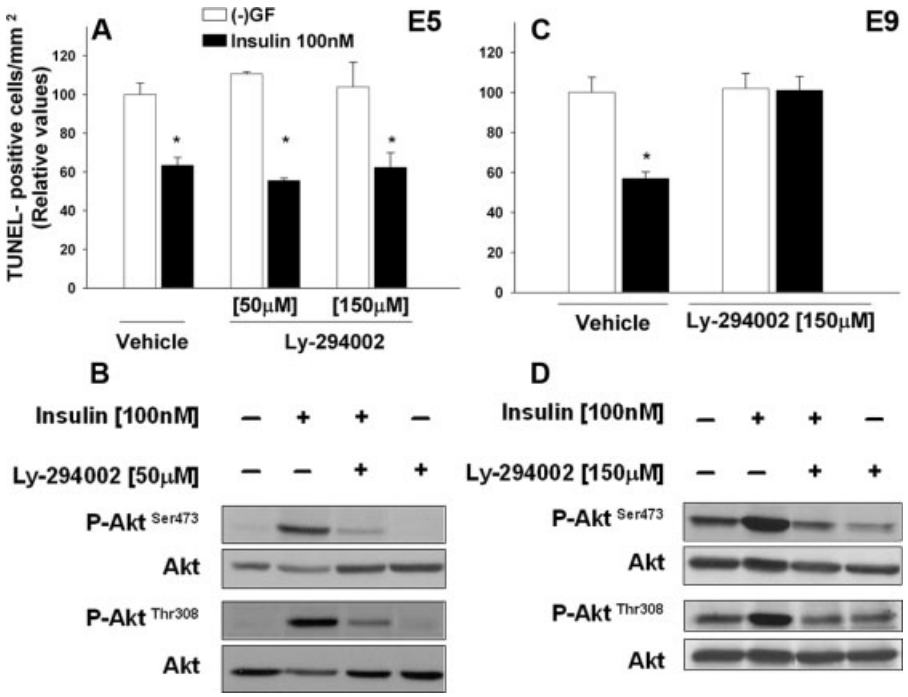


Figure 6 Insulin survival signaling through PI3K-Akt activation. E5 (A and B) and E9 (C and D) retinas were cultured for 6 h in defined medium without growth factors (−GF) and in the presence of the indicated concentrations of insulin and Ly-294002. After culture, retinas were processed either for TUNEL (A and C) and quantified as shown in Figure 3, or for Western Blot with antibodies specific for the indicated molecules. Values in graphs A and C are relative to the density of TUNEL-positive nuclei under (−GF) conditions and represent the mean ± SEM of 6–8 independently cultured retinas per treatment. $*p \leq 0.005$ for all treatments respect to the paired −GF. Panels B and D show representative western blots.

retina proliferation is low and the retina consists of young neurons and glial cells (Fig. 3; reviewed in Adler, 2000; Livesey and Cepko, 2001). The observed differences in insulin signaling pathways may thus be a consequence of the different cell types present in E5 and E9 chick retinas. The specific response of proliferative cells to insulin was determined in cultured E5 retinas, in which a consistent number of BrdU and TUNEL doubly-labeled cells were found (Fig. 8). Insulin effectively reduced the number of these cells, and this effect was partially blocked by the MEK inhibitor U-0126.

DISCUSSION

Using the embryonic chick retina as a model, we show that the incidence of cell death and its regulation are equivalent in magnitude and complexity in the two phases of early neural and later neuronal cell death. We also report that the intrinsic survival pathway, as revealed by insulin treatment in organotypic cultures, depends on MEK-ERK activation at E5, an early, proliferative stage, whereas it switches to depend on PI3K-Akt activation at E9, a differentiative stage.

Cell death is an essential process of neural development from early proliferative to later maturative stages. Whereas it is clearly established that neurons and glial cells depend on survival signaling (Kuan et al., 2000; Davies, 2003; Yuan et al., 2003), the process of cell death affecting proliferative neuroepithelial cells and young neuroblasts is much less characterized (de la Rosa and De Pablo, 2000; Yeo and Gautier, 2004; Boya and de la Rosa, 2005). Few studies have approached the characterization throughout development of programmed cell death regulation and execution in primary tissue from the central nervous system.

