

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE LLEIDA**

**REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE c-JUN DURANT
EL DESENVOLUPAMENT DE LES MOTONEURONES ESPINALS**



Tesi presentada per M^a. Victòria Ayala Jové per tal d'accedir
al grau de Doctora en Biologia
Febrer de l'any 2001

**Aquesta Tesi Doctoral s'ha realitzat sota la codirecció dels
Drs. Joan Ribera Calvet i Josep Esquerda Colell
en la Unitat de Neurobiologia Cel·lular
del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
de la Universitat de Lleida**

Lleida, febrer de l'any 2001

AI LLORENÇ

AGRAÏMENTS

Als Drs Josep E. Esquerda i Joan Ribera, directors d'aquesta tesi.

Al Joan per la seva amistat, per tot el que m'ha ensenyat durant aquests anys, i també perquè sense ell aquesta tesi no hagués estat mai possible.

Al Josep per la seva professionalitat, per permetre la meva incorporació en aquest grup i sobretot per la seva amabilitat i paciència.

Al Jordi per les seves aportacions en aquest treball, pels seus consells i per ser el responsable del meu aterratge a aquest laboratori.

A la Cèlia per compartir laboratori durant aquests anys, i per les seves aportacions en aquest treball.

A la Dolors per la seva confiança i suport moral, per tot el que he après d'ella que tant sovint m'ha fet veure que no tot és ciència.

A l'Anna per la seva professionalitat i dedicació, per la seva qualitat humana i sobretot per la seva amistat incondicional.

A l'Olga per la seva amistat i pel seu suport en els moments difícils.

A la Jerònia per tot el que ha comportat començar juntes les nostres tesis, per la seva confiança i estimació i per tantes coses que no hi cabrien en aquesta pàgina.

A la Maite per la seva amistat i per la seva disponibilitat d'ajudar-me en tot moment.

A l'Ester Vázquez i la Carme Gerri pel seu ajut tècnic i també humà.

Al Xavier Calomarde i l'Anna Martínez pel seu ajut i sobretot per la seva amistat.

A l'Anna Ñaco per tots els moments increïbles que hem viscut juntes, per la seva amistat, perquè em va ensenyar moltíssimes coses quan vaig arribar al laboratori i sobretot per la seva qualitat humana.

Al Dr. Isidre Ferrer per les seves suggerències i interès pel meu treball.

Al Sr. Mateu per les seves aportacions lingüístiques i pel seu esforç diari en defensar la nostra llengua.

A la Montse Iglesias, a la Gemma Bellí, a la M^a Josep, a la Rosa, a l'Elisa, al Jacint, al Carles Coca pel seu ajut i suport moral, i a tots els companys i amics del departament, pels seus ànims, pels esmorzars tan constructius que hem compartit. Per tots aquells moments que no he estat pensant amb la ciència.

A tots els meus amics, en especial, a la Isa i al Vicent, Bugs i els altres, que són els millors. A la Silvia, Carles, Carlitos, Andrea, pel seu afecte i estimació. A tota la meva família.

A la Carme i al Llorenç, per la seva bondat, per suportar la distància d'aquests anys i per ser tant pacients.

A la meva germana i al Ramon per la seva generositat i pel seu suport incondicional.

Als meus pares per la seva comprensió i damunt de tot per ser com són.

A tu Enzo perquè t'ho mereixes.

Gràcies a tots vosaltres.

ÍNDIX

I. ABREVIATURES	1
II. RESUMEN	5
III. OBJECTIUS	9
IV. INTRODUCCIÓ	13
1.Mort cel·lular programada en el sistema nerviós durant el desenvolupament.	15
1.1.Introducció.	15
1.2.Poblacions afectades per la PCD.	16
1.3.Significat funcional de la PCD.	17
1.4.La PCD durant el desenvolupament de la medul·la espinal de l'embrió de pollastre.	19
1.5.Factors implicats en la regulació de la PCD neuronal durant el desenvolupament del SN.	20
1.5.1.Regulació cel·lular de la PCD neuronal. Paper de les neurotrofines.	20
1.5.2.Altres factors implicats en la regulació de la PCD neuronal.	23
2.Les diverses formes de mort cel·lular.	25
2.1.La mort necròtica.	25
2.2.La mort apoptòtica.	25
2.2.1.Fases de l'apoptosi.	27
2.2.2.Factors genètics que intervenen en el control i l'execució de la mort cel·lular apoptòtica.	28
3.Excitotoxicitat.	31
4.Efecte neuroprotector del NMDA en MNs durant el desenvolupament.	33
5.Factors de transcripció: proteïnes activadores AP-1.	33
5.1.Estructura del complex AP-1.	35
5.2.Regulació dels factors de transcripció AP-1.	36
5.2.1.Regulació a nivell transcripcional.	36
5.2.2.Regulació a nivell de proteïna.	37

5.2.2.1.Per interaccions amb d'altres proteïnes.	37
5.2.2.2.Per fosforilació/defosforilació.	38
5.3.El factor de transcripció c-Jun.	41
5.3.1.Expressió Basal de c-Jun en el SN.	41
5.3.2.Funcions de c-Jun.	42
5.3.2.1.Proliferació i transformació.	42
5.3.2.2.Diferenciació.	42
5.3.2.3.Apoptosi.	43
-Estudis "in vitro".	44
-Estudis "in vivo".	47
5.3.2.4.c-Jun i axotomia.	49
5.4.Regulació de c-Jun mitjançada per Ca ⁺⁺ .	51
5.5.c-Jun i activitat epilèptica.	52
V. MATERIAL I MÈTODES.	55
1.Model animal d'experimentació.	57
2.Estudis morfològics.	57
2.1.Fixació dels embrions.	57
2.2.Inclusió en parafina.	57
2.3.Microtomia.	57
2.4.Tincions.	58
2.4.1.Preparació del colorant.	58
2.4.2.Protocol de la tinció amb tionina.	58
3.Comptatges cel·lulars.	58
4.Immunohistoquímica.	59
4.1.Immunoperoxidasa amplificada amb níquel.	60
4.2.Immunofluorescència.	61
4.2.1.Doble marcatge per immunofluorescència amb dos anticossos primaris policlonals: c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada.	62
4.3.Comptatges realitzats en els estudis immunohistoquímics.	64
5.TUNEL.	64
6.Estudis de microscòpia electrònica.	65
6.1.Microscòpia electrònica convencional.	65

6.2.Immunohistoquímica.	66
6.2.1.Procediment per preinclusió.	66
1) Immunoperoxidasa.	66
2) Immunohistoquímica amb or col·loidal.	67
6.2.2.Procediment per crioultramicrotomia.	68
-Immunohistoquímica amb crioseccions.	68
7.Hibridació <i>in situ</i>.	68
7.1.Obtenció de la ribosonda.	69
7.1.1.Purificació i linearització.	69
7.1.2.Transcripció.	70
7.2.Extracció de les mostres.	70
7.3.Tractament del teixit.	71
7.4.Tractament amb RNasa com a control de la hibridació.	71
7.5.Hibridació.	72
7.6.Rentats astringents.	73
7.7.Detecció de la hibridació.	73
8.Anàlisi de Western-blot.	74
8.1.Preparació de les mostres.	74
8.2.Electroforesi.	75
8.3.Transferència.	76
9.Experiments <i>in vitro</i> i <i>in situ</i> per la inducció proteolítica mitjançada per la caspasa-3.	78
10.Experiments farmacològics.	79
10.1.Tractament amb un agonista del receptor NMDA.	79
10.1.1.Tractament agut amb NMDA.	79
10.1.2.Tractament crònic amb NMDA.	80
10.2.Tractament amb β -Bgtx.	80
10.3.Tractaments crònics amb muscimol i bicuculina.	81
11.Estudis de motilitat de l'embrió.	82
12.Operacions d'ablació de l'esbós de l'extremitat (LBR).	83
13.Axotomia.	83

14.Anàlisi estadística dels resultats.	83
VI. RESULTATS.	85
1.Caracterització dels antocossos anti-c-Jun utilitzats.	87
2.Expressió de c-Jun durant la PCD natural o induïda de les motoneurons espinals lumbar de l'embrió de pollastre.	90
2.1.Expressió i localització de c-Jun.	90
2.2.Canvis en els nivells de c-Jun durant el període de la PCD.	93
2.2.1.Anàlisi de Western Blot.	93
2.2.2.Immunohistoquímica.	94
2.3.Expressió de c-Jun en la PCD induïda per β -Bgtx.	96
2.4.Canvis en la localització i en els nivells de la JNK1 en la mort induïda per β -Bgtx.	101
2.5.Paper de c-Jun en la PCD de les motoneurons induïda per l'ablació perifèrica de les dianes.	103
2.6.Estudi de la immunoreactivitat de c-Jun durant el tractament crònic amb NMDA.	107
2.7.Estudi de la immunoreactivitat de c-Jun durant el tractament crònic amb muscimol.	108
2.8.El tractament crònic amb muscimol protegeix les MNs de la PCD.	111
2.9.Perfil de supervivència de les MNs espinals lumbar durant el període de la PCD mitjançada per muscimol.	113
2.10.El rescat de les MNs per muscimol podria estar relacionat amb una disminució de la mortalitat embrionaria.	114
3.Estudi i caracterització dels anticossos policlonals c-Jun/sc45.	115
3.1.Immunoreactivitat per c-Jun/sc-45 durant el període de PCD en les MNs lumbar de la medulla espinal i en les cèl·lules del DGR.	115
3.2.Estudi de l'expressió dels antígens detectats amb c-Jun/sc-45 en altres poblacions neuronals i no neuronals.	120
3.3.Immunoreactivitat per c-Jun/sc-45 en la PCD de les MNs induïda per diferents estímuls o factors.	123
3.3.1.Mort induïda per ablació perifèrica de les dianes.	123

3.3.2.Mort neuronal induïda per axotomia.	125
3.3.3.Mort neuronal induïda per β -Bgtx.	126
3.4.Localització ultraestructural de la immunoreactivitat per c-Jun/sc-45.	129
3.5.Associació entre la immunoreactivitat citoplasmàtica de c-Jun/sc-45 i la caspasa-3.	131
3.6.La immunoreactivitat per c-Jun/sc-45 i caspasa-3 activada no està associada a la mort per necrosi induïda per NMDA.	134
3.7.Els anticossos c-Jun/sc-45 reconeixen els epítops generats per l'activitat caspasa-3.	136
3.8.Els anticossos c-Jun/sc-45 són més sensibles que els anticossos caspasa-3 activada per a la detecció de cèl·lules apoptòtiques en seccions incloses amb parafina.	140
VII. DISCUSSIÓ.	141
1.L'anticòs monoclonal c-Jun/mAB és específic per a la detecció de c-Jun en l'embrió de pollastre.	145
2.Expressió de c-Jun en les MNs espinals de pollastre durant el desenvolupament embrionari.	146
3.L'activació de c-Jun en la PCD induïda per β-Bgtx.	148
4.Regulació de l'activació de c-Jun després de l'ablació perifèrica de les dianes.	149
5.Regulació a la baixa de c-Jun a E6 durant el tractament crònic amb muscimol o NMDA.	150
6.La inducció de c-Jun després del pic de mort podria estar relacionada amb un increment de l'activitat neuronal.	151
7.Associació entre la PCD i la immunoreactivitat citoplasmàtica de c-Jun/sc45.	152
8.La immunoreactivitat per c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada mostren una estreta correlació.	154
9.Eficiència de l'anticòs c-Jun/sc45 per la detecció de cèl·lules apoptòtiques en seccions histològiques.	155
10.Els antígens detectats per c-Jun/sc45 són producte de l'activitat	

caspasa-3.	156
VIII. CONCLUSIONS.	157
IX. BIBLIOGRAFIA.	161

I. ABREVIATURES

ABC	Avidina -Biotina Complex
AD	After-discharges
AMPA	α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionat
AMPC	Adenosil monofosfat cíclic
AP-1	Proteïna activadora 1
ASV17	Aviam sarcoma virus 17
β-Bgtx	β -Bungarotoxina
BCIP	Bromo-4-cloro-3-indolil fosfat
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell
BSA	Albúmina bovina
bZIP	Basic region leucine zipper
CaM	Calmodulina
CBP	Proteïnes tamponadores de calci
CGC	Cèl·lules granulars del cerebel
c-Jun/AB2	Anticòs c-Jun/AP1 (Ab-2)
CKII	Caseïna cinasa II
CNTF	Factor neurotròfic ciliar
CRE	Element de resposta a AMPc
CT-1	Cardiotrofina-1
CTFs	Factors de transcripció constitutius
DAB	3'3'-diaminobenzidina
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
E	Dia embrionari
EAs	Amino àcids excitadors
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Àcid etilediaminotetraacètic
ERK	Extracellular regulated kinase
Fas L	Fas lligant
FITC	Isitiocianat de fluoresceïna
GABA	Àcid gamma aminobutíric
GAP-43	Growth-associated protein-43
GDNF	Factor neurotròfic derivat de la glia
GSK3	Cinasa glicògen sintasa-3
IEGs	Gens d'inducció immediata
IP3	Inositol trifosfat
ISH	Hibridació in situ
ITFs	Factors de transcripció induïbles
JNK	Jun N-terminal kinase
JNKK	Jun N-terminal kinase kinase
KA	Àcid Kaínic
LBR	Ablació de l'esbós de la pota
LMC	Columna motora lateral
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitogen
MK-801	Maleat de dizolcipina
MN	Motoneurona
MUS	Muscimol

NBT	Nitroblue tetrazolium
NGF	Factor de creixement nerviós
NGS	Sèrum normal de cabra
NMDA	Àcid N-metil-D-aspartic
NOS	Sintasa de l'òxid nítric
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4/5	Neurotrofina-4/5
PARP	Anti-poly-(ADP-Ribose)-polymerase
PB	Tampó fosfat
PBS	Tampó fosfat salí
PCD	Mort cel·lular programada
PFA	Paraformaldehid
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKC	Proteïna cinasa C
SCG	Gangli cervical superior
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SN	Sistema nerviós
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
SSC	Salí citrat estàndard
ssDNA	DNA de cadena senzilla
TBS	Tampó Tris salí
TNF	Factor de necrosi tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol 13-acetat
Trk	Tropomyosin receptor kinase
TRITC	isotiocianat de rodamina
TUNEL	Terminal desoxi-UTP nick end labelling
VGCCs	canals de calci sensibles a voltatge

II. RESUM

En aquest treball s'ha estudiat la possible vinculació de c-Jun amb la mort cel·lular programada de les motoneurons que té lloc de manera natural o induïda a la medul·la espinal durant el desenvolupament del sistema neuromuscular de l'embrió de pollastre. Els nivells de c-Jun i la seva expressió s'han analitzat mitjançant diferents anticossos comercials dirigits contra diferents epítops (c-Jun/mAB, c-Jun/sc45 i AB2) i ribosondes de c-Jun. De tots els anticossos utilitzats, el monoclonal (c-Jun/mAB) va ser el més específic per a c-Jun ja que identificava amb molta afinitat una sola proteïna de 39 kD en la fracció nuclear mentre que els altres anticossos (c-Jun/sc45 i AB2) reconeixen un gran ventall de proteïnes citoplasmàtiques i nuclears de diferents pesos moleculars. A més aquests anticossos mostraven molt poca afinitat per c-Jun.

L'anticòs c-Jun/mAB marca amb diferent intensitat els nuclis grans i amb cromàtica laxa de neurones, probablement motoneurons, ubicades a l'LMC de la medul·la espinal de pollastre durant el desenvolupament. A més, ens va permetre detectar un increment de la immunoreactivitat nuclear abans de la mort cel·lular programada natural o induïda de les MNs. Aquest increment de c-Jun que tenia lloc abans de la mort estava associat a un increment de la síntesi del seu mRNA, i de la seva fosforilació a la serina 63, la qual podria estar mitjançada per la JNK1 ja que, en paral·lel, també es va observar un increment dels nivells de la JNK1 en el nucli de les motoneurons. Com l'increment dels nivells de c-Jun és produït abans de la PCD, c-Jun podria intervenir en els mecanismes moleculars de la fase d'inducció i no en els mecanismes relacionats amb l'execució de l'apoptosi a les MNs espinals.

A més, també s'ha observat una segona fase d'inducció de c-Jun després del període mort natural o induïda de les MNs que afecta a la població de motoneurons que resten viables després del procés de mort. Aquesta segona inducció de c-Jun no comporta la seva fosforilació a la serina 63 per la JNK1 i podria estar associada a l'increment de l'activitat neuronal.

Per altra banda, els anticossos policlonals c-Jun/sc45 i AB2 reconeixen antigens bàsicament citoplasmàtics que apareixen durant la fase d'execució de l'apoptosi i que no estan presents en les cèl·lules normals ni en les cèl·lules necròtiques. Aquest patró d'immunoreactivitat citoplasmàtica s'ha observat tant en les poblacions cel·lulars neuronals com en les no neuronals que pateixen mort cel·lular programada natural o induïda, incloent: les cèl·lules de Schwann, les cèl·lules musculars, les cèl·lules del mesènquima interdigital i les de la cresta i el tub neural durant els primers estadis del desenvolupament. Els nostres resultats indiquen que els determinants antigènics reconeguts per aquests anticossos apareixen com a conseqüència de l'activació de la caspasa-3 durant la fase d'execució de l'apoptosi. Així doncs, els anticossos c-Jun/sc45 i AB-2 reconeixen neoepítops generats per la caspasa-3 durant la fase d'execució de l'apoptosi i, en conseqüència, aquest anticossos podrien ser unes eines immunohistoquímiques excel·lents per detectar cèl·lules en la fase executora de la apoptosi o l'activitat de la caspasa-3 en talls histològics; essent aquests anticossos més fiables que la tècnica TUNEL per discriminar les cèl·lules amb mort apoptòtica respecte a les cèl·lules amb mort necròtica en seccions histològiques.

III. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat estudiar l'expressió de c-jun durant el desenvolupament de les motoneurons espinals de l'embrió de pollastre; estudiar la regulació de l'expressió de c-jun i les possibles implicacions en processos de mort natural o induïda experimentalment, així com la seva relació amb d'altres fenòmens necessaris pel desenvolupament i la supervivència de les motoneurons com és l'activitat neuronal.

Els objectius concrets d'aquesta tesi han estat:

- 1- Estudi del perfil d'expressió i de l'activitat funcional de c-Jun durant el principal període de mort cel·lular programada de les motoneurons espinals lumbars durant el desenvolupament de l'embrió de pollastre.
- 2- Estudi del paper de c-Jun en la mort cel·lular programada de les motoneurons induïda per β -Bgtx i per privació de les dianes perifèriques
- 3- Explorar els efectes d'agonistes gabaèrgics i glutamaèrgics sobre l'expressió i regulació de c-Jun durant el període de mort cel·lular programada per l'estudi de les possibles implicacions de c-Jun en l'activitat de les motoneurons.
- 4- A causa de la controvèrsia que existeix en quan a la implicació de c-Jun en apoptosi, deguda a que determinats anticossos podrien presentar reaccions creuades amb altres antígens, s'ha pretès estudiar i caracteritzar aquests anticossos en diferents models de mort apoptòtica tant natural com induïda durant el desenvolupament de l'embrió de pollastre.

IV. INTRODUCCIÓ

1.- MORT CEL·LULAR PROGRAMADA EN EL SISTEMA NERVIÓS DURANT EL DESENVOLUPAMENT.

1.1.- Introducció.

El sistema nerviós dels vertebrats s'origina a través d'una sèrie de processos biològics molt complexes que comporten, entre d'altres, la inducció, proliferació, migració i diferenciació de les cèl·lules neuronals. Aquests processos, finalment, determinen l'establiment d'un patró de connexions neuronals altament organitzat en l'animal adult.

La mort cel·lular és un dels processos que té lloc durant el desenvolupament de la major part d'òrgans i teixits, el qual també intervé en el desenvolupament del sistema nerviós (Glücksman, 1951; Saunders, 1966).

Els primers treballs en què es descriu el fenomen de la mort cel·lular durant el desenvolupament del sistema nerviós van ser realitzats per Beard (1896) i Collin (1906). Ernst (1926) va ser el primer que va proposar l'existència de tres tipus diferents de mort cel·lular que més tard Glücksman (1951, 1965) els va classificar com:

- *Mort cel·lular filogenètica*. Aquest tipus de mort es caracteritza per l'eliminació d'estructures que han perdut la seva funció pròpia durant el procés d'evolució (ex: la pèrdua de la cua humana).
- *Mort cel·lular morfogenètica*. Aquest tipus de mort es produeix durant el desenvolupament de patrons morfològics (ex: la formació dels dits mitjançant l'eliminació del teixit interdigital en molts vertebrats terrestres).
- *Mort cel·lular histogenètica*. Aquest tipus de mort es relaciona amb els processos d'histogènesi i de remodelació dels teixits (ex: mort neuronal durant el desenvolupament).

Els estudis experimentals realitzats per Hamburger i Levi-Montalcini, l'any 1949, van permetre donar un significat biològic a la mort natural que té lloc durant el

desenvolupament. Aquesta idea entrava en contradicció amb la que tenien la majoria de científics que consideraven que fenòmens regressius com la mort cel·lular no podien tenir lloc durant el desenvolupament embrionari; ja que no es concebia que un procés degeneratiu pogués participar en els processos que intervenen en la formació de l'embrió. El fenomen de mort es considerava més aviat propi dels processos desencadenats per lesions histopatològiques i no per processos fisiològics.

Durant els darrers 25 anys, una gran quantitat d'estudis han posat de manifest que la mort cel·lular fisiològica és un procés essencial i prou important per al desenvolupament normal del SN i d'altres teixits. La mort cel·lular fisiològica comporta una mort més o menys massiva de poblacions cel·lulars, amb uns patrons de pèrdua reproduïbles espacialment i temporalment entre els organismes d'una mateixa espècie durant el desenvolupament i que rep el nom de *mort cel·lular programada*. El qualificatiu de "programada", no vol dir que sigui un procés genèticament predeterminat o que sigui inevitable. De fet, aquest tipus de mort està regulat sobretot per senyals epigenètiques que deriven principalment de les interaccions cèl·lula-cèl·lula (Cowan et al., 1984; Hamburger i Oppenheim, 1982).

L'estudi dels mecanismes cel·lulars i moleculars que regulen la mort neuronal durant el desenvolupament ha permès conèixer millor els fenòmens que condueixen a la mort neuronal patològica.

1.2.- Poblacions afectades per la PCD.

La mort cel·lular programada és un procés molt generalitzat que s'ha descrit en diferents poblacions cel·lulars d'un gran nombre de grups taxonòmics, incloent-hi plantes i bacteris (Yarmolinsky, 1995; Greenberg, 1996; Ameisen, 1996; Vaux i Horsmeier, 1999).

En els vertebrats, la PCD també afecta la majoria de poblacions neuronals tant en el SNC com en el SNP. Les motoneurones, neurones sensorials, interneurones, neurones del sistema nerviós autònom, etc., són alguns exemples de poblacions neuronals que pateixen la PCD (revisat per Oppenheim, 1991). La proporció de neurones que moren varia entre el 20 i el 80% depenent de la població neuronal i pot

donar-se en qualsevol estadi de desenvolupament des de la neurulació fins l'establiment de les connexions sinàptiques amb les dianes i les aferències (Oppenheim, 1991; Homma et al., 1994; Blaschke et al., 1996). Les neurones dels nuclis pontins i les interneurons de la medul·la espinal de pollastre són una excepció, ja que s'ha vist que aquestes cèl·lules no degeneren durant el desenvolupament (Armstrong i Clarke, 1979; McKay i Oppenheim, 1991). Recentment, s'ha descrit que la PCD també afecta poblacions de cèl·lules no neuronals, com per exemple, cèl·lules de Schwann, oligodendròcits i astròcits (Ciutat et al., 1996; Barres et al., 1992; Krueger et al., 1995).

En la següent taula es presenten alguns exemples de mort neuronal en vertebrats:

POBLACIÓ NEURONAL		ANIMAL
Motoneurones	espinals troclears oculomotores facials	peix, granota, ratolí, rata, pollastre, humà granota, pollastre, guatlla, ànec, humà ànec, ratolí, pollastre ratolí
Gangli espinal		granota, pollastre, rata
Gangli simpàtic		pollastre
Gangli còclea		pollastre
Tèctum òptic		hàmster, pollastre, rata
Retina		ratolí, rata, conill, cobai, gat, pollastre, humà
Cerebel		pollastre, ratolí, rata
Hipocamp		ratolí, rata
Escorça cerebral		rata, gat, ratolí, hámster

Taula 1. Alguns exemples de poblacions neuronals en vertebrats que pateixen PCD (modificada d'Oppenheim, 1991).

Nosaltres ens hem centrat, preferentment, en l'estudi de la PCD en el SN de vertebrats. Especialment, estudiarem la mort de les motoneurones espinals durant diferents períodes del desenvolupament de l'embrió de pollastre.

1.3.- Significat funcional de la PCD.

La producció d'un excés de cèl·lules i la seva eliminació massiva durant el desenvolupament pot tenir diferents significats adaptatius, que depenen del tipus

d'organisme, del seu estadi de desenvolupament, del tipus de cèl·lules i de la regió en que es localitza en el SN.

Des d'un punt de vista evolutiu, una de les estratègies de defensa que adopten els organismes per combatre les infeccions virals, consisteix a activar un programa de mort que porta la cèl·lula a "suïcidar-se" evitant així la pressió selectiva a què estan sotmesos (Vaux et al., 1994; Ameisen, 1996), o com una forma d'eliminar les cèl·lules "defectuoses" que s'han produït per l'activació aberrant dels gens implicats en la regulació del cycle cel·lular.

En el SN, per exemple, en estadis inicials del desenvolupament, la mort neuronal pot contribuir a eliminar cèl·lules que migren incorrectament, que presenten mutacions letals, o bé pot intervenir en la modelació d'algunes regions del SN per crear un entorn propici que permeti el creixement axonal. En canvi, en els estadis més avançats del desenvolupament, la PCD pot tenir la funció d'ajustar numèricament poblacions de neurones que s'interconnecten o eliminar projeccions incorrectes. En la Taula 2, s'inclouen alguns exemples de les possibles funcions de la PCD.

Funcions	Exemples
1 Eliminació de cèl·lules sense funció aparent	Mort de neurones, tant en mascles com en femelles, per tal de crear estructures sexualment dimòrfiques
2 Eliminació de cèl·lules amb un fenotip inapropiat	Mort de precursors neuronals situats de regions de la medul·la espinal com la placa alar o la placa basal que careixen de neurones en l'adult
3 Formació de patrons i morfogènesi	Mort de cèl·lules de la cresta neural en segments específics del tronc de l'encèfal
4 "Matching"	Creació de nivells òptims de innervació entre grups connexos de neurones i entre neurones i les seves dianes no neuronals
5 Correcció d'errors	La mort de neurones amb connexions sinàptiques inapropiades o vies de projecció aberrants
6 Guament	La pèrdua de cèl·lules que guien la migració neuronal o el creixement axònic durant estadis específics del desenvolupament
7 Funcions transitòries	La mort de neurones sensorials motores o neurones del SNC amb una funció fisiològica durant el desenvolupament
8 Eliminació de cèl·lules perilloses	La mort de cèl·lules amb DNA anormal o infectades per virus
9 Canvis evolutius	Canvis adaptatius en la mort ontogènica i supervivència de cèl·lules en resposta a mutacions gèniques

Taula2. Alguns exemples de les possibles funcions de la PCD en el sistema nerviós (adaptat d'Oppenheim, 1999).

1.4.- La PCD durant el desenvolupament de la medul·la espinal de l'embrió de pollastre.

Durant el desenvolupament del SN es va descriure en embrions primerencs un primer període de PCD en la medul·la espinal de pollastre que tenia lloc durant la formació del tub neural (Glücksman, 1951; Silver, 1978), cosa que va fer suposar que l'eliminació de cèl·lules durant aquest període podria ser un mecanisme que servia per modelar la morfologia d'algunes regions del sistema nerviós i per facilitar el creixement axonal (revisat per Oppenheim, 1991).

La mort cel·lular programada en la medul·la espinal de l'embrió de pollastre té lloc preferentment durant tres períodes diferents del desenvolupament.

Un *primer període* té lloc entre E2-E3 i coincideix amb el període de diferenciació cel·lular que es produeix al llarg de l'eix rostre-caudal de la medul·la espinal després del tancament del tub neural. En aquest període, les cèl·lules que moren són neurones immadures o són cèl·lules precursors. S'han descrit tres zones de mort cel·lular: una localitzada en la regió més dorsal de la medul·la espinal que inclou la cresta neural, una altra que afecta la regió ventral, exceptuant la zona on es localitzaran les motoneurons i la tercera que té lloc en la placa basal. Addicionalment, s'ha observat mort cel·lular programada durant l'estadi 18, fora de la medul·la espinal, en la regió braquial, i es creu que afecta les cèl·lules de la cresta neural que estan migrant (Homma et al., 1994).

Estudis recents, indiquen que aquesta PCD que té lloc durant els períodes inicials del desenvolupament del SNC podria ser una forma de selecció negativa destinada a eliminar cèl·lules precursors que podrien tenir mutacions letals o cèl·lules amb fenotips inapropiats que tenen localització ectòpica. Aquesta mort podria afectar les cèl·lules precursors que han rebut senyals inapropiats (Burek i Oppenheim, 1999).

El *segon període* de mort cel·lular programada té lloc entre E4-E5 del desenvolupament embrionari del pollastre i afecta una subpoblació de motoneurons cervicals de la columna motora lateral situades a la regió ventral de la medul·la espinal. Aquestes MNs encara no han rebut connexions aferents i molt poques han

establert els primers contactes amb les dianes d'innervació. Es tenen evidències que demostren que la mort cel·lular en aquest període no depèn de les interaccions de les motoneurons amb les dianes i es considera que la mort podria estar regulada per interaccions amb altres cèl·lules (ex: cèl·lules glials) o per mecanismes cel·lulars intrínsecs (ex: "autocrine trophic factor loops") (Yaginuma et al., 1996).

El *tercer* i *últim període* de mort cel·lular programada té lloc entre E5 i E10-12 que afecta les motoneurons somàtiques de la banya ventral (Hamburger, 1975; Oppenheim et al., 1978) i les motoneurons viscerals en la columna de Terni (Oppenheim et al., 1982). Les MNs d'aquestes regions han iniciat l'axogènesi i han establert els primers contactes amb les dianes d'innervació. Un 50-60% de les motoneurons somàtiques pateixen PCD en la regió cervical, la toràcica i la lumbar entre E5 i E10 (Hamburger, 1975; Oppenheim i Majors-Willard, 1978; Oppenheim et al., 1978, 1989; O'Brien i Oppenheim, 1990). Les motoneurons viscerals de la regió toràcica i dels segments rostrals de la regió lumbar moren entre E10 i E12 (Oppenheim et al., 1982). La regulació de la PCD de les motoneurons durant aquest tercer període dependrà en gran part de senyals derivats de les cèl·lules diana (ex: Oppenheim et al., 1982; Calderó et al., 1997), mentre que durant els primers estadis de desenvolupament la PCD és independent de les dianes.

1.5.- Factors implicats en la regulació de la PCD neuronal durant el desenvolupament del SN.

1.5.1.- Regulació cel·lular de la PCD neuronal. Paper de les neurotrofines.

Els estudis d'Hamburger i Levi-Montalcini realitzats amb embrions de pollastre van permetre intuir el paper que exerceixen les dianes sobre la regulació de la PCD neuronal. Aquests estudis van ser essencials per fer possible postular la teoria neurotròfica, la qual suggereix que les neurones que s'han generat en excés competeixen per obtenir factors neurotròfics que són produïts en una quantitat limitada per les cèl·lules diana els quals són necessaris per la seva supervivència. Les neurones que no aconsegueixen el suport tròfic necessari per mantenir la seva viabilitat moren per PCD durant el desenvolupament (revisat per Oppenheim, 1991).

El descobriment del factor de creixement nerviós (NGF) va permetre conferir un paper molt important a les dianes en la regulació d'aquest fenomen. El NGF és sintetitzat per les cèl·lules diana que estan innervades per les neurones sensorials i simpàtiques. El NGF alliberat per les cèl·lules diana és capturat pels terminals nerviosos, és transportat retrògradament fins al soma i finalment fa possible la supervivència de les neurones sensorials i simpàtiques.

La mort cel·lular programada més ben estudiada del SN de vertebrats és la que afecta poblacions neuronals postmitòtiques durant el procés d'establiment de les connexions sinàptiques amb les seves dianes d'innervació (Hamburger i Oppenheim, 1982). La PCD en aquests estadis més avançats del desenvolupament neuronal té la funció de controlar el nombre de neurones necessàries per mantenir uns nivells òptims d'innervació. Diversos estudis demostren que el nombre de neurones que degeneren durant aquest període es pot modificar experimentalment alterant les interaccions cel·lulars (Cowan et al., 1984).

Un dels models més estudiats, és el que afecta les motoneurones espinals lumbars de l'embrió de pollastre entre E6 i E9, període en el qual s'estableixen els primers contactes amb les cèl·lules musculars (Hamburger, 1975). Durant aquest període moren aproximadament el 50% de les motoneurones generades que, prèviament, han projectat els axons a les seves dianes. Un dels experiments clàssics que permet demostrar-ho, consisteix a eliminar l'esbós de l'extremitat (LBR) abans que les masses musculars siguin innervades. Aquest tipus de lesió provoca un augment de la mort de les motoneurones que pot afectar fins al 90% de la població, durant el període de mort cel·lular programada (Hamburger, 1958; Oppenheim et al., 1978). Contràriament, al incorporar una extremitat de més (anomenada també supernumerària) s'aconsegueix una disminució significativa de la PCD, però no s'aconsegueix promoure la supervivència de totes les MNs; això ens indica que han d'existir altres mecanismes que regulen la PCD.

Durant els últims 20 anys, s'han descobert noves molècules que tenen funcions tròfiques sobre les neurones que al seu torn actuen sobre receptors específics i que promouen selectivament la supervivència d'algunes poblacions neuronals (revisat per Henderson, 1996).