In the neuroretina, a part of the central nervous system, numerous cell death events have been characterized independently in several vertebrate species (Rob-

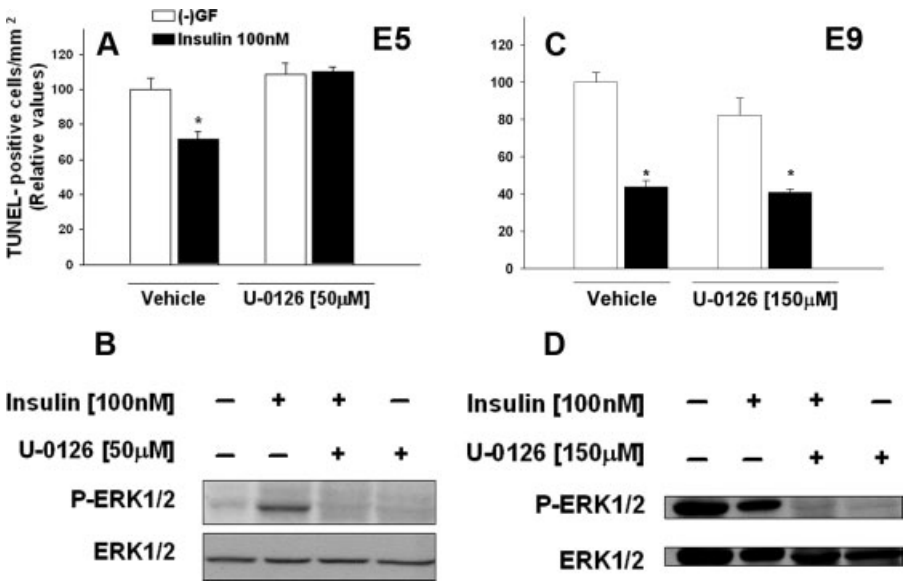


Figure 7 Insulin survival signaling through MEK-ERK activation. E5 (A and B) and E9 (C and D) retinas were cultured for 6 h in defined medium without growth factors (−GF) and in the presence of the indicated concentrations of insulin and U-0126. After culture, retinas were processed either for TUNEL (A and C) and quantified as shown in Figure 3, or for Western Blot with antibodies specific for the indicated molecules. Values in graphs A and C are relative to the density of TUNEL-positive nuclei under (−GF) conditions and represent the mean ± SEM of 8–12 independently cultured retinas per treatment. $*p \leq 0.01$ for all treatments respect to the paired −GF. Panels B and D show representative western blots.

inson et al., 1988; Gaze and Grant, 1992; Hensey and Gautier, 1998; Biehlmaier et al., 2001; Cole and Ross, 2001; Pequignot et al., 2003; Francisco-Morcillo et al., 2004; Candal et al., 2005). However, few studies include the whole retinal developmental period. This situation, together with the lack of detailed quantitative studies, hinders the comparison of the relative magnitude and the regulatory and executor pathways of cell death. In the chick embryo retina, several phases of physiological cell death occur, including morphogenic cell death (formation of the optic cup; Garcia-Porrero and Ojeda, 1979; Cuadros and Rios, 1988; Trousse et al., 2001), cell death affecting the generation of ganglion cells (Diaz et al., 2000; Mayordomo et al., 2003), and cell death sequentially affecting the retinal layers undergoing processes of maturation (Hughes, 1975; Hughes and McLoon, 1979; Rager and Rager, 1979; Cook et al., 1998). Our study covers these cell death phases and reveals that, as quantified in the central retina, the relative density of dying cells in the E4 neuroepithelium is much higher than in any other later phase of cell death (Fig. 2). This observation contrasts with the lack of studies of early neural cell death (reviewed in Boya and de la Rosa, 2005). Studies in other vertebrate species differ in the relative magnitude of cell death, a fact that may correlate with the different neurogenic timings and cell compositions of the respective retinas (Biehlmaier et al., 2001; Pequignot et al., 2003; Candal et al., 2005). Essentially, the magnitude of early neural cell death is, at least, similar to that affecting neurons.

The developing retina provides an amenable system for a comparative study of cell death execution and regulation in primary neural tissue under different physiological conditions. In the proliferative E5 chick retina, cell death affects proliferating neuroepithelial cells as well as generating ganglion cells (Diaz et al., 2000; Pimentel et al., 2000; Mayordomo et al., 2003). At E9, proliferation is a minor process, retinal ganglion cell generation has already finished, and this cell type is at the peak of neurotrophic cell death (Prada et al., 1991; Bahr, 2000; Vecino et al., 2004). In both stages, caspase or cathespsin inhibition blocks cell death triggered by growth-factor deprivation (Fig. 4), an observation that suggests the necessity of the recruitment of a robust network of proteases for the effective execution of cell death. We have previously found a similar situation in the developing mouse retina (Duenker et al., 2005; Valenciano et al., 2006). Caspase involvement in early retinal cell death concurs with the expression patterns of these proteases and their roles as executors of cell death during

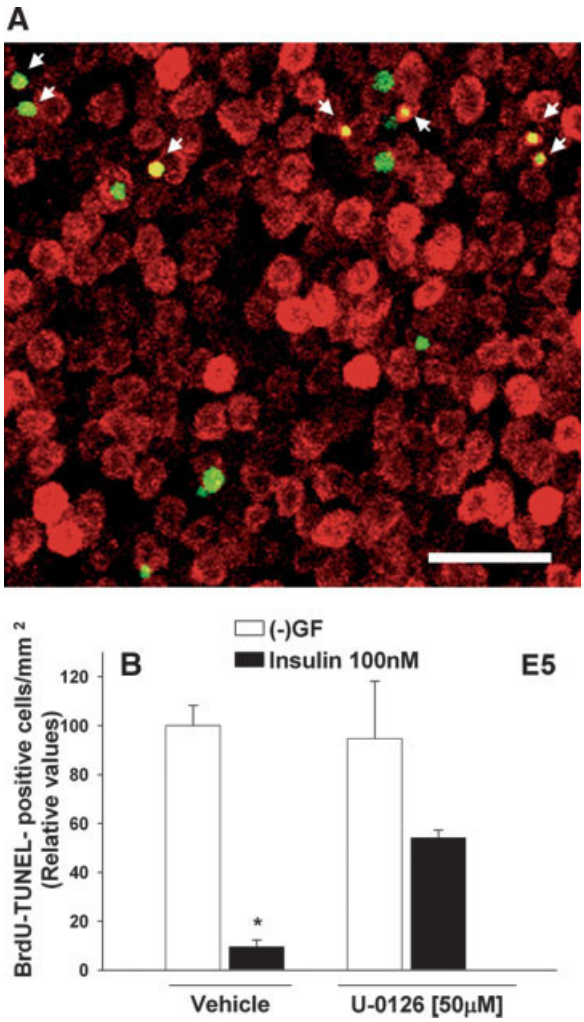


Figure 8 Insulin attenuates growth factor-deprivation induced death of proliferating cells through MEK-ERK activation. E5 retinas were cultured for 6 h in defined medium containing 5 μM BrdU without growth factors (−GF) and in the presence of the indicated concentrations of insulin and U-0126. After culture, retinas were processed for TUNEL and BrdU immunodetection (A) and quantified as shown in Figure 3. Values depicted in graph B are relative to the density of doubly-labeled TUNEL and BrdU nuclei under (−GF) conditions, and represent the mean ± SEM of 4–5 independently cultured retinas per treatment. *$p \leq 0.01$ respect to the paired −GF. Bar represents 20 μm.

retinal development (Kojima et al., 1998; Donovan and Cotter, 2002; Mayordomo et al., 2003). Recent reports also described activation of caspase-independent pathways (Leist and Jaattela, 2001b; Jaattela and Tschopp, 2003; Chwieralski et al., 2006), and the presence of cathepsins in the adult mammalian retina (Bernstein et al., 1989; Koike et al., 2003; Wasselius et al., 2003). Moreover, cathepsin-B and -L homozygous double mutant mice show brain atrophy (Felbor et al., 2002), suggesting an essential role of these two cathepsins in the maturation and integrity of the central nervous system.