Les neurotrofines són la família més coneguda de factors neurotròfics i inclouen, entre d'altres, el factor de creixement nerviós (NGF), el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) i la neurotrofina 4/5 (NT4/5). Les neurotrofines actuen sobre els receptors tirosina cinasa de la família Trk i fan possible la supervivència, la diferenciació i el creixement neuronals; efectes fisiològics sobre els quals es fonamenta la hipòtesi neurotròfica. A més, el desenvolupament neuronal requereix d'altres factors, com hormones específiques. Alguns d'aquests factors no estan presents en les dianes i sovint deriven d'altres fonts com les cèl·lules glials o les neurones que estableixen les projeccions aferents (Korsching, 1993; Davies, 1994). També, s'ha demostrat que la reducció del nombre d'*inputs* abans o durant el període de mort de les motoneurones de l'embrió de pollastre, provoca un increment en la taxa de mort (Okado i Oppenheim, 1984).

Actualment, es desconeixen quins mecanismes i factors integren les interaccions cel·lulars que estan implicades en la regulació del nombre de neurones que sobreviuen. És evident, que aquests mecanismes han de ser més complexos que els que es van proposar originalment amb la teoria neurotròfica, la qual considerava que les cèl·lules diana són l'única font de suport tròfic per la supervivència neuronal.

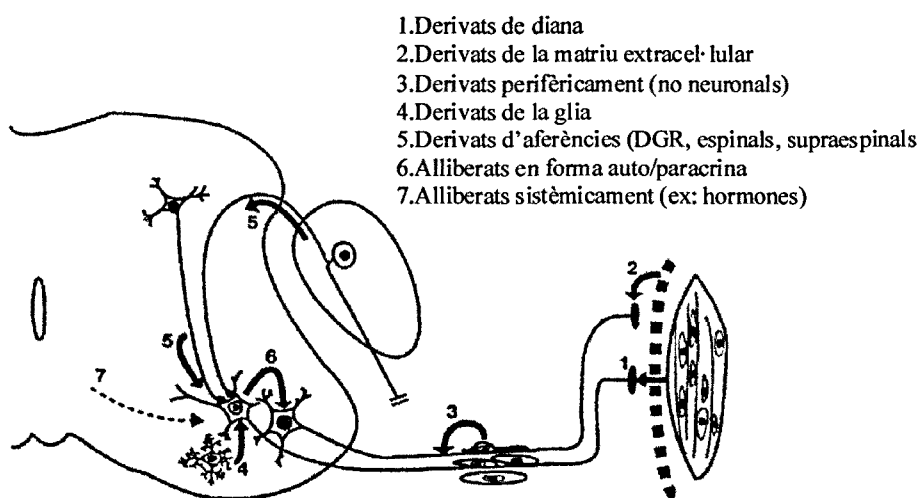


Figura 1. Diferents fonts de senyals tròfics que influeixen en la supervivència de les motoneurones (adaptat d'Oppenheim, 1996).

1.5.2. -Altres factors implicats en la regulació de la PCD neuronal.

Un factor que és molt important en la regulació de la mort neuronal programada és l'activitat elèctrica de la neurona, deguda a la transmissió sinàptica de les connexions aferents i a la dels contactes amb les cèl·lules diana; ja que si es bloqueja l'activitat neuromuscular amb agents farmacològics com el curare, o bé neurotoxines paralitzants com l' α -bungarotoxina o la toxina botulínica, que actuen a nivell de les sinapsis de les MNs durant el període de mort natural (E5-E10), és reduïda, i fins i tot es pot arribar a evitar per complet la mort de les MNs de l'embrió de pollastre (Pittman i Oppenheim, 1978, 1979; Oppenheim, 1987). A partir d'aquestes observacions s'han postulat dues hipòtesis: la de la "producció" i la de l'"accés". La primera proposa que la síntesi d'un factor tròfic derivat del múscul és inversament proporcional a l'activitat del múscul, contràriament, s'ha vist que la inactivació del múscul no augmenta la producció de factors amb activitat tròfica mesurable "in vitro". La segona hipòtesi considera que les MNs competeixen per l'accés a un factor tròfic derivat del múscul a través dels terminals sinàptics i en aquest cas, se suposa, que el factor limitant no és la producció del factor tròfic sinó el brancatge i el nombre de llocs sinàptics de les MNs amb les cèl·lules musculars (Oppenheim, 1989). Encara que cap de les dues hipòtesis es considerada definitiva, s'ha observat que el brancatge i la sinaptogènesi que han augmentat després del bloqueig de l'activitat elèctrica podria permetre que un major nombre de MNs poguessin accedir al factor tròfic (revisat per Oppenheim, 1999).

L'estudi dels mecanismes pels quals l'activitat elèctrica regula la supervivència neuronal, ha estat possible gràcies als treballs realitzats amb cultius de diferents poblacions neuronals en què es promou la supervivència cel·lular gràcies a la presència d'una concentració extracel·lular de K^+ moderadament elevada i en absència de factors neurotròfics (revisat per Franklin i Johnson, 1992).

Els ions K^+ en el medi extracel·lular provoquen la despolarització de la membrana i la subsegüent obertura dels canals de Ca^{++} depenents de voltatge de tipus L (Collins i Lile, 1989; Collins et al., 1991; Larmet et al., 1992; Franklin et al., 1995). L'entrada de Ca^{++} provoca un increment sostingut de la concentració de Ca^{++} lliure, que es considera indispensable per a la supervivència d'aquestes cèl·lules

(Collins, et al., 1991; Koike i Tanaka, 1991). Es creu que la despolarització crònica facilita la supervivència i que aquest fenomen serveix per emular algun dels aspectes de l'activitat elèctrica que operen in vivo. La calmodulina és un dels factors que participa en la regulació de la supervivència mitjançada per Ca^{++} per mecanismes independents de les vies fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) i proteïna cinasa activada per mitogen ("*mitogen activated protein kinase*" o MAPK) (Soler et al., 1998).

Encara que s'ha observat que un increment sostingut de la concentració de Ca^{++} intracel·lular pot ajudar a la supervivència de la neurona, en d'altres circumstàncies, com per exemple, l'entrada de Ca^{++} estimulada per AA excitadors a través de receptors NMDA afavoreix la mort neuronal (Choi, 1988). Per explicar aquests dos efectes oposats, s'ha postulat una hipòtesi basada en els nivells de la concentració de calci intracel·lular ($[\text{Ca}^{++}]_i$) anomenada "calcium set point hypothesis" (Johnson et al., 1992). Segons aquesta teoria existirien quatre nivells de $[\text{Ca}^{++}]_i$:

- 1) Una $[\text{Ca}^{++}]_i$ molt baixa amb la qual les cèl·lules no poden viure àdhuc amb la presència de factors tròfics.
- 2) Una $[\text{Ca}^{++}]_i$ fisiològica en què les cèl·lules dependrien dels factors tròfics per sobreviure.
- 3) Una $[\text{Ca}^{++}]_i$ moderadament alta que permetria la supervivència fins i tot en absència de factors tròfics. Aquests nivells correspondrien als nivells de calci intracel·lular que tindrien les neurones mantingudes en cultiu sota condicions despolaritzants.
- 4) Una $[\text{Ca}^{++}]_i$ molt elevada que produiria neurotoxicitat àdhuc en presència de factors tròfics.

Entre els nivells 2 i 3, el requeriment de factors tròfics seria inversament proporcional a la $[\text{Ca}^{++}]_i$. Per altra banda, la $[\text{Ca}^{++}]_i$ entre els nivells 3 i 4 definiria una concentració llindar entre l'efecte tròfic i tòxic del Ca^{++} .

Recentment, s'ha descrit que la PCD també pot estar regulada per receptors de membrana acoblats a vies intracel·lulars inductores de mort com el sistema Fas/FasL

(Nagata, 1997).

Per tant, les MNs per sobreviure, necessiten integrar diferents tipus de senyals que provenen de diverses fonts, però també cal tenir en compte que algunes MNs que entren en competició, ho fan amb algun avantatge que les diferencia de la resta a nivell d'alguns factors intrínsecs o segons l'activitat i naturalesa de la pròpia motoneurona.

2.- LES DIVERSES FORMES DE MORT CEL·LULAR.

S'han descrit bàsicament dos tipus principals de mort cel·lular, la necrosi i l'apoptosi, que tenen característiques morfològiques i bioquímiques diferents (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1981).

2.1.- La mort necròtica.

La necrosi té lloc generalment en situacions patològiques o després de lesions. Aquest tipus de mort es caracteritza per una desregulació osmòtica que comporta un edema cel·lular inicial, amb degeneració dels orgànuls citoplasmàtics, condensació modesta de la cromatina, vacuolització citoplasmàtica, i finalment, ruptura de la membrana plasmàtica i de les membranes internes produint-se l'alliberament del contingut cel·lular i la desintegració del nucli. Les restes cel·lulars són fagocitades com a conseqüència d'una resposta inflamatòria que normalment acompanya la necrosi.

2.2.- La mort apoptòtica.

Aquest tipus de mort habitualment està associada al recanvi normal dels teixits, a la mort fisiològica que té lloc en el desenvolupament i a la metamorfosi. També s'ha descrit en condicions patològiques o quan la cèl·lula és sotmesa a diferents tipus d'estrès. En les fases inicials, s'observa una reducció del volum cel·lular, la condensació de la cromatina i la preservació inicial de la integritat dels orgànuls citoplasmàtics. Les cèl·lules s'acaben trencant en fragments cel·lulars compactes,

envoltats de membrana, anomenats cossos apoptòtics que seran ràpidament fagocitats per cèl·lules especialitzades (macròfags) o per cèl·lules veïnes, evitant qualsevol tipus d'inflamació que pugui afectar altres cèl·lules adjacents. També s'han descrit una sèrie de canvis bioquímics característics de les cèl·lules apoptòtiques, com són: la presència de residus de fosfatidilserina a nivell de la membrana citoplasmàtica externa, una reducció del potencial mitocondrial, la producció de radicals oxidants en el citoplasma, la proteolisi selectiva de determinades proteïnes cel·lulars mitjançada per caspases com per exemple, la "poly-(ADP-Ribose)-polymerase" (PARP) i la fragmentació de la cromatina (Cryns i Yuan, 1998). Una de les característiques bioquímiques més emprades per la caracterització bioquímica de l'apoptosi és la detecció de la fragmentació internucleosomal del DNA en petits fragments de doble cadena o *ladder* (Wyllie, 1980). Aquests fragments tenen una longitud d'un o múltiples segments de 180-200 parells de bases (corresponents al DNA d'un nucleosoma) que migren formant un patró escalonat (*laddering*) quan s'analitzen en gels d'agarosa. La fragmentació del DNA de les cèl·lules apoptòtiques també es pot detectar sobre seccions de teixit o en cèl·lules aïllades mitjançant la tècnica de TÚNEL ("terminal nucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling", Gavrieli et al., 1992). En aquesta tècnica s'utilitza una transferasa terminal que catalitza la incorporació de nucleòtids marcats als extrems 3'-OH del DNA fragmentat. Cal tenir en compte, que no totes les formes d'apoptosi presenten aquest patró en escala resultant de la digestió del DNA (Barres et al., 1992; Mesner et al., 1992; Cohen et al., 1992; Oberhammer et al., 1992, 1993a, 1993b; Tomei et al., 1993) fet que reforça la importància dels criteris morfològics en la definició d'apoptosi.

Inicialment es va considerar l'apoptosi com l'únic tipus de mort que es produïa durant el desenvolupament (Kerr et al., 1987) i molt sovint, el terme *apoptosi* s'ha utilitzat com a sinònim de *mort cel·lular programada*. Actualment, es considera que l'apoptosi fa referència a una definició morfològica d'un tipus concret de mort cel·lular que té lloc tant en situacions fisiològiques com patològiques, mentre que la PCD fa referència a una definició funcional d'un tipus de mort que té lloc durant el desenvolupament amb un patró temporal i de localització ben definida i reproduïble entre els organismes d'una mateixa espècie.

Encara que la gran majoria de neurones moren per apoptosi, s'ha de destacar que no sempre la mort cel·lular programada és apoptòtica. S'han descrit tres tipus de mort cel·lular programada durant el desenvolupament del vertebrats amb característiques morfològiques diferents: 1) apoptosi, 2) autofàgia i 3) mort citoplasmàtica; i només el primer tipus s'ajusta a la definició morfològica pròpia d'apoptosi. Però malgrat aquesta heterogeneïtat, els diferents tipus de mort que s'observen durant el desenvolupament condueixen a la pèrdua de cèl·lules aïllades amb l'absència d'una resposta inflamatòria.

Recentment s'han observat situacions intempestives de mort cel·lular que combinen aspectes propis de l'apoptosi i la necrosi i s'ha suggerit l'existència d'una major diversitat de tipus de mort cel·lular en el SN que estarien regulades per mecanismes cel·lulars i moleculars diferents (Clarke, 1990, 1999).

2.2.1.- Fases de l'apoptosi.

Els canvis moleculars i bioquímics que succeeixen durant l'apoptosi tenen lloc en un determinat ordre temporal. Pittman et al., (1999) van proposar un model hipotètic en què es poden distingir aquests canvis en les diferents fases d'apoptosi:

-Fase d'inducció (o d'iniciació): Consisteix en l'activació de diferents vies de transducció de senyal, incloent l'activació de gens d'inducció immediata (IEGs). L'element desencadenant pot ser un senyal extracel·lular o intracel·lular que sigui capaç d'induir l'apoptosi de manera fisiològica o patològica.

-Fase de propagació: En aquesta fase el senyal inicial s'amplifica a través de vies intracel·lulars que depenen de la síntesis de proteïnes "de novo" i que produeixen canvis que afectaran les funcions normals de la cèl·lula.

-Fase de compromís: És el moment en què la cèl·lula pren la decisió de morir i el procés de mort cel·lular es fa irreversible. En aquesta fase estan involucrats els gens de les famílies Bcl-2 i les caspases sobre els quals convergeixen la gran majoria de vies apoptòtiques.

-Fase d'execució: En aquesta fase s'activen diferents mecanismes o molècules

efectores (endonucleases, caspases ,...) que són responsables directes dels canvis propis de l'apoptosi morfològica que comporten la degradació cel·lular.

2.2.2.- Factors genètics que intervenen en el control i l'execució de la mort cel·lular apoptòtica.

Durant els darrers 10 anys, l'esforç dedicat a estudiar el fenomen de l'apoptosi ha estat molt intens, la qual cosa ha permès obtenir grans avenços en la identificació de molècules, productes gènics i mecanismes relacionats amb l'apoptosi.

L'apoptosi es considera un procés metabòlicament actiu que és iniciat i portat a terme per l'expressió de gens específics i la transcripció de nous productes gènics que provoquen la mort cel·lular d'una manera activa. Sovint, aquest tipus de mort es pot bloquejar utilitzant inhibidors específics de la síntesi de proteïnes (Martin et al., 1988; Oppenheim et al., 1990; Scott i Davies, 1990). Molts tipus de neurones també requereixen l'expressió de gens per desencadenar el programa d'autodestrucció cel·lular. Aquesta expressió gènica pot suprimir-se amb l'aplicació de molècules neurotròfiques (revisat per Oppenheim, 1991). Però no tots els tipus de PCD són bloquejats per inhibidors de la síntesi proteica, i fins i tot, alguns d'aquests inhibidors poden induir la mort cel·lular (Raff et al., 1993; Osborne i Schwartz, 1994; Jacobson et al., 1994).

Els estudis genètics de la PCD durant el desenvolupament embrionari del nematode *Caenorhabditis elegans* van permetre identificar tres gens, ced-3, ced-4 i ced-9, que codifiquen les proteïnes Ced-3, Ced-4 i Ced-9, les quals estan implicades en la regulació i l'execució de la mort cel·lular programada. En el moment que la cèl·lula ha rebut un senyal i pren la decisió de morir s'activen Ced-3 i Ced-4 i s'inicia el programa d'execució de la mort que és irreversible i la cèl·lula acaba morint. En canvi, Ced-9 funciona com un inhibidor de la PCD i promou la supervivència cel·lular (Ellis et al., 1991).

L'apoptosi sembla ser un procés de mort cel·lular que es manté durant l'evolució; ja que s'han identificat diferents proteïnes homòlogues de Ced-3, Ced-4 i Ced-9 en mamífers que presenten una estructura i funció molt similars:

- a) Les caspases són una família de proteases citoplasmàtiques que tenen una gran homologia amb Ced-3. Aquests enzims es caracteritzen per tenir un residu de cisteïna en el seu lloc actiu i tallar les proteïnes després de restes d'aspartat (Alnemri et al, 1996). Les caspases es troben normalment a la cèl·lula com a proenzims, la seva activació té lloc per vies específiques que comporten l'activació de diferents membres de la mateixa família, les quals estableixen una cascada d'activació proteolítica que desencadenarà els canvis morfològics propis de l'apoptosi. Les caspases inactiven proteïnes necessàries pel manteniment del citoesquelet cel·lular, reparació del DNA, transducció de senyal i control del cicle cel·lular (Fraser i Evan, 1996; Nagata, 1997). En humans, s'han descrit al menys 11 membres de la família de caspases implicades en apoptosi (Chinnaiyan i Dixit, 1996; Kuida et al., 1996). La caspasa-3 és essencial en el procés de PCD de molts tipus neuronals i s'ha vist que està relacionada amb els canvis nuclears associats a l'apoptosi (Woo et al., 1998). Actualment, la detecció de l'activitat d'algunes caspases s'està utilitzant com un element més per definir la mort cel·lular amb morfologia apoptòtica de la majoria de poblacions cel·lulars (Samali et al., 1999). S'han descrit dues vies principals que condueixen a l'activació de caspases: una s'inicia a través de receptors de mort cel·lular localitzats en la superfície de la cèl·lula (ex: Fas o TNF) i l'altra s'inicia a través de canvis en la integritat mitocondrial (revisat per Nijhawan et al., 2000).
- b) En mamífers, l'homòleg de CED-4 s'anomena Apaf-1, l'Apaf-1 forma un complex multimèric amb el citocrom c, i la pro-caspasa-9. La formació d'aquest complex és essencial per activar la caspasa-9 i en conseqüència iniciar l'activació d'una cascada de caspases. El citocrom c es troba localitzat en l'espai intermembrana del mitocondri que durant l'apoptosi surt del mitocondri i en el citoplasma s'uneix a Apaf-1 i procaspasa-9 (Liu et al., 1996). L'alliberament del citocrom c del mitocondri està regulat per les proteïnes de la família Bcl-2 .