We know that proinsulin/insulin is endogenously expressed throughout chick and mouse retinal development, and that these proteins attenuate apoptosis in growth factor-deprived organotypic cultured retinas. Indeed, insulin as the only growth factor added to the culture medium is able to rescue all the cell death induced by growth factor deprivation (Fig. 5 and Hernandez-Sanchez et al., 1995; Diaz et al., 1999; Duenker et al., 2005; Valenciano et al., 2006). Insulin also displays a survival effect *in vivo* (Diaz et al., 2000). Here, we employ the organotypic culture approach to study the insulin survival signaling at two selected ages of retinal development, E5 and E9. Whereas at the differentiative stage, E9, the insulin survival effect is mediated by PI3K-Akt activation, in the proliferative retina, at E5, MEK-ERK activation is the main mechanism mediating the insulin survival effect (Figs. 6 and 7). Activation of PI3K-Akt is a frequent step in the signaling pathway of the insulin-related growth factors (Campana et al., 1999; Gleichmann et al., 2000; Varela-Nieto et al., 2003), although its involvement is not well defined in early neural cell death. Via PI3K activation, IGF-I and insulin prevent growth factor-deprivation-induced apoptosis in mouse embryonic retinas, rat amacrine cells, and in the R28 retinal cell line (Barber et al., 2001; Politi et al., 2001; Valenciano et al., 2006). Insulin receptor activation also triggers the MEK-ERK signaling pathway (Boulton et al., 1991; White, 1998). This family of kinases has a well-demonstrated role regulating proliferation and differentiation, and its involvement in cell death is emerging (Johnson and Lapadat, 2002; Cheung and Slack, 2004; Wada and Penninger, 2004). In contrast to numerous studies demonstrating that, in the nervous system, insulin-related growth factors can prevent apoptosis via PI3K activation (Varela-Nieto et al., 2003), there are only a few showing that IGF-I effects in the nervous system are mediated by ERK activation (Subramaniam et al., 2005; Willaime-Morawek et al., 2005).

The triggering of different intracellular survival pathways may be related to the presence of atypical, promiscuous, hybrid insulin/IGF-I receptors, as we have described in the embryonic chick retina (Garcia-de Lacoba et al., 1999), as well as to overall changes in receptor numbers and affinities. As chick retinal development proceeds, the abundance of hybrid receptors decreases, whereas classical receptors become dominant (Garcia-de Lacoba et al., 1999). Other pleiotropic cytokines, such as FGFs and CNTF,

also show differential signaling specificities in the retina depending on the developmental age (Kinkl et al., 2002; Rhee and Yang, 2003).

This report demonstrates that, in the developing chick retina, insulin rescues proliferative cells from cell death via ERK activation. This result agrees with the previously reported IGF-I protection of mouse cortical neurons against ceramide-induced apoptosis, which is mediated by the coactivation of both PI3K-Akt and MEK-ERK pathways (Willaime-Morawek et al., 2005). Conversely, in cerebellar granule neurons, IGF-I prevents apoptosis by inhibition of ERK phosphorylation (Subramaniam et al., 2005). Differences in the duration, magnitude, and subcellular compartmentalization of ERK activity may generate variations in the signaling mechanisms that contribute to a final cellular response (Ebisuya et al., 2005), explaining how activation of the same protein kinase elicits distinct cellular outcomes.

Altogether, our results unravel aspects of the complexity of cell death regulation during early stages of neural development and recall that studies in primary tissue are crucial to establish the validity of the signaling pathways identified in less physiological model systems.

We thank Dr. V. Gómez-Vicente for critical reading of the manuscript, and A. Robles, C. Murillo, M. T. Seisdedos, and S. Hernández for technical support.

REFERENCES

Adler R. 2000. A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. Prog Retin Eye Res 19:529–557.

Anlar B, Sullivan KA, Feldman EL. 1999. Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. Horm Metab Res 31:120–125.

Bahr M. 2000. Live or let die—Retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS. Trends Neurosci 23:483–490.

Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW. 2001. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. J Biol Chem 276:32814–32821.

Bernstein HG, Reichenbach A, Kirschke H, Wiederanders B. 1989. Cell type-specific distribution of cathepsin B and D immunoreactivity within the rabbit retina. Neurosci Lett 98:135–138.

Biehlmaier O, Neuhauss SC, Kohler K. 2001. Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. Cell Tissue Res 306:199–207.

Boulton TG, Gregory JS, Cobb MH. 1991. Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. Biochemistry 30:278–286.

Boya P, de la Rosa EJ. 2005. Cell death in early neural life. Birth Defects Res C Embryo Today 75:281–293.

Buss RR, Sun W, Oppenheim RW. 2006. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. Annu Rev Neurosci 29:1–35.

Campana WM, Darin SJ, O'Brien JS. 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I- and prosaptide-induced survival in Schwann cells. J Neurosci Res 57:332–341.

Candal E, Anadon R, DeGrip WJ, Rodriguez-Moldes I. 2005. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. Brain Res Dev Brain Res 154:101–119.

Cheung EC, Slack RS. 2004. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. Sci STKE 251: PE45.

Chwieralski CE, Welte T, Buhling F. 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. Apoptosis 11:143–149.

Cole LK, Ross LS. 2001. Apoptosis in the developing zebrafish embryo. Dev Biol 240:123–142.

Cook B, Portera-Cailliau C, Adler R. 1998. Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. J Comp Neurol 396:12–19.

Cuadros MA, Rios A. 1988. Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. Anat Embryol (Berl) 178:543–551.

Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: Critical control points. Cell 116:205–219.

Davies AM. 2003. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. EMBO J 22:2537–2545.

de la Rosa EJ, De Pablo F. 2000. Cell death in early neural development: Beyond the neurotrophic theory. Trends Neurosci 23:454–458.

de la Rosa EJ, Diaz B, De Pablo F. 1998. Organoculture of the chick embryonic neuroretina. Curr Top Dev Biol 36:133–144.

De Pablo F, de la Rosa EJ. 1995. The developing CNS: A scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. Trends Neurosci 18:143–150.

Diaz B, Pimentel B, De Pablo F, de La Rosa EJ. 1999. Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. Eur J Neurosci 11:1624–1632.

Diaz B, Serna J, De Pablo F, de la Rosa EJ. 2000. *In vivo* regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. Development 127:1641–1649.

Donovan M, Cotter TG. 2002. Caspase-independent photoreceptor apoptosis *in vivo* and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. Cell Death Differ 9:1220–1231.

Duenker N, Valenciano AI, Franke A, Hernandez-Sanchez C, Dressel R, Behrendt M, De Pablo F, et al. 2005. Balance of pro-apoptotic transforming growth factor-beta and anti-apoptotic insulin effects in the control of cell

death in the postnatal mouse retina. Eur J Neurosci 22:28–38.

Dutting D, Gierer A, Hansmann G. 1983. Self-renewal of stem cells and differentiation of nerve cells in the developing chick retina. Brain Res 312:21–32.

Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. 2005. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: Mechanisms for providing signaling specificity. J Cell Sci 118:2997–3002.

Felbor U, Kessler B, Mothes W, Goebel HH, Ploegh HL, Bronson RT, Olsen BR. 2002. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. Proc Natl Acad Sci USA 99:7883–7888.

Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sanchez M, Martin-Partido G. 2004. Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. Anat Embryol (Berl) 208:289–299.

Garcia-de Lacoba M, Alarcon C, de la Rosa EJ, De Pablo F. 1999. Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. Endocrinology 140:233–243.

Garcia-Porrero JA, Colvee E, Ojeda JL. 1984. Cell death in the dorsal part of the chick optic cup. Evidence for a new necrotic area. J Embryol Exp Morphol 80:241–249.

Garcia-Porrero JA, Ojeda JL. 1979. Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study. Experientia 35:375–376.

Gaze RM, Grant P. 1992. Spatio-temporal patterns of retinal ganglion cell death during *Xenopus* development. J Comp Neurol 315:264–274.

Gleichmann M, Weller M, Schulz JB. 2000. Insulin-like growth factor-1-mediated protection from neuronal apoptosis is linked to phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD but not to inhibition of cytochrome *c* translocation in rat cerebellar neurons. Neurosci Lett 282:69–72.

Hamburger V, Hamilton H. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88:49–92.

Hensey C, Gautier J. 1998. Programmed cell death during *Xenopus* development: A spatio-temporal analysis. Dev Biol 203:36–48.

Hernandez-Sanchez C, Lopez-Carranza A, Alarcon C, de la Rosa EJ, De Pablo F. 1995. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: Local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. Proc Natl Acad Sci USA 92:9834–9838.

Hughes A. 1975. A comparison of retinal ganglion cell topography in the plains and tree kangaroo. J Physiol 244:61P–63P.