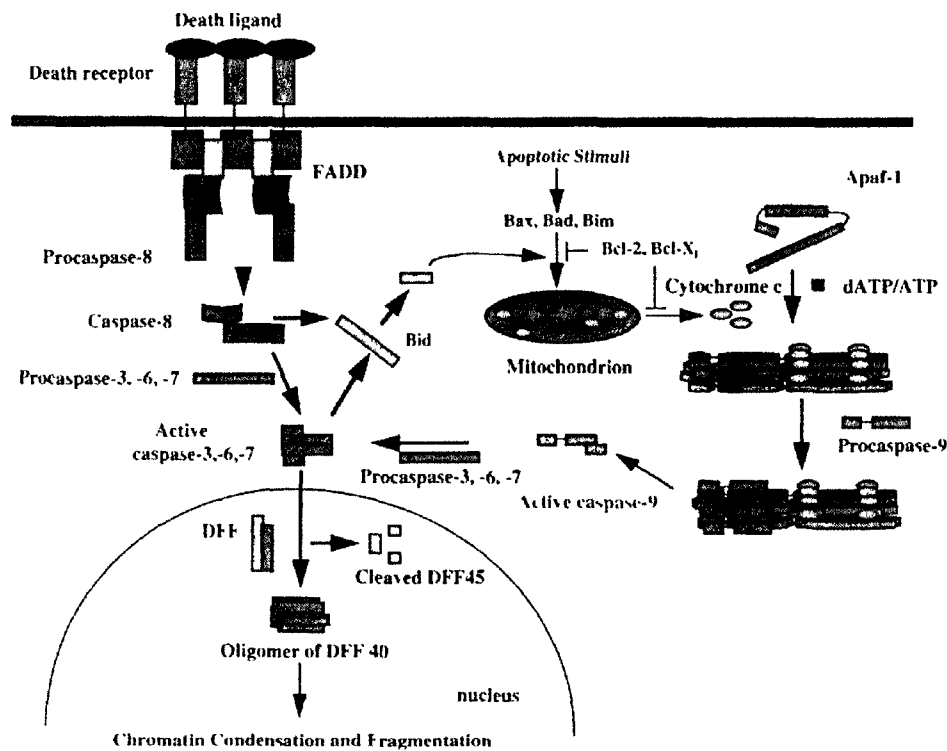


Figura 2. Representació de les dues vies principals d'activació de les caspases (adaptat de Nijhawan et al., 2000).

c) L'homòleg a ced-9, en mamífers, és l'oncogen Bcl-2 conegut per la seva implicació en un tipus de leucèmia de cèl·lules B (Bakhshi et al., 1985; Tsujimoto et al., 1985). Bcl-2 és un membre d'una família de proteïnes, algunes de les quals són inhibidores (ex: Bcl-2 i Bcl-X_l) i les altres activadores (ex: Bax, Bad, Bak i Bim) de la mort cel·lular apoptòtica (Adams i Cory, 1998). Aquestes proteïnes són components de la membrana externa del mitocondri, del nucli i de la membrana del reticle endoplasmàtic. La sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-X_l impedeix l'alliberació de citocrom c, i per tant, són agents que protegeixen les cèl·lules de la mort induïda per estímuls diversos. En canvi, la sobreexpressió de Bax o Bad, en l'absència d'estímuls de mort, provoca l'alliberament de citocrom c i en conseqüència provoca l'apoptosi. Els membres de la família Bcl-2 poden formar homo- o hetero- dímers amb altres membres de la família. Un excés

d'homodimers formats per Bax pot induir la mort cel·lular en molts sistemes, incloent el SN, però l'expressió d'heterodimers formats per Bax i Bcl-2 o Bcl-X_L pot neutralitzar aquest efecte. S'ha descrit que és necessària una translocació a la mitocondria de les proteïnes pro-apoptòtiques per produir-se l'alliberament del citocrom c (Wolter et al., 1997).

3.- EXCITOTOXICITAT

Excitotoxicitat és el terme emprat originàriament per Olney per referir-se a la capacitat del glutamat i d'altres aminoàcids excitadors per destruir neurones (Olney, 1986).

El glutamat és el neurotransmissor més comú en les sinapsis del cervell i de la medul·la espinal (Cotman et al., 1987). En l'espai extracel·lular, es troba en concentracions micromolars i quan és lliberat a la sinapsi excita gairebé totes les neurones del SNC. El glutamat actua sobre un conjunt de proteïnes transmembrana anomenats receptors de glutamat dels quals existeixen dos grans tipus:

-Els receptors ionotròpics que són canals iònics activats per lligants que, segons les seves característiques farmacològiques i electrofisiològiques, es poden dividir en tres grans classes: els receptors n-metil-D-aspartat (NMDA), els receptors kainat (KA) i els receptors α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionat (AMPA) (Hollmann i Heinemann, 1994). Els tres subtipus són permeables a Na⁺ i K⁺, mentre que només els receptors NMDA i alguns AMPA/KA presenten permeabilitat al Ca⁺⁺.

-Els receptors metabotròpics (Sugiyama et al., 1987) estan acoblats a proteïnes G que activen vies de transducció de senyals per via de segons missatgers com l'inositol trifosfat (IP3), el Ca⁺⁺ i nucleòtids cíclics.

La mort neuronal produïda per un excés de glutamat acostuma a ser de tipus necròtica i es caracteritza per l'inflament cel·lular, la vacuolització citoplasmàtica i del reticle endoplasmàtic. S'han descrit dos mecanismes de neurotoxicitat per glutamat que poden provocar una lesió neuronal irreversible. El primer depèn de les concentracions extracel·lulars de Cl⁻ i Na⁺; aquest presenta una resposta tòxica aguda que es caracteritza per l'inflament neuronal degut l'influx de Na⁺ associat a la

despolarització de la membrana, això condueix a una entrada massiva de Cl^- i aigua que provoquen l'inflament. El segon mecanisme produeix una desintegració cel·lular en el termini d'hores i depèn del Ca^{++} intracel·lular i és considerat més agressiu que el primer. En cultius de neurones corticals, la lesió mitjançada per l'activació dels receptors de glutamat pot seguir dos models principals: a) una excitotoxicitat desencadenada ràpidament, induïda per l'estimulació intensa i breu d'un gran nombre de receptors NMDA, i b) una excitotoxicitat desencadenada de forma lenta per l'estimulació prolongada dels receptors AMPA/KA (Choi, 1987, 1992). En els dos casos, l'excitotoxicitat pot esdevenir-se com a conseqüència dels augments intracel·lulars de Ca^{++} provocada per la sobreexcitació de neurones, que generalment comporta una excessiva activació dels receptors ionòtròpics de glutamat, i en especial dels receptors NMDA, que presenten una gran permeabilitat pel Ca^{++} . L'increment dels nivells de Ca^{++} intracel·lular per l'activació dels receptors de glutamat és deguda a l'entrada i/o alliberament dels reservoris intracel·lulars. El Ca^{++} intracel·lular és important en molts processos fisiològics, però quantitats excessives poden contribuir a la sobreestimulació dels processos normals i provocar lesió neuronal. L'activació dels receptors NMDA i els increments neuronals de Ca^{++} poden activar una gran quantitat d'enzims, entre els que s'inclouen la PKC, fosfolipases, proteases, proteïnes fosfatases i la NOS, elements que provoquen la degeneració de la cèl·lula degut a la proteòlisi, la formació de radicals lliures i la peroxidació de lípids, entre d'altres. A més d'estimular proteïnes del citoplasma, el Ca^{++} també pot activar endonucleases de manera que s'arriba a la condensació de la cromatina nuclear i fragmentació del DNA (Lipton i Rosenberg, 1994).

En motoneurones, s'ha descrit l'excitotoxicitat derivada de l'activació dels receptors AMPA/KA i NMDA (Rothstein et al., 1993; Carriedo et al., 1996; Calderó et al., 1997; Terro et al., 1998). Experiments realitzats in "vivo", demostren que les motoneurones de pollastre en desenvolupament també tenen receptors per EAAs que quan són activats amb diferents agonistes poden induir una lesió excitotòxica en les motoneurones. En aquest model s'ha vist que l'NMDA és un poderós agent excitotòxic, encara que menys potent que l'AMPA o el KA (Calderó et al., 1997).

Recentment s'ha suggerit que l'activació de receptors de glutamat pot induir un

tipus de mort necròtica o apoptòtica en dependència de la intensitat de l'estímul (Ankarcrona et al., 1995; Bonfoco et al., 1995; Ferrer et al., 1995; Portera-Caillau et al., 1995; Van Lookeren Campagne et al., 1995), i que ambdós tipus morfològics es poden detectar en el cervell adult en l'excitotoxicitat.

La mort excitotòxica per NMDA podria constituir una via comuna final de lesió en diversos desordres neurològics com isquèmia, trauma, epilèpsia, malaltia d'Alzheimer, Ela i altres desordres degeneratius.

4.- EFECTE NEUROPROTECTOR DEL NMDA EN MNs DURANT EL DESENVOLUPAMENT.

Contrastant amb els efectes excitotòxics que poden causar les altes concentracions d'NMDA, s'ha observat que dosis baixes d'NMDA augmenten la supervivència de les cèl·lules granulars del cerebel quan són cultivades en una concentració fisiològica de K^+ (5mM) (Balazs et al., 1988). Es considera que el glutamat pot ser tròfic o tòxic per a les neurones in "vitro" segons els nivells de calci intracel·lular que és capaç d'evocar i també per la seva capacitat de modular els factors neurotròfics (Barger i Mattson, 1995). Recentment, s'ha descrit que és possible rescatar les MNs de la seva mort programada mitjançant un tractament crònic amb NMDA coincidint amb el període de la PCD de les motoneurons espinals de l'embrió de pollastre (LLadó et al., 1999).

5.- FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ : PROTEÏNES ACTIVADORES AP-1.

La família de proteïnes AP-1 formada principalment pels factors de transcripció Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) i Jun (c-Jun, JunB, JunD) interactuen amb seqüències específiques del DNA per modular l'expressió d'un gran nombre de gens necessaris pel funcionament i desenvolupament de la cèl·lula. La majoria de proteïnes AP-1 són considerades factors de transcripció induïbles (ITFs), ja que s'acumulen ràpidament en la cèl·lula després de l'estimulació i solen tenir una vida mitja curta degut a la poca estabilitat del seu mRNA i del seu ràpid recanvi proteic (Curran et al., 1984; Kovary i Bravo, 1992; Chen i Shyu, 1994).

Els ITFs són proteïnes que estan codificades per gens d'inducció ràpida que reben el nom de gens de resposta immediata ("immediately early gens", IEGs) (Lau i Nathans, 1985; Almendral et al., 1988). Generalment, la inducció dels IEGs es produeix després de 5 o 10 minuts que una cèl·lula hagi rebut un estímul extern. Als ITFs també se'ls ha anomenat tercers missatgers per la seva funció reguladora en la cascada de transducció de senyals que va des de la superfície cel·lular al nucli, a més són capaços d'alterar l'expressió de gens que codifiquen proteïnes estructurals, enzims, canals iònics o neurotransmissors provocant canvis transitoris o permanents en la morfologia, l'estructura i les funcions del SN (Hughes i Dragunow, 1995).

Un altre grup de factors de transcripció preexistents o constitutius (CTFs) com les famílies ATF i CREB s'expressen en condicions basals en la cèl·lula i són els responsables de modular l'expressió dels IEGs sense que sigui necessària la seva síntesi de proteïnes de "novo" (revisat per Herdegen i Leah, 1998). En neurones del cervell s'han clonat, almenys, 500 gens de resposta immediata que codifiquen per molts tipus de proteïnes (Nedivi et al., 1993), com per exemple, els ITFs de les famílies Jun i Fos.

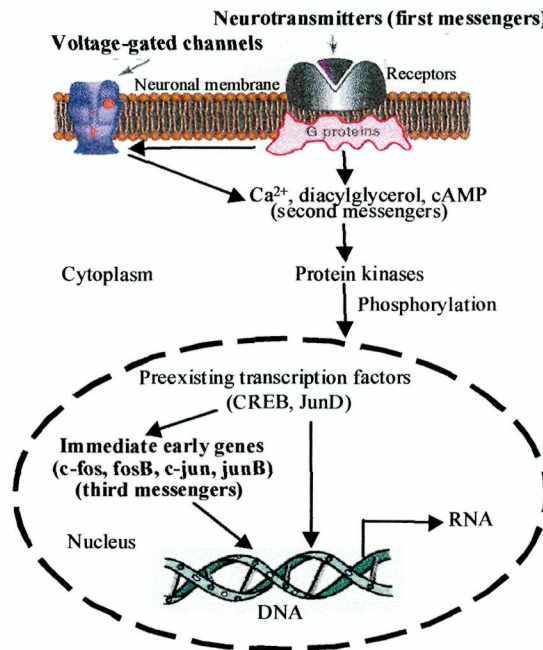


Figura 3. Representació esquemàtica de la transducció de senyal cap al nucli (adaptat de Shulman i Hyman, 1999).

5.1.- Estructura del complex AP-1.

Les proteïnes AP-1 presenten un domini bZIP en comú, que també forma part de l'estructura proteica d'altres famílies de factors de transcripció com són GCN4 de llevat, C/EBP, ATF, i CREB. Aquest domini conté una regió rica en leucines, en la qual es troba una leucina cada 7 residus, que permet formar una estructura alfa hèlix. Les hèlix- α de dos membres de la mateixa família o de famílies diferents poden interdigitar-se formant les cremalleres de leucina que són les responsables de dimeritzar aquestes proteïnes (Landschultz et al., 1988). Aquest tipus d'interacció és molt similar a la que formen els "coiled-coils" entre dos hèlix anfipàtiques mitjançant unions hidrofòbiques (O'Shea, 1989). És imprescindible que totes aquestes proteïnes AP-1 formin dímers abans d'unir-se als seus llocs específics del DNA. La formació de dímers facilita la unió al DNA a través d'una regió rica en residus bàsics que està adjacent a l'hèlix- α i que és capaç d'interactuar amb el DNA àcid de manera específica. Els dímers formen una simetria rotacional que contacta amb el DNA per bifurcació de les regions bàsiques de forma que les dues hèlixs contacten amb el DNA en direccions oposades, és per això que en el DNA es troba una diana simètrica de reconeixement (Vinson et al., 1989; Glover i Harrison, 1995).

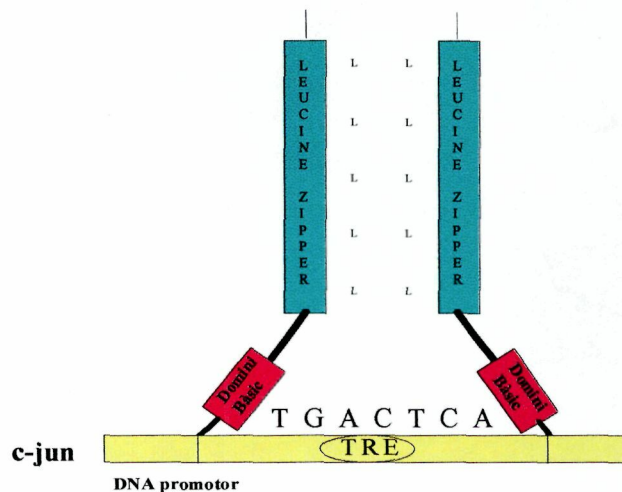


Figura 4. Representació esquemàtica del domini d'unió al DNA (Domini bàsic) i de la cremallera de leucines (Leucine zipper) d'un hipotètic dímer Jun/Fos interaccionant amb una seqüència de reconeixement (element TRE) localitzada en el promotor de c-jun (esquema modificat de Kouzarides i Ziff, 1989).

El dímers AP-1 s'uneixen preferentment a la seqüència TGACTCA del DNA coneguda també com element de resposta a l'ester forbol 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetat (element resposta a TPA, o TRE), o lloc AP-1 que s'activa via proteïna cinasa C (PKC). Aquesta seqüència és present en el promotor de molts gens i es diferencia només per una sola base amb l'element de resposta a AMPc (CRE). En principi, es pensava que els components de les famílies de factors de transcripció constitutius ATF i CREB, només reconeixien l'element CRE. Recentment, s'ha vist que ATF2, component de la família ATF, també pot formar dímers amb c-Jun i unir-se a TRE. Addicionalment, s'han identificat altres proteïnes bZip que poden formar dímers amb membres de la família AP-1 (ex: Maf i Nrl) i que poden unir-se a elements CRE o TRE. Aquest fet implica que es poden generar un nombre molt elevat de combinacions de dímers AP-1 (Karin et al., 1997).

5.2.- Regulació dels factors de transcripció AP-1.

Els mecanismes que regulen l'activació dels dímers AP-1 són molt complexos i l'expressió dels diferents components AP-1 serà diferent segons el tipus de cèl·lula, l'estadi de maduració, o també segons el tipus d'estímul concret al que la cèl·lula s'hagi sotmès. L'expressió selectiva d'aquests factors de transcripció està relacionada amb la regulació de diferents canvis funcionals de la cèl·lula. Com a mínim, existeixen tres mecanismes diferents a través dels quals es regula l'activació dels membres Jun i Fos: un a nivell de síntesi, que afecta la transcripció i els altres dos a nivell de proteïna.

5.2.1.- Regulació a nivell transcripcional:

Els gens que codifiquen les proteïnes AP-1 contenen seqüències específiques en el seu promotor, a les quals s'uniran factors de transcripció que n'activaran la transcripció:

El promotor de c-jun conté diversos llocs d'unió per als factors de transcripció com TFIID, Sp1, CTF, NF, SRF, CREB/ATF i dos llocs AP-1/TRE. Un dels llocs AP-1/TRE o jun1 és sensible a l'estimulació per ésters de forbol, per receptors

NMDA i per la via AMPc de senyalització. L'altre lloc, AP-1/TRE o jun2 està localitzat en la regió més distal del promotor de c-jun i és el responsable de la presència constitutiva de c-Jun i s'activa via ATF2. (Angel et al., 1988; de Groot et al., 1991b; Han et al., 1992; Hagmeyer et al., 1993; Rozek i Pfeifer, 1993; Van Dam et al., 1993). Una de les característiques més destacades del promotor de c-jun és l'autoregulació. c-Jun és capaç d'unir-se al promotor del seu propi gen i d'activar-lo, provocant efectes prolongats de l'expressió gènica induïda per senyals transitòris (Angel et al., 1988; Brenner et al., 1989).

Els elements SRE, CRE i AP-1/TRE del promotor de junB són els responsables de l'estimulació de jun B per sèrum, TPA, AMPc i per factors de creixement. El SRE1 de jun B i el SER de c-fos són molts similars, i ambdós estan regulats per diversos estímuls tant fisiològics com patològics i també per la PKC (Apel et al., 1992; Phinney et al., 1994).

El promotor de junD conté un lloc d'unió per Oct1, 4, 5, 6, i altres proteïnes que regulen l'expressió constitutiva de Jun D en moltes subpoblacions neuronals (De Groot et al., 1991a). Els elements AP-1, CRE, SP-1 i EGR també formen part d'aquest promotor però són significativament molt menys induïbles que els mateixos llocs d'unió trobats en els promotors de la família fos.

c-fos conté en el seu promotor SIE, SER, AP-1/CRE, i CRE. L'element SER s'activa per ésters de forbol, radiacions ionitzants i alteracions dels nivells de calci que entra via receptors NMDA. El lloc AP-1 es troba localitzat molt pròxim de SER i té un paper molt important, ja que inhibeix la transcripció de c-Fos. L'element CRE s'activa per l'estimulació de canals dependents de voltatge (Angel i Karin, 1991; Ginty et al., 1994; Karin, 1994; Edwards, 1994).

5.2.2.- Regulació a nivell de proteïna.

5.2.2.1.- Per interaccions amb d'altres proteïnes.

Les proteïnes AP-1 s'associen entre elles o amb d'altres proteïnes per formar una àmplia diversitat de dímers responsables de la regulació transcripcional dels seus

gens diana. L'eficàcia en la transcripció d'aquests gens ve determinada per l'estabilitat i afinitat de cada dímer per interactuar amb el DNA. Així, per exemple, mentre els dímers c-Fos/c-Jun són activadors de les regions AP-1, els dímers JunB/c-Jun poden ser inhibidors en diferents circumstàncies (Chiu et al., 1989; Schütte et al., 1989).

Els membres de la família Fos no formen dímers amb si mateixos, en canvi, els membres de la família Jun poden formar homodímers, encara que són menys estables i presenten menys afinitat pels llocs AP-1 (Sassone-Corsi P et al., 1988). c-Jun és el membre de la família AP-1 que és capaç de formar més diversitat de dímers. Alguns dels factors amb què formarà heterodímers són Fos, ATF-2, MyoD, CBP i Rel/Nfκb. L'activitat transcripcional AP-1 també es pot regular mitjançant la interacció física dels diferents homodímers i heterodímers amb d'altres proteïnes com IP1, un inhibidor de Jun/Fos (Auwerx i Sassone-Corsi, 1991) o Jif-1, un inhibidor de Jun/Jun (Monteclaro i Vogt, 1993).

5.2.2.2.- Per fosforilació/defosforilació:

La fosforilació és un dels mecanismes de regulació més importants de les proteïnes AP-1 el qual pot tant activar com inhibir la unió al DNA, la seva dimerització i la seva activitat transcripcional.

L'activitat transcripcional de c-fos està regulada per la cinasa FRK, estimulada via Ras en resposta a factors de creixement, que fosforila la Thr-232 localitzada en el domini c-terminal de c-Fos (Deng i Karin, 1994). c-Fos també pot ser fosforilat per ERK "in vitro" (Bannister et al., 1994). Per altra banda, en el domini N-terminal totes les proteïnes Fos contenen un domini inhibidor anomenat ID1 (Joos et al., 1994; Brown et al., 1995).

El component AP-1 més ben estudiat és c-Jun, que presenta, com a mínim, cinc llocs regulats per la fosforilació de residus serina i treonina mitjançada per diferents tipus de proteïnes cinases.

Tres d'aquests residus (Thr-231, Ser243 i Ser 249) estan localitzats en el domini c-terminal de la proteïna i quan es fosforilen regulen negativament la

transcripció de c-Jun (revisat per Herdegen i Leah, 1998). Aquests residus poden estar fosforilats per:

-la caseïna cinasa II (CKII), que és capaç d'inhibir la unió dels homodímers c-Jun al DNA, però no és capaç de fosforilar heterodímers c-Jun/c-Fos "in vitro".

-la cinasa glicògen sintasa-3 (GSK3) que al fosforilar c-Jun disminueix la seva afinitat pel DNA i la seva activitat transcripcional "in vitro" o "in vivo". L'activitat d'aquesta cinasa pot ser inhibida per PKC.

-la DNA-PK fosforila un sol residu del domini c-terminal sense afectar la unió c-Jun-DNA.

-PKA i ERK-1 fosforilen c-Jun i c-Fos però no afecten ni la seva unió al DNA ni la seva dimerització.

L'activitat transcripcional de la proteïna c-Jun ve regulada sobretot per la fosforilació dels aminoàcids ser-63 i ser-73 localitzats en el domini amino terminal. La fosforilació en aquest nivell pot modular l'afinitat de c-Jun per als diferents elements del seu promotor. Els experiments "in vitro" suggereixen que c-Jun pot ser fosforilat per PKC, ERK-1 i ERK-2, però no sempre es correlaciona l'activitat d'aquestes cinases amb l'estat de fosforilació de c-Jun (revisat per Herdegen i Leah, 1998).

Les proteïnes c-Jun-N-terminal cinases (JNKs) fosforilen c-Jun específicament en les ser-63 i 73 del domini N-terminal, la qual cosa comporta la seva activació. El factor de transcripció c-Jun presenta una vida mitja curta i es degrada molt ràpidament al proteosoma després de ser ubiquitinitzat. La fosforilació de c-Jun induïda per les JNKs bloqueja la ubiquitinització de manera que evita la degradació de c-Jun i, en conseqüència, promou un increment en la vida mitja de c-Jun degut a l'acumulació de la proteïna (Fuchs et al., 1996; Musti et al., 1997). S'ha demostrat que un increment en els nivells de c-Jun contribueix a l'activació transcripcional d'AP-1 via JNKs. La interacció de c-Jun i JNK sembla ser un requisit necessari perquè es produeixi la reacció de fosforilació. El lloc d'interacció d'ambdós es localitza en el domini delta de c-Jun, ubicat entre els aminoàcids 30-60 el qual està fora dels llocs de fosforilació per JNK.

Les JNKs també poden fosforilar altres proteïnes nuclears com ATF2 o Elk-1 (Kallunki et al., 1994; Cavigelli et al., 1995; Gupta et al., 1995; Zink et al., 1995), proteïnes citoplasmàtiques, del citoesquelet, la p53 o el Bcl-2 (revisat per Mielke i Herdegen, 2000).

Les c-Jun-N-terminal cinases (JNKs) són conegudes també amb el nom de proteïnes cinases activades per estrès (SAPKs), les quals juntament amb les ERKs i les p38 cinases formen part de la família de les MAPK. En el cervell, fins al moment, s'han aïllat 10 isoformes JNKs que deriven del processament alternatiu dels transcrits JNK1, JNK2 i JNK3 que estan codificats segons tres gens diferents *jnk1*, *jnk2*, *jnk3*. Les JNKs 1 i 2 es troben en la majoria de teixits, mentre que la JNK3 és localitzada en el cervell, al cor i als testicles. De moment, no s'han trobat diferències funcionals clares entre les diferents isoformes "in vivo", però "in vitro" les JNK1 i JNK2 presenten un dels "splicing" alternatius en la regió d'unió al substracte cosa que podria determinar d'alguna manera el seu grau d'especificitat i que podria afectar la seva funció i la de c-Jun (revisat per Mielke i Herdegen, 2000).

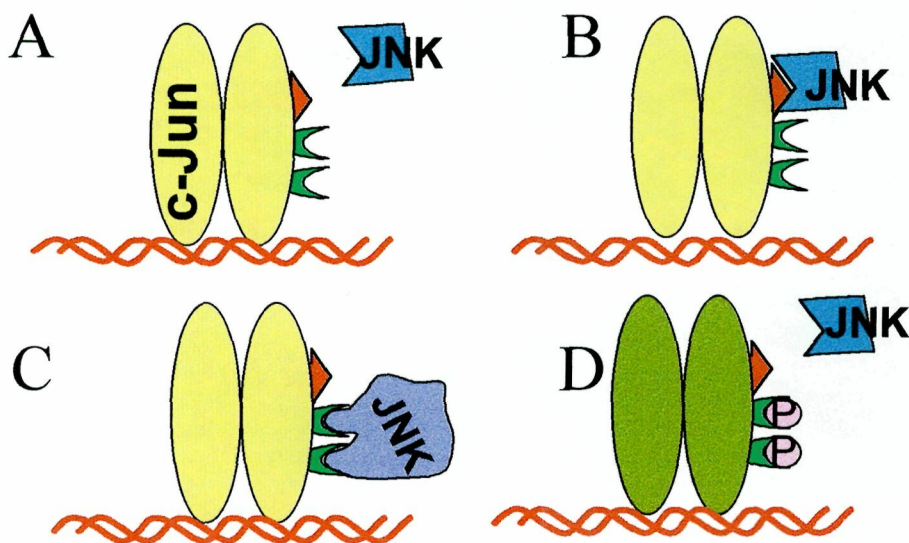


Figura 5. Representació esquemàtica del model dels mecanismes de reconeixement i fosforilació de c-Jun per la JNK (modificat de Mielke and Herdegen, 2000). (A i B) La JNK reconeix c-Jun i interactua amb ell en la regió compresa entre els aminoàcids 30-60, localitzada en el domini delta de c-Jun. Aquesta interacció és un prerequisite previ a la fosforilació. (C) Després de dissociar-se del lloc de reconeixement de c-Jun, (D) la JNK fosforila les serines 63 i 73. (E) La JNK és redistribueix pel citoplasma o és degradada en el nucli (Kallunki et al., 1996).

5.3.- El factor de transcripció c-Jun.

c-Jun va ser identificat, originalment, en vertebrats gràcies a la seva homologia amb l'oncogen v-jun del "avian sarcoma virus 17" (ASV17), un retrovirus causant del fibrosarcoma en el pollastre (Maki et al., 1987). Més tard, es va caracteritzar com el principal factor de transcripció dins del complex AP-1 codificat per IEGs. En el genoma humà c-jun està localitzat en la regió p31-p33 del cromosoma 1.

Aquest gen presenta diferències en el domini N-terminal, on s'ha vist que hi ha una variabilitat del 80% entre les diferents espècies (canari, ratolí, humà, pollastre). En canvi, el domini c-terminal que conté la regió bàsica d'unió al DNA i la cremallera de leucines està molt conservat i té un 100% d'homologia (revisat per Herdegen i Leach, 1998).

5.3.1.- Expressió Basal de c-Jun en el SN.

Malgrat que els ITF originalment van ser definits com agents d'inducció ràpida i transitòria, moltes àrees del sistema nerviós no estimulades "in vivo", mostren nivells basals de Fos i Jun, la qual cosa fa pensar que aquestes proteïnes poden existir en la cèl·lula constitutivament i intervenir en el control de la transcripció en situacions fisiològiques (Hughes et al., 1992). En moltes regions del sistema nerviós adult s'ha observat l'expressió constant d'ITFs concretament en neurones que reben contínuament "inputs" sinàptics. Aquesta expressió basal va ser observada inicialment en els animals control que es van utilitzar en molts experiments en què s'estudiava l'expressió dels ITFs després de diferents estímuls. Es considera que c-Jun pot tenir un paper essencial en l'ontogènia del SN ja que s'ha vist que c-Jun era necessari per al funcionament neuronal, no només, després de l'activació mitjançant estímuls o lesions, sinó que també en situacions fisiològiques durant el desenvolupament embrionari i postnatal. Els nivells de c-Jun incrementen en diferents àrees del SN durant el desenvolupament, i el seu nivell decreix fins arribar al nivell basal en l'animal adult (Wilkinson et al., 1989; Mellström et al., 1991).

5.3.2.- Funcions de c-Jun.

L'activació de c-Jun ha estat implicada en respostes cel·lulars oposades, la qual cosa representa un paradigma pels factors de transcripció induïbles. Per exemple, hi ha evidències de què c-Jun pot estar involucrat en l'apoptosi, en canvi, sota certes circumstàncies, està relacionat en promoure la diferenciació o proliferació cel·lular. Sembla ser que els efectes de c-Jun en les respostes cel·lulars depenen de diversos factors, entre els quals cal destacar el tipus cel·lular, el tipus de senyal i les vies que activen els mecanismes de regulació AP-1. S'ha demostrat que c-Jun està implicat o, almenys correlacionat, en processos cel·lulars com la transformació, proliferació, diferenciació, regeneració, migració, activitat, apoptosi i supervivència.

5.3.2.1.- Proliferació i transformació.

La primera vegada que es va suggerir un possible paper de c-Jun en el creixement cel·lular, va ser a partir d'estudis que demostren la seva capacitat de transformar cèl·lules per si mateix o amb la cooperació d'altres oncogens (Schütte et al., 1989; Bos et al., 1990; Castellazzi et al., 1991; Lloyd et al., 1991; Johnson et al., 1996). Més tard, en estudis realitzats amb fibroblastes es va observar l'increment ràpid i transitori de c-Jun com a resposta al creixement cel·lular induït per mitògens, mentre que la microinjecció d'anticossos per a c-Jun i c-Fos evitava l'entrada dels fibroblastes al cicle cel·lular (Kovary i Bravo, 1991). També s'ha observat que en hepatoblastes i fibroblastes, l'absència de c-Jun retarda el creixement cel·lular tant "in vitro" com "in vivo" (Hilberg i Wagner, 1992; Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993). Els mecanismes pels quals c-Jun activa la proliferació cel·lular no són massa clars; estudis recents indiquen que p53 podria estar involucrat en aquest procés (Schreiber et al., 1999).

5.3.2.2.- Diferenciació.

Diversos estudis demostren que c-Jun també promou la diferenciació cel·lular en diferents tipus de línies cel·lulars epitelials, mieloidals i neuronals. (Leppä et al., 1998; Lord et al., 1993; Szabo et al., 1994). Els estudis genètics i moleculars

realitzats amb *Drosophila Melanogaster* han aportat dades rellevants que relacionen JunD, l'homòleg de c-Jun en *Drosophila*, i la via JNKs en diferents processos de diferenciació cel·lular i de morfogènesi que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari (revisat per Ip i Davis, 1998).

5.3.2.3.- Apoptosi.

Com s'ha comentat abans, durant el desenvolupament del sistema nerviós dels vertebrats, aproximadament la meitat de neurones originades moren durant la neurogènesi per apoptosi, per tal d'ajustar el nombre de neurones que és necessari per a establir l'innervació adequada amb les cèl·lules diana (revisat Oppenheim, 1991). En línies generals, l'apoptosi és un procés actiu que requereix l'expressió de gens específics i la transcripció de proteïnes de "novo" (revisat per Schwartz, 1991). Durant el període de mort cel·lular programada, les neurones produïdes en excés competeixen per accedir a determinats senyals, com per exemple, els factors tròfics, els quals actuen suprimint l'expressió de gens pro-apoptòtics i, en conseqüència, evitant la mort cel·lular (revisat per Oppenheim, 1991). L'activitat AP-1 s'ha vist incrementada en diferents condicions de mort cel·lular apoptòtica tant de teixits embrionaris com de l'adult (Buttayan et al., 1988; Colotta et al., 1992; Gonzalez-Martin et al., 1992; Smeyne et al., 1992, 1993; Gillardon et al., 1994; Marti et al., 1994; Ham et al., 1995).

Els estudis "in vitro" amb cèl·lules neuronals simpàtiques, neurones granulars del cerebel i cèl·lules PC12 diferenciades, proposen que c-Jun podria tenir un paper primordial en la regulació de la transcripció dels gens específics responsables de l'activació de la maquinària bàsica de mort (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Xia et al., 1995; Watson et al., 1998). En canvi, els estudis "in vivo" no han permès corroborar aquesta hipòtesi, tot i que hi ha molts estudis que associen c-Jun amb els processos apoptòtics, mentre que encara es desconeixen les seves funcions o implicacions en aquest procés.

-Estudis "in vitro":

Les neurones simpàtiques del gangli cervical superior (SCG) de la rata constitueixen un model excel·lent per a l'estudi dels mecanismes moleculars de l'apoptosi neuronal "in vitro". Durant el desenvolupament postnatal de la rata, el 35% de neurones simpàtiques del SCG moren per apoptosi entre els dies 3 i 7, i s'ha vist que requereixen NGF per a la seva supervivència (Wright, 1983). Els estudis amb cultius de neurones simpàtiques demostren que l'eliminació del NGF del medi provoca la mort de les cèl·lules amb característiques pròpies de l'apoptosi. Aquest tipus de mort es pot evitar amb inhibidors de la transcripció, la qual cosa indica que la síntesi proteica i l'expressió gènica són essencials per a que es produeixi l'apoptosi induïda per privació d'NGF (Martin et al., 1988). En condicions normals, les neurones simpàtiques expressen nivells basals de c-Jun, JunB, JunD i FRA-2, però no de c-Fos, FosB i Fra-1. Després d'eliminar l'NGF del medi, s'observa un increment significatiu en els nivells de c-Jun, però no en els altres components d'AP-1. Els nivells de c-Jun augmenten en el nucli de les neurones abans que es produeixi la fase de compromís de l'apoptosi; quan encara no es detecten canvis visibles amb morfologia nuclear apoptòtica (Ham et al., 1995). S'ha demostrat que amb la injecció d'anticossos que inhibeixen la funció de c-jun o amb l'expressió d'un mutant dominant negatiu (FLAGA169) de c-jun es pot evitar la mort induïda per privació d' NGF, i fins i tot, s'ha vist que la sobreexpressió de c-Jun és suficient per induir l'apoptosi de les neurones simpàtiques en absència d'estímuls externs (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995). Aquests resultats són molt similars als que s'han observat en les cèl·lules PC12 (Bartel et al., 1989; Schligensiepen et al., 1993). Aquestes cèl·lules pertanyen a una línia cel·lular derivada d'un feocromocitoma de rata, que si es cultiven amb presència d'NGF es diferencien i adquireixen un fenotip neuronal que recorda el de les neurones simpàtiques. Quan s'elimina l'NGF del medi de cultiu, les cèl·lules PC12 diferenciades és moren per apoptosi. En ambdós models, s'ha observat un increment dels nivells de c-Jun fosforilat per JNKs (Virdee et al., 1997; Eilers et al., 1998) i en les cèl·lules PC12 s'ha observat, a més, un increment en l'activitat cinasa p38 (Xia et al., 1995). Els mecanismes intracel·lulars responsables de la mort apoptòtica en neurones simpàtiques es desconeixen, tot i que la via

d'activació de les JNKs sembla tenir un paper molt important en aquest procés que encara presenta molts interrogants. Es coneix, per exemple, que la sobreexpressió de MEKK1 (una proteïna JNKKK) és suficient per incrementar la fosforilació de c-Jun i per induir l'apoptosi inclòs en presència d'NGF (Eilers et al., 1998). S'ha observat en cèl·lules PC12 però no en neurones simpàtiques que MEKK1 activa SEK1, una proteïna JNKK capaç de fosforilar JNKs.

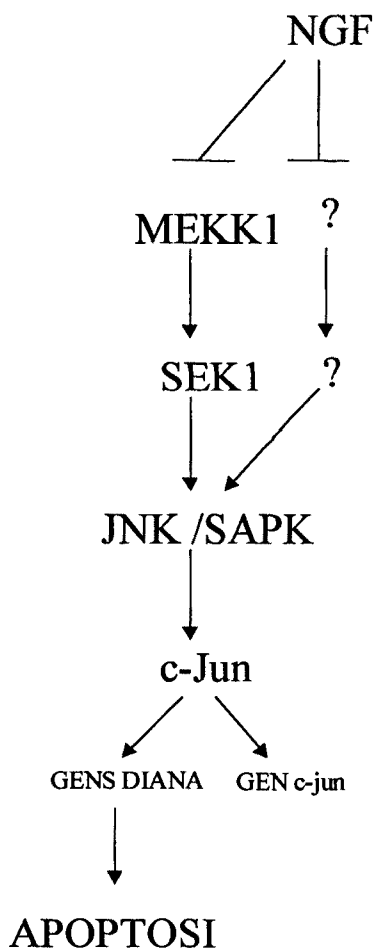


Figura 6. Relació entre la via JNKs - c-Jun i apoptosi induïda per privació d'NGF en neurones simpàtiques. FLAGA169 (un mutant dominant negatiu de c-Jun, inhibidor de l'activitat AP-1), SEKAL (un mutant dominant negatiu de SEK1), el domini JBD de JIP-1 (un inhibidor de JNK) (revisat per Eilers et al., 1999)

En neurones simpàtiques, l'eliminació d'NGF del medi provoca l'alliberament de citocrom c de la mitocondria al citosol (Neame et al., 1998; Deshmukh i Johnson, 1998). El citocrom c citosòlic forma un complex amb la procaspasa-9 i APAF-1 que, aquest, en presència d'ATP és capaç d'activar la caspasa-3, que és una proteïna efectora responsable dels canvis morfològics i bioquímics propis de l'apoptosi (Li et al., 1997). L'alliberament de citocrom c es pot bloquejar amb proteïnes antiapoptòtiques (ex: Bcl-2 i Bcl-XL) i estimular amb proteïnes pro-apoptòtiques (ex: Bad i Bax) de la família Bcl-2. S'ha vist que l'expressió d'un mutant dominant negatiu de c-Jun inhibeix l'alliberament de citocrom c i bloqueja l'apoptosi. Aquests resultats suggereixen que c-Jun actuaria abans de produir-se l'alliberament del citocrom c, possiblement regulant l'activació de gens que codifiquen per proteïnes reguladores del procés apoptòtic com Bax i Bad en l'apoptosi induïda per privació d'NGF (revisat per Eilers et al., 1999).

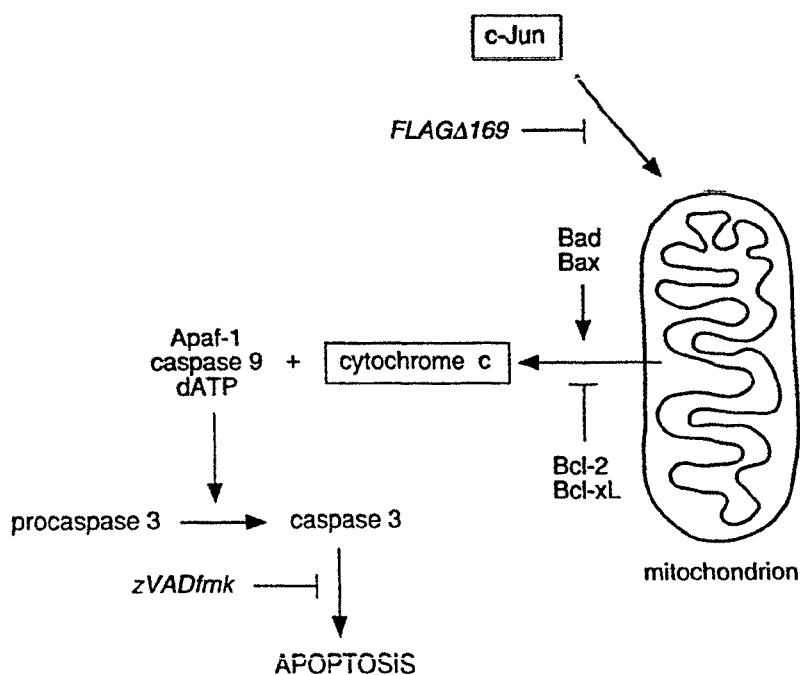


Figura 7. c-Jun en l'apoptosi induïda per privació d'NGF en neurones simpàtiques (segons Eilers et al., 1999).

En el SNC, el model més ben estudiat per determinar si c-Jun promou l'apoptosi és el de les neurones granulars del cerebel (CGCs) (Watson et al., 1998). El KCl provoca la despolarització de la membrana i una entrada de Ca^{++} que manté la supervivència de les cèl·lules. L'eliminació del sèrum del medi i concentracions molt baixes de KCl (5mM) provoquen l'apoptosi de les neurones granulars del cerebel, la qual es pot bloquejar mitjançant inhibidors de la transcripció o síntesi proteica (D'Mello et al., 1993). En aquest model, la privació dels senyals provoca un increment de l'expressió de c-jun i dels nivells de la proteïna fosforilada en la serina 63, però no afecta altres components AP-1, i té lloc abans de la fase de compromís (Miller i Johnson, 1996; Watson et al., 1998). Així doncs, els estudis "in vitro" concorden amb la hipòtesi que c-Jun podria activar la transcripció de determinades molècules capaces d'induir l'activació dels efectors de l'apoptosi.

-Estudis "in vivo".

c-Jun s'ha relacionat amb la PCD que té lloc durant el desenvolupament del SNC (Ferrer et al., 1996b) en cèl·lules simpàtiques (Messina et al., 1996), amb l'apoptosi detectada en medul·loblastomes (Ferrer et al., 1996d) i amb la malaltia d'Alzheimer, (Anderson et al., 1996). També s'ha associat a diversos paradigmes de mort cel·lular induïda per diferents agents o situacions patològiques, com per exemple: l'acetat methylazoxymetanol, en hipòxia/isquèmia i després de la injecció intracerebral d'un anàleg del glutamat com és l'àcid ibotònic, mitjançant radiacions durant el desenvolupament del cervell de rata i en la mort induïda per àcid kainic en la rata adulta (Ferrer et al., 1997a, 1997b, 1997c, 1997d, Ferrer et al., 1996a,b). Però s'ha de tenir en compte, que en la majoria d'aquests resultats la immunoreactivitat de c-Jun en les cèl·lules apoptòtiques s'ha observat tant en el nucli com en el citoplasma i en les prolongacions axonals i dendrítiques. Aquest patró és diferent de l'observat en els estudis "in vitro" en què s'observa exclusivament un marcatge nuclear, com és d'esperar, per un factor de transcripció com c-Jun.

Una de les evidències més concloents en què es demostra la importància de l'activació JNK i fosforilació de c-Jun en l'apoptosi neuronal en un model in vivo,

s'ha observat en estudis realitzats amb ratolins mutants per c-jun o per jnk3 però no per jnk1 ni jnk2. En aquests ratolins, s'ha vist que les neurones de l'hipocamp sobreviuen a l'apoptosi induïda per kainat (Yang et al., 1997, 1998; Dong et al., 1998; Behrens et al., 1999). En canvi, el mecanisme pel qual la JNK3 i c-jun són requerits per l'apoptosi en aquest model de mort induïda per kainat, es desconeix.

Contràriament, s'ha suggerit que c-Jun no és necessari per induir la PCD durant el desenvolupament normal, ja que estudis realitzats amb mutants nuls per c-Fos i c-Jun i dobles mutants c-Fos/c-Jun demostren que la mort natural i induïda durant el desenvolupament es produeix en absència de c-Jun i c-Fos (Roffler-Tarlov et al., 1996). Una possible explicació d'aquest fet seria que altres factors de transcripció, que també són substrats de les JNKs (ex: ATF-2), podrien substituir c-Jun en el moment d'induir l'apoptosi "in vivo" durant el desenvolupament. Però en canvi, també s'ha observat que ratolins mutants nuls per jnk1, jnk2 o jnk3 són viables i es desenvolupen normalment (Yang et al., 1997, 1998; Dong et al., 1998).

Recentment, en estudis realitzats amb embrions de ratolí dobles mutants per jnk1 i jnk2, s'ha vist una gran taxa de mortalitat deguda a una severa desregulació de l'apoptosi en el cervell. S'ha observat una resposta diferencial pro- o anti- apoptòtica que varia segons la regió del cervell estudiada. Això implica que aquestes cinases probablement regulen l'apoptosi d'una manera regionalment diferencial durant la morfogènesi del cervell. En aquests embrions dobles mutants per JNK1/JNK2, c-Jun es fosforila i s'expressa normalment. Aquest fet suggereix que c-Jun podria estar regulat per la JNK3, i en aquest cas, c-Jun no estaria implicat en l'apoptosi (Kuan et al., 1999).

Els estudis realitzats en pollastre demostren que l'administració "in ovo" d'un inhibidor de la via JNK1 (CEP-1347/KT7515) (Maroney et al., 1998) promou la supervivència del 40% de les motoneurones que han de morir durant el període de la PCD (Glicksman et al., 1998).

5.3.2.4.- c-Jun i axotomia.

La transecció d'un nervi perifèric provoca nombrosos canvis morfològics i metabòlics, dràstics, en el cos cel·lular. Per restablir les funcions biològiques, la neurona activa la maquinària de la transcripció i la síntesi proteica destinada a facilitar el creixement i regeneració dels axons.

Les vies de transducció de senyal implicades en la resposta cel·lular a l'axotomia no es coneixen, però s'ha postulat que c-Jun pot tenir un paper rellevant en aquest procés. Per exemple, s'ha vist que després de l'axotomia c-Jun i Jun D s'expressen en les neurones aferents primàries del gangli raquidi i en les motoneurones, però no c-Fos, Fos B i Jun B. (Leah et al., 1991; Gold et al., 1993; Herdegen et al., 1993c).

Les neurones perifèriques normalment presenten nivells molt baixos de c-Jun que s'incrementen després de l'axotomia i es mantenen alts fins que s'ha produït la regeneració axonal, i posteriorment, es recuperen els nivells basals (Jenkins i Hunt, 1991; Leah et al., 1991; Herdegen et al., 1993a; De Felipe i Hunt, 1994; Casanovas et al., 2001). També s'ha vist que diferents gens que s'activen durant la regeneració, per exemple GAP-43, contenen en el seu promotor elements AP-1 (Eggen et al., 1994). En canvi, les neurones centrals que no tenen capacitat de regenerar no expressen c-Jun. És per aquesta raó, que s'ha considerat c-Jun com un factor important en la resposta regenerativa de neurones lesionades.

La vulnerabilitat de les MNs immadures està en relació amb el grau de desenvolupament. Així doncs, la interrupció axonal en animals neonats desencadena una resposta en el cos cel·lular que culmina en la PCD en lloc de en regeneració. Aquesta mort podria estar provocada per l'eliminació dels senyals neurotròfics derivats, o bé de les dianes perifèriques, o bé de les cèl·lules de Schwann que normalment són transportats retrògradament a través de l'axó. Aquesta hipòtesi prové dels experiments en els quals es demostra que el CNTF (Sendtner et al., 1990), el BDNF (Sendtner et al., 1992; Yan et al., 1992), el GDNF (Oppenheim et al., 1995) i el CT-1 (Pennica et al., 1996), administrats en el segment proximal del nervi perifèric seccionat, protegeixen les motoneurones de la mort.

Per altra banda, en moltes regions del CNS, s'ha observat que les neurones axotomitzades expressen c-Jun durant mesos sense presentar signes de degeneració (Haas et al., 1993; Leah et al., 1993; Herdegen, 1993b; Brecht et al., 1995). Aquestes observacions fan suposar que c-Jun no és un element suficient per induir l'apoptosi i que han d'existir altres senyals que intervenen amb o sense c-Jun en el procés de mort (Herdegen et al., 1997).

Davant d'aquesta controvèrsia, Herdegen et al., (1997) han proposat que la implicació de c-Jun en el procés de mort neuronal, en la supervivència i en la regeneració ve determinada probablement per l'expressió d'altres proteïnes relacionades amb ell com ATF2 i JunD, i de l'expressió selectiva dels seus gens diana (GAP-43), encara que també podrien estar involucrats altres factors com l'activació de les JNKs o l'absència de c-fos.

Una funció bipolar de proliferació o diferenciació per una banda, i una de mort cel·lular per l'altra, també s'ha observat en altres oncogens, com per exemple p53 o c-Myc (revisat per Harrington et al., 1994).

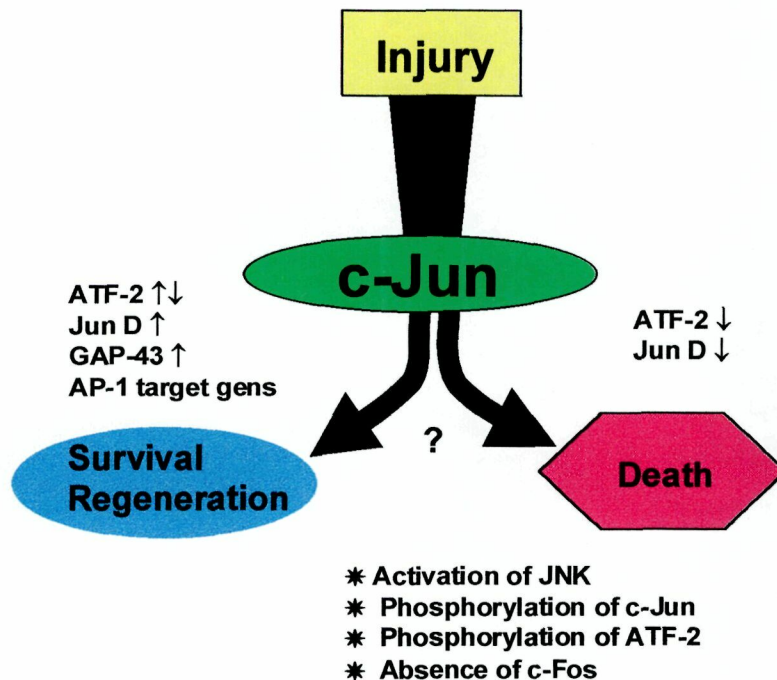


Figura 8. Funció bipolar de c-Jun (adaptat de Herdegen et al., (1997))

5.4.- Regulació de c-Jun mitjançada per Ca^{++} .

Recentment, s'ha descrit una nova via d'activació de c-Jun independent de la via JNKs, ja que no requereix la fosforilació de les serines 63 i 73 de c-Jun. Aquesta via comporta l'activació de la calmodulina (CaM) cinasa induïda per l'entrada de Ca^{++} a través dels canals de calci voltatge dependents de tipus L com a conseqüència d'una despolarització de la membrana (Cruzalegui et al., 1999). Aquest Ca^{++} extracel·lular pot entrar a les neurones a través de canals de Ca^{++} dependents de voltatge, de canals permeables a Ca^{++} dependents de neurotransmissors (receptors d' aminoàcids excitadors, EAAs), o a través d'intercanviadors iònics.

Els canvis en la concentració de Ca^{++} intracel·lular promouen l'activació de molècules senyalitzadores com proteïnes cinases o fosfatases, principalment a través de la calmodulina (CaM) per la regulació de diverses respostes fisiològiques de la cèl·lula (Means, 1988; Means et al., 1991).

El Ca^{++} és el principal segon missatger que intervé en la regulació de processos cel·lulars que requereixen l'activació del factor de transcripció CREB, que interactua amb l'element de resposta a AMPc (CRE) (Hardingham et al., 1997). L'activació transcripcional de CREB estimulada per Ca^{++} nuclear i CaM cinasa IV requereix de la fosforilació de la ser-133 de CREB i l'activació addicional d'un coactivador transcripcional CBP (proteïna d'interacció amb CREB) (Chawla et al., 1998). Es considera que CBP podria regular un mecanisme bàsic a través del qual el Ca^{++} controlaria l'expressió gènica responsable dels canvis adaptatius dependents de l'activitat elèctrica en el SN. En aquest context, c-Jun també podria tenir un paper important, ja que s'ha vist que interactua amb el cofactor CBP quan és estimulat per Ca^{++} via VSSCs, i aquesta activació de c-Jun no requereix fosforilació per JNKs.

Per altra banda, quan les neurones es sotmeten a augments de Ca^{++} per sobre del rang fisiològic es produeix un efecte excitotòxic com a conseqüència de l'augment intracel·lular de Ca^{++} resultant de la sobreexcitació de neurones, que resulta de l'activació dels receptors NMDA. Se sap que l'activació dels receptors NMDA promou la inducció d'IEGs, incloent c-Jun. L'activació de c-Jun independent de la via JNKs per l'activació de receptors NMDA no és tant evident com a través de

canals de Ca^{++} tipus L, ja que només s'ha descrit en cèl·lules de l'hipocamp (Hardingham, et al., 1999). En canvi, l'activació de c-Jun via JNKs a través de receptors de glutamat s'ha observat en neurones estriades i cèl·lules granulars del cerebel (Kawaski et al., 1997; Schwarzschild et al., 1997).

5.5.- c-Jun i activitat epilèptica.

L'epilèpsia és un trastorn neurològic relativament comú en nens i que afecta a més d'un 1 % de la població total. Es caracteritza per la presència de crisis que provoquen canvis sobtats i espontanis de conducta com a conseqüència d'una alteració en l'activitat elèctrica del cervell que es manifesta per una descàrrega hipersincrònica i repetitiva de les neurones. Aquesta disfunció neurològica pot provocar des de la pèrdua d'atenció momentània fins a convulsions severes amb pèrdua de consciència. Pot iniciar-se en una regió aïllada del cervell (crisi parcial o focal) o de forma difusa per tot el cervell (crisi primària generalitzada). S'han descrit molts tipus de crisis parcials (simples, complexes,...) o generalitzades (tónico-clòniques, d'absència,..) que quan apareixen de forma continuada o en intervals molt curts en què l'individu no pot recuperar totalment la consciència desencadenen un estadi epilèptic. Si aquest estadi epilèptic es forma com a conseqüència de crisis tònico-clòniques es pot produir fins i tot la mort de l'individu. Moltes d'aquestes crisis que tenen lloc en la infància semblen tenir un origen genètic. El grau d'influència genètica en el desenvolupament de l'epilèpsia pot ser molt variable, depenent del tipus d'epilèpsia. S'ha identificat la localització cromosòmica de diversos gens anormals que apareixen en diferents tipus d'epilèpsia, però es desconeixen els mecanismes concrets pels quals aquests gens poden produir la malaltia. També les crisis poden ser atribuïbles a lesions cerebrals, per exemple a causa d'un tumor, per un traumatisme o accidents vasculars. En aquests casos les àrees afectades del cervell poden tornar-se hiperexcitables, és a dir, epileptogèniques i generar crisis. Alteracions en la migració neuronal durant el desenvolupament embrionari, o qualsevol altra malformació cerebral durant el període de diferenciació cel·lular poden causar crisis epileptogèniques. La teràpia que s'aplica actualment en l'epilèpsia és purament simptomàtica. Hi ha almenys una dotzena de drogues que

s'utilitzen per inhibir les convulsions, però un 25% de pacients continuen tenint crisis a pesar d'aquestes drogues (revisat per McNamara, 1994). Un dels instruments clàssics més importants per a la investigació de l'epilèpsia és l'encefalograma (EEG) que permet detectar l'activitat elèctrica anormal en el cervell.

El fenomen cel·lular que té lloc durant l'epilèpsia pot ser induït per perturbacions en els mecanismes cel·lulars normals de l'excitabilitat neuronal i de la funció sinàptica. En línies generals, l'activitat de tipus epilèptic es pot considerar com la conseqüència d'un desequilibri entre els sistemes transmissors excitadors i/o inhibidors mitjançats per aminoàcids. Per tant, l'estudi d'aquest fenomen patològic ens aproxima també a conèixer el funcionament neuronal normal.

La majoria d'estudis s'han realitzat en models amb animals d'experimentació i s'ha observat mort neuronal en molts d'aquests models en què s'ha induït l'activitat epilèptica. Les cèl·lules moren per necrosi en la majoria de casos però també s'ha observat mort cel·lular apoptòtica en alguns tipus cel·lulars, encara que la contribució específica de la mort cel·lular en la patologia de l'epilèpsia es desconeix.

Per altra banda, l'activitat epilèptica a més de produir mort cel·lular també indueix canvis importants en l'expressió gènica. Quasi tots els tipus d'epilèpsia s'han associat a alteracions en l'expressió d'IEGs en neurones del sistema límbic i en àrees no-límbiques com el còrtex, estriat i tàlam. L'expressió d'IEGs pot tenir un paper important en els canvis d'expressió gènica, a curt i llarg termini, capaços de provocar canvis importants en les funcions neuronals. Un dels models d'epileptogènesi més comú és el "Kindling" en què s'han estudiat i examinat els efectes de la inhibició de la transcripció i translació (Jones i Wasterlain, 1979).

El "Kindling" és un model animal molt utilitzat en l'estudi de l'epilèpsia focal en el lòbul temporal que afecta els humans. En aquest model l'estimulació elèctrica no convulsiva administrada periòdicament en diverses àrees del cervell comporta la formació de crisis generalitzades en un període de dies o setmanes. En aquest cas, mitjançant un estímul transitori es produeix un estadi d'hiperexcitabilitat permanent. L'estimulació elèctrica s'aplica sovint a l'hipocamp o l'amígdala perquè són les àrees del cervell més sensibles als efectes del "Kindling". Després de l'estimulació

elèctrica focal es produeix una convulsió local molt breu ("after-discharges"AD) imprescindible per al desenvolupament del "Kindling". Els canvis permanents en els circuits neuronals i/o químics (ex: *sprouting*) que es produeixen durant el "Kindling" requereixen la síntesi de proteïnes de "novo" (revisat per Morgan i Curran, 1991; Hugues, 1999)

Després de l'AD s'ha observat un increment ràpid i transitori de diferents IEGs que s'expressen d'una manera selectiva en l'hipocamp. Per exemple, en neurones del *girus* dentat : 1) c-fos s'indueix molt ràpid i després de 30 minuts recupera els nivells basals 2) c-Jun, Jun B, Jun D, Fos B, Fra i Krox-24 s'indueixen després d' un hora i recuperen els nivells basals després de 24h (Dragunow et al., 1992). En les interneurons hilars de l' hipocamp, l' expressió és retardada i s'observa un increment de Fos, JunD i Krox-24 després de 4h (Dragunow et al., 1992). En l'amígdala, l'expressió d'IEGs després de l'AD és molt similar a la de l'hipocamp i encara que la inducció d'aquests gens s'inicia en diferents temps en ambdues àrees del cervell, els increments en els nivells d'aquests factors de transcripció són ràpids i transitoris. Per aquest motiu, probablement els IEGs no tenen un paper en el manteniment a llarg termini del "Kindling", però s'ha suggerit que podrien ser essencials per al seu desenvolupament (revisat per Hugues, 1999). Aquesta idea ve recolzada per un estudi que demostra que una mutació nula de c-fos retarda el desenvolupament del "Kindling" i també l'*sprouting* (Watanabe et al., 1996). S'ha suggerit que la manca de c-fos pot disminuir la transcripció d'un o més gens relacionats amb l'*sprouting*. Es considera que aquests gens podrien ser les neurotrofines NGF o BDNF, l'expressió de les quals s'ha vist incrementada en l'hipocamp després de l'AD (Ernfors et al., 1991; Bengzon et al., 1992; Hughes et al., 1998). El mecanisme pel qual els factors de transcripció són estimulats en aquest model no es coneixen. S'ha suggerit que podrien estar-hi implicats els receptors NMDA, ja que els receptors de glutamat també es consideren essencials per a la inducció i manteniment de diverses formes de plasticitat sinàptica. S'ha vist que l'expressió de BDNF induïda per l'AD pot retardar-se amb MK-801 un antagonista del receptor NMDA, encara que els nivells dels IEGs no sempre resulten disminuïts.

IV. MATERIAL I MÈTODES

1.- MODEL ANIMAL D'EXPERIMENTACIÓ.

S'han emprat embrions de pollastre fertilitzats en granges locals (COPAGA, Lleida, Catalunya). Els ous amb embrions en curs s'incuben al laboratori a 37°C i 60% d'humitat relativa fins a obtenir l'edat apropiada per iniciar l'experiment. Els protocols utilitzats per a la manipulació dels animals d'experimentació estan aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat de Lleida.

2.- ESTUDIS MORFOLÒGICS.

Per als embrions que s'han estudiat per microscòpia òptica s'ha seguit el següent procediment:

2.1.- Fixació dels embrions.

Els embrions s'han estadiat segons el mètode de Hamburger i Hamilton, (1951) i s'han fixat en una solució de Carnoy (60% alcohol etílic, 30% cloroform i 10% àcid acètic).

2.2.- Inclusió en parafina.

Els embrions es mantenen durant 24 hores en Carnoy i es renten almenys durant 12 h en una solució d'alcohol etílic al 70%. Posteriorment, immersos en alcohol, es dissequen, conservant la columna lumbosacra en uns embrions, o la cervical en d'altres, envoltada de les estructures vertebrals i de part de múscul.

Els embrions es tenyeixen per immersió amb una solució d'eosina al 0,5% en alcohol etílic 96% durant 30-60 min, per a la seva posterior localització en el bloc de parafina. Seguidament es procedeix a la seva deshidratació en una bateria d'alcohols amb graduació creixent i després de l'aclariment amb xilé es passen a un bany de parafina a 62°C durant 6 hores. A continuació es fan els blocs de parafina, amb l'ajut de motlles, que es solidifiquen a temperatura ambient.

2.3.- Microtomia.

Els embrions se seccionen transversalment a un gruix diferent segons l'edat: 6 µm per embrions des d'E5 fins a E6, 8 µm per embrions des d'E7 fins E10 i 10 µm pels d'E12. Les seccions es col·loquen en tires sobre portaobjectes tractats amb una

capa fina d'albúmina de Mayer i s'estiren, amb aigua abundant sobre una planxa a 40°C.

2.4.- Tincions.

Els embrions prèviament fixats en Carnoy es tenyeixen pel mètode de tionina.

2.4.1.- Preparació del colorant.

Tionina:

Tionina (5 gr)

NaOH (36 ml)

Àcid acètic (11,44 ml)

Es barreja el NaOH amb l'àcid acètic i s'escalfen fins que treuen vapor, aleshores s'afegeix la tionina, s'agita i quan està dissolta es filtra.

2.4.2.- Protocol de la tinció amb tionina.

Es realitza la desparafinació i hidratació de les seccions de la forma anterior i després del colorant es fan una sèrie de rentats amb aigua, i es tornen a deshidratar les seccions amb alcohols de graduació creixent, xilé i xilé-eucaliptol abans de muntar-les en DPX.

3.- COMPTATGES CEL·LULARS.

Per tal de conèixer el nombre total de MNs en la LMC lumbar, s'identifica aquest nucli i es compten les MNs en 1 de cada 20 seccions. Es compten les cèl·lules amb un nucli gran, amb un bon agrupament de material nucleolar i un soma gran amb molt de citoplasma. Amb aquests criteris tan restrictius, no cal aplicar el factor de correcció per dobles comptatges (Clarke i Oppenheim, 1995).

Pel nombre de neurones picnòtiques, es compten, en la LMC (lumbar o cervical, segons la regió que es vol estudiar), en 1 de cada 10 seccions emprant un objectiu d'oli d'immersió x100, cèl·lules aparentment intactes amb condensació de la cromatina nuclear, o bé cossos esfèrics resultants del trencament de la cromatina condensada i suposadament fagocitats per macròfags, envoltats per masses hialines

(Ciutat et al., 1995). Amb aquests criteris tan astringents tampoc no cal aplicar el factor de correcció per dobles comptatges (Clarke i Oppenheim, 1995). El nombre resultant del recompte de MNs i de cèl·lules picnòtiques es multiplica per 20 i 10 respectivament, per tal d'obtenir el nombre de cèl·lules totals de la LMC.

4.- IMMUNOHISTOQUÍMICA.

Després de ser sacrificats, els embrions es renten en sèrum fisiològic i es fixen de 12 a 24 h amb paraformaldehid al 4% en tampó fosfat 0,1 M, pH 7.4 a 4°C. Seguidament es fan rentats en tampó fosfat 0,1 M i es passen a crioprotegir durant almenys 48 h en tampó fosfat 0,1 M, sacarosa 30% a 4°C. Després d'això es procedeix a la congelació, a -70°C, de l'embrió en medi TFM (*Tissue Freezing Medium*, Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC).

Es realitzen seccions transversals de 16 µm de gruix de la regió de la medul·la espinal de l'embrió que volem estudiar (lumbar o cervical) en un micròtom de congelació i es munten en portaobjectes prèviament gelatinitzats. Les seccions es deixen assecar durant 12 hores i després es congelen a -20°C.

S'ha efectuat la immunohistoquímica amb els següents anticossos primaris comercials:

- anticossos policlonals de conill c-Jun/sc45 o de cabra c-Jun/sc45g dirigits contra un pèptid, que correspon als aa 91-105 del domini amino-terminal de c-Jun p39 de ratolí (Laboratoris Santa Cruz Biotechnology), diluïts 1/200 per immunoperoxidasa o 1/500 per immunofluorescència (c-Jun/sc45) i 1/20 (c-Jun/sc45g).
- anticòs monoclonal de ratolí c-Jun/mAB dirigit contra un fragment peptídic de 15.5 Kd que correspon als aa 26-175 de c-Jun de ratolí (Laboratoris Transduction, Lexington, KY), diluït 1/20.
- anticòs policlonal de conill c-Jun/AB2 dirigit contra un pèptid que correspon als aa 73-87 del domini amino-terminal de v-jun (c-Jun/AP-1, PC07, Oncogene Research Products). Aquesta seqüència és idèntica a la del pèptid utilitzat per a la obtenció dels anticossos c-Jun/sc45 (TPTPTQFLCPKNVTD).

- anticòs policlonal de conill c-Jun-P-ser63 que reconeix c-Jun únicament quan està fosforilat en la serina 63 del domini amino-terminal. Aquest anticòs s'ha obtingut a partir d'un pèptid sintètic que correspon als aa 56-67 de c-Jun humà (Laboratoris New England Biolabs), diluït 1/50.
- anticòs policlonal de conill JNK1/sc571 dirigit contra un fragment del pèptid que correspon als aa 1-384 de la JNK1p46 humana (Laboratoris Santa Cruz Biotechnology), diluïts 1/30.
- anticòs policlonal de conill caspara-3 activada (17 kDa) (Cell Signaling Technology de New Englands BioLabs Inc. Beverly, MA) dirigit contra un fragment de la caspara-3 activada (17-20 kD) d'humà, resultant del trencament de la proteïna després d'un àcid aspàrtic situat en posició 175. Aquest anticòs no reconeix la caspara no fragmentada ni tampoc altres caspases. S'ha utilitzat diluït 1/70.

4.1.- Immunoperoxidasa amplificada amb Níquel.

Una vegada descongelats, els portaobjectes s'hidraten durant 10 min amb PBS.

- Inactivació de la peroxidasa endògena. Com que el sistema emprat per al revelat de l'anticòs és la reacció de la peroxidasa, es fa una incubació de 30 min amb 0,5% H₂O₂ en PBS per tal d'inactivar la peroxidasa endògena de les cèl·lules.
- Es fa un rentat de trenta minuts en PBS Tritó-X-100 0,1% i un rentat de deu minuts en PBS. S'eixuguen els portaobjectes i es fa un bloqueig de 30 min amb sèrum normal de cabra (NGS) al 3% (Vector Laboratories) en PBS en cambra humida.
- Incubació en cambra humida 4°C tota la nit amb l'anticòs primari.
- Es fan 3 rentats de 10 minuts, cadascun, amb PBS.
- Seguidament s'incuba en cambra humida durant 1h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari de cabra biotinitat anti-immunoglobulines de conill o de ratolí (segons l'anticòs primari utilitzat) (Vector Laboratories), diluïts 1/200. També s'ha utilitzat un anticòs secundari biotinitat anti-immunoglobulines de cabra (SIGMA), diluït 1/40.

- Es fan 3 rentats de 10 minuts amb PBS i s'incuba 1h en cambra humida a temperatura ambient amb el complex Avidina-Biotina Complex (ABC) (Vector Laboratories). Cal preparar-lo 1h abans de la seva utilització i es dissolen 5 µl del reactiu A i 5 µl del reactiu B per cada ml de PBS.
- Es fan 3 rentats en PBS i es procedeix a fer el revelat de 5' amb:
 - 6,25 g de sulfat d'amoni níquel sulfahidratat
 - 0,1 g de clorur d'amoni
 - 0,5 g D (+)-glucosa
 - 25 ml tampó acètic acetat 1 M ph=6.0
 - 225 ml dH₂O
 - 0,0075 g glucosa oxidasa (Sigma)
 - 2,5 ml 3'3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) (1%)
- Rentats 3x5' amb acètic acetat 0,1 M, pH 6.
- Rentat amb dH₂O de 5'.
- Finalment es deshidraten les seccions en una bateria d'alcohols de graduació creixent i de xilens fins que es munten en medi DPX.

4.2.- Immunofluorescència.

Aquest protocol s'utilitza per a l'observació de la immunohistoquímica mitjançant el microscopi de fluorescència o microscòpia confocal. Fins al moment de la incubació amb l'anticòs secundari, el procediment és pràcticament el mateix que l'anterior, únicament prescindim del bloqueig de l'activitat de la peroxidasa endògena amb H₂O₂.

Els anticossos secundaris utilitzats són:

- anticossos secundaris de cabra (anti-immunoglobulines de conill) conjugats amb isotiocianat de rodamina (TRITC) o de fluoresceïna (FITC) (Boehringer Mannheim), diluïts 1/50.
- anticossos secundaris de cabra (anti-immunoglobulines de ratolí) conjugats amb isotiocianat de rodamina (TRITC) o de fluoresceïna (FITC) (Boehringer Mannheim), diluïts 1/50.

- anticossos secundaris de donkey (anti-immunoglobulines de cabra) conjugats amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC) (Boehringer Mannheim), diluït 1/200.
- anticossos secundaris de cabra (anti-immunoglobulines de conill) conjugats amb el fluorocrom ALEXATMFLUOR 488 (495/519) (Molecular Probes).
- anticossos secundaris de cabra (anti-immunoglobulines de conill) conjugats amb el fluorocrom ALEXATMFLUOR 546 (556/573) (Molecular Probes).

La incubació amb l'anticòs secundari és també d'una hora. Després es renten les mostres en PBS 3x 10' i es procedeix al muntatge en un medi "antifading" Vectashild (Vector).

En alguns casos, s'ha utilitzat un marcador del DNA que s'aplica després de la incubació amb l'anticòs secundari, amb la finalitat de localitzar els nuclis picnòtics en la mostra i detectar si colocalitzen o no les picnosis amb el marcatge dels anticossos utilitzats per immunofluorescència. Normalment per aquest estudi s'ha utilitzat iodur de propidi. Les seccions s'incuben amb 5µg de iodur de propidi i 100µg/ml d'RNasa, durant 20' a 37°.

També s'ha realitzat la immunofluorescència en seccions de parafina (8 µm) que van ser fixades amb PFA 4% en tampó fosfat 0,1 M, pH 7.4 a 4°C i incloses fa tres anys. Aquesta immunohistoquímica s'ha realitzat amb els anticossos c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada. Els blocs de parafina es van tallar, recentment, per microtomia i va caldre desparafinar i rehidratar les mostres abans de començar la immunofluorescència.

4.2.1.- Doble marcatge per immunofluorescència amb dos anticossos primaris policlonals: c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada.

S'ha realitzat la immunofluorescència amb dos anticossos primaris de conill (anticossos policlonals caspasa-3 activada i c-Jun/sc45) en una mateixa secció per tal d'obtenir un doble marcatge. Per aquest estudi s'ha emprat la tècnica descrita per Tramu et al., (1978). El procediment seguit ha estat el següent:

- Una vegada descongelats, els portaobjectes s'hidraten durant 10 minuts amb PBS.

- Es fa un rentat de trenta minuts en PBS Tritó-X-100 0,1% i un rentat de deu minuts en PBS. S'eixuguen els portaobjectes i es fa un bloqueig de 30 min amb sèrum normal de cabra (NGS) al 3% (Vector Laboratories) en PBS en cambra humida.
- S'han incubat les mostres en cambra humida amb l'anticòs primari anti-caspasa-3 activada, diluït en 0,1% de Tritó X-100 /PBS, durant 48h a 4°C i amb l'anticòs secundari de cabra (anti-immunoglobulines de conill) conjugat amb el fluorocrom ALEXATMFLUOR 488 (495/519) (Molecular Probes).
- Es fan 3 rentats de 10 minuts cadascun amb PBS.
- Les mostres s'han muntat amb Glicerol (70%)/PBS.
- S'han fotografiat les imatges amb una càmera "cooled" CCD (Life Science Resources, Cambridge, UK) que està acoblada al microscopi de fluorescència Nikon Eclipse 600.
- S'ha eliminat el cobridor d'objectes en un bany de PBS i a continuació s'han eliminat els anticossos per oxidació (Tramu et al., 1978) mitjançant la immersió de les mostres en una solució d'aigua destilada que conté 2,5% de KMnO i 5% de H₂SO₄ durant 10 minuts i després s'han incubat en un bany durant 30 segons amb 0,5% de Na₂S₂O₅. Seguidament, s'han rentat les mostres amb aigua corrent durant 15 minuts, amb aigua destilada durant 10 minuts i per últim, amb PBS durant 10 minuts. A continuació s'ha realitzat la immunofluorescència amb l'anticòs policlonal c-Jun/sc45. S'ha utilitzat l'anticòs secundari de cabra (anti-immunoglobulines de conill) conjugat amb el fluorocrom ALEXATM FLUOR 546 (556/573) (Molecular Probes). S'han fotografiat les imatges i s'han comparat amb les imatges obtingudes amb l'anticòs primari caspasa-3 activada per tal d'observar la colocalització cel·lular d'ambdós marcatges.

Sempre que s'ha realitzat un doble marcatge per immunofluorescència hem utilitzat un marcador de DNA diferent al iodur de propidi com és el "4',6-diamidino-2-phenylindole, sihydrochloride" (DAPI, de Molecular Probes). La incubació amb aquest marcador es realitza després de la incubació amb l'últim anticòs secundari durant 5', diluït 1/1000.

4.3.- Comptatges realitzats en els estudis immunohistoquímics.

Els comptatges de cèl·lules c-Jun/sc45 positives s'han realitzat en la LMC, en 1 de cada 10 seccions de la regió de la medul·la espinal estudiada (lumbar o cervical). S'han comptat només les cèl·lules que presenten morfologia pròpia de MNs i s'ha obtingut la mitjana de MNs positives de la LMC, per secció.

Per a l'obtenció del percentatge de cèl·lules que presenten una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB s'ha utilitzat el programa Visilog 5.1 (Noesis, S.A., Orsay, France).

5.- TUNEL.

Per a la detecció *in situ* de la fragmentació del DNA s'ha utilitzat la tècnica de TUNEL ("terminal nucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling", Gavrieli et al., 1992). S'ha aplicat la tècnica de TUNEL per conèixer si les cèl·lules marcades amb els diferents anticossos utilitzats presenten fragmentació del DNA típica d'apoptosi en els diferents models estudiats. Els embrions s'han fixat en PFA 4% en tampó fosfat 0,1 M (pH 7.4) durant 12 h a 4°C i s'han processat per obtenir seccions per criostat.

Les mostres s'han processat d'acord amb les instruccions kit "In Situ cell death detection, fluorescein" (Boehringer, Mannheim). La immunoreactivitat pels diferents anticossos primaris utilitzats s'ha detectat simultàniament utilitzant els anticossos secundaris de cabra (anti- immunoglobulines de conill o ratolí) conjugats amb isotiocianat de rodamina (TRITC) (Boehringer Mannheim).

En algunes seccions, per a la detecció de la tècnica de TUNEL s'ha utilitzat un anticòs anti- FITC conjugat amb fosfatasa alcalina (Amersham, Buckinghamshire, UK). La fosfatasa alcalina s'ha revelat amb BCIP/NBT que dona una coloració blava intensa. En aquest cas, s'ha detectat la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 simultàniament, mitjançant un anticòs secundari biotinitat com s'ha descrit anteriorment, però per a la detecció del substracte de la peroxidasa s'ha utilitzat el Kit AEC (Vector) que dona una coloració vermella.

6.- ESTUDIS DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA.

6.1.- Microscòpia electrònica convencional.

S'ha utilitzat un protocol de microscòpia convencional per observar la ultraestructura en mostres E7,5 control i tractades amb β -Bgtx.

- Les mostres es fixen durant dues hores amb glutaraldehyd al 2,5% en PB 0,1 M , pH 7.4.
- Rentat en PB (3x10').
- Osmificació durant 2 hores a 4°C.
- Rentats en PB (3x10').
- Acetona 30% en aigua durant 10 minuts.
- Acetona 70% saturada amb acetat d'uranil de 12 a 24 h.
- Acetona 95% durant 10 minuts.
- Acetona 100% (3x 30').
- Òxid de propilè (2x10').
- Fins ara tots els passos es fan a 4°, i a partir d'ara a temperatura ambient.
- Inclusió de 45 min amb una barreja d'òxid de propilè-Durcupam ACM sense component C (Fluka, Suïssa) 3:1.
- Inclusió de 45 min amb una barreja d'òxid de propilè-Durcupam ACM sense component C 1:1.
- Inclusió de 45 min amb una barreja d'òxid de propilè-Durcupam ACM sense component C 1:3.
- Inclusió amb Durcupam ACM sense component C a 37°C, durant un dia, o 2x1 hora a 60°C.
- Inclusió amb Durcupam ACM (3x30') a 60°C, o durant 8 hores a 37°C.
- Inclusió i polimerització a 60°C en Durcupam ACM durant 48h.
- Es realitzen seccions semifines de 1 μ m i se seleccionen àrees que contenen la columna motora lateral (LMC).
- Es fa un contrastat amb citrat de plom, segons Reynolds.

- Les mostres s'han observat amb un microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM 910.

6.2.- Immunohistoquímica.

S'han processat mostres d'embrions E7,5 controls i tractats amb β -Bgtx per dos procediments diferents, amb els quals s'ha realitzat la immunohistoquímica amb l'anticòs primari c-Jun/sc45 per a microscòpia electrònica.

6.2.1.-Procediment per preinclusió.

- Fixació per immersió en una solució mixta que conté glutaraldehyd 0,25% i paraformaldehyd 4% en tampó fosfat 0,1 M (PB), pH 7.4 durant 2 h a 4°C
- Rentat amb tampó fosfat 0,1 M.
- Inclusió en blocs d'àgar.
- Seccionament transversal de 50-100 μ m amb un vibràtom i selecció de les seccions corresponents a la regió lumbar.
- Crioprotecció en sacarosa 25% i glicerol 10% en PB 0,05 M durant 4h.
- Un cicle de congelació i descongelació amb 2-metil butà i nitrogen líquid.

Seguidament s'ha realitzat la immunohistoquímica per dos procediments diferents:

1) Immunoperoxidasa

- Bloqueig de la peroxidasa endògena amb H_2O_2 1% en PBS durant 45 minuts.
- Rentats amb PBS (3x5').
- Incubació amb sèrum de cabra (NGS) 10% durant 30 minuts, per bloquejar les unions inespecífiques dels anticossos.
- Incubació de les seccions amb l'anticòs primari c-Jun/sc45, diluït 1/200 en PBS, durant tota la nit a 4°C .
- Rentats amb PBS (3x5').

- Incubació amb l'anticòs secundari (anti-immunoglobulines de conill) conjugat amb biotina (Laboratoris Vector), diluït 1/100 durant 1h.
- Rentats amb PBS (3x5').
- Incubació amb el complex ABC (ABC, élite de laboratoris Vector) durant 1 h .
- Rentats amb PBS (3x5').
- Revelat amb diaminobenzidina (DAB) (5mg DAB + H₂O₂ 0,01% en PBS).
- Postfixació amb tetraòxid d'osmi 1% en PB durant 2 h.
- Deshidratació amb acetones de gradació creixent.
- 30 min en òxid de propilé.
- Inclusió de 45 min amb una barreja d'òxid de propilé-Durcupam ACM sense component C (Fluka, Suïssa) 3:1, 1:1 i 1:3.
- 2 banys de 60 min a 60°C en Durcupam ACM sense component C.
- Inclusió en Durcupam ACM (complet) 4 banys de 25 min a 60 min.
- Fer blocs i polimeritzar a 60°C de 2 a 4 dies.
- Es realitzen seccions semifines de 1µm i se seleccionen àrees que contenen la columna motora lateral (LMC).
- Es fa un contrastat amb acetat d'uranil i citrat de plom, segons Reynolds.
- Les mostres s'han observat amb un microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM 910.

2) Immunohistoquímica amb or col·loïdal

- Bloqueig amb albúmina bovina 1% en PBS, durant 5 minuts.
- Incubació amb l'anticòs primari c-Jun/sc45, diluït 1/200 en albúmina bovina/PBS, tota la nit en una cambra humida.
- Rentats amb albúmina bovina 1 %/PBS (5x1').
- Incubació amb l'anticòs secundari (anti-immunoglobulines de conill) conjugat amb or col·loïdal de 1 nm i amplificació amb plata (AuroProbe™ M Silver enhancement kit Amersham), durant 1h.
- Rentats amb aigua bidestilada, 5 vegades durant 1 minut.

- Osmificació i inclusió en Durcupan seguint el procés descrit anteriorment fins a l'observació amb el microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM 910.

6.2.2.- Procediment per crioultramicrotomia.

- Fixació per immersió en una solució mixta que conté glutaraldehid 0,1% i paraformaldehid 4% en tampó fosfat 0,1 M(PB), pH 7.4, durant 2 h a 4°C.
- Crioprotecció amb sacarosa 2.3 M en PBS.
- Muntatge de les mostres en portaobjectes específics per a l'obtenció de seccions per crioultramicrotomia.
- Congelació ràpida amb nitrogen líquid.
- Obtenció de seccions de 90 nm amb un crioultramicrotom Reichert FCS (Leica, Heerbrugg, Switzerland)
- Muntatge amb reixetes de Niquel i Carbó amb Formvar.

Immunohistoquímica amb crioseccions:

- Rentats amb glicina 0.02M en PBS per inactivar els grups aldehids (3x10').
- Incubació amb l'anticòs primari c-Jun/sc45, diluït 1/200, durant 30 minuts.
- Rentats amb BSA 1%/PBS (4x1').
- Incubació amb proteïna A conjugada amb partícules d'or coloidal de 10 nm.
- Rentats amb PBS (4x5').
- Rentats amb aigua destilada (4x1').
- Tinció de les seccions amb acetat d'urani en metil cel·lulosa, segons el procediment descrit per Tokuyasu (Tokuyasu, 1980).
- Observació amb el microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM 910.

7.- HIBRIDACIÓ IN SITU.

La hibridació *in situ* (ISH) s'ha realitzat utilitzant una ribosonda marcada amb digoxigenina que es va obtenir a partir del plasmidi pNB