Hughes WF, McLoon SC. 1979. Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: Comparisons with cell death induced by early target field destruction. Exp Neurol 66:587–601.

Jaattela M, Tschopp J. 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. Nat Immunol 4:416–423.

Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 298:1911–1912.

Joza N, Kroemer G, Penninger JM. 2002. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. Trends Genet 18:142–149.

Kinkl N, Hageman GS, Sahel JA, Hicks D. 2002. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) and candidate signalin molecule distribution within rat and human retina. Mol Vis 8:149–160.

Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nakanishi H, Koga T, Kametaka S, Waguri S, et al. 2003. Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. Mol Cell Neurosci 22:146–161.

Kojima M, Asahi M, Kikuchi H, Hashimoto N, Noda M, Hoshimaru M. 1998. Expression of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) in the developing rat retina. Neurosci Res 31:211–217.

Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P. 2000. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. Trends Neurosci 23:291–297.

Leist M, Jaattela M. 2001a. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 2:589–598.

Leist M, Jaattela M. 2001b. Triggering of apoptosis by cathepsins. Cell Death Differ 8:324–326.

Livesey FJ, Cepko CL. 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. Nat Rev Neurosci 2:109–118.

Lossi L, Merighi A. 2003. *In vivo* cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. Prog Neurobiol 69:287–312.

Marin-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascues J. 1999. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. J Comp Neurol 412:255–275.

Martin-Partido G, Rodriguez-Gallardo L, Alvarez IS, Navascues J. 1988. Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. Anat Rec 222:272–281.

Mayordomo R, Valenciano AI, de la Rosa EJ, Hallbook F. 2003. Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. Eur J Neurosci 18:1744–1750.

Pequignot MO, Provost AC, Salle S, Taupin P, Sainton KM, Marchant D, Martinou JC, et al. 2003. Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. Dev Dyn 228:231–238.

Pimentel B, Sanz C, Varela-Nieto I, Rapp UR, De Pablo F, de la Rosa EJ. 2000. c-Raf regulates cell survival and retinal ganglion cell morphogenesis during neurogenesis. J Neurosci 20:3254–3262.

Politi LE, Rotstein NP, Salvador G, Giusto NM, Insua MF. 2001. Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. J Neurochem 76:1199–1211.

Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez R, Ramirez G. 1991. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. Eur J Neurosci 3:559–569.

Rager G, Rager U. 1979. Systems-matching by degeneration in the developing retino-tectal projection of the chicken. Prog Brain Res 51:439–443.

Rhee KD, Yang XJ. 2003. Expression of cytokine signal transduction components in the postnatal mouse retina. Mol Vis 9:715–722.

Robinson SR. 1988. Cell death in the inner and outer nuclear layers of the developing cat retina. J Comp Neurol 267:507–515.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 69:217–245.

Strongin AC, Guillery RW. 1981. The distribution of melanin in the developing optic cup and stalk and its relation to cellular degeneration. J Neurosci 1:1193–1204.

Subramaniam SSN, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker KI. 2005. Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. J Neurosci 25:2838–2852.

Trousse F, Esteve P, Bovolenta P. 2001. Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. J Neurosci 21:1292–1301.

Valenciano AI, Corrochano S, De Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ. 2006. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. J Neurochem 99:524–536.

Varela-Nieto I, de la Rosa EJ, Valenciano AI, Leon Y. 2003. Cell death in the nervous system: Lessons from insulin and insulin-like growth factors. Mol Neurobiol 28:23–50.

Vecino E, Hernandez M, Garcia M. 2004. Cell death in the developing vertebrate retina. Int J Dev Biol 48:965–974.

Wada T, Penninger JM. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 23:2838–2849.

Wasselius J, Wallin H, Abrahamson M, Ehinger B. 2003. Cathepsin B in the rat eye. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 241:934–942.

White MF. 1998. The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. Mol Cell Biochem 182:3–11.

Willaime-Morawek S, Arbez N, Mariani J, Brugg B. 2005. IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2? Brain Res Mol Brain Res 142:97–106.

Yeo W, Gautier J. 2004. Early neural cell death: Dying to become neurons. Dev Biol 274:233–244.

Yuan J, Lipinski M, Degterev A. 2003. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. Neuron 40:401–413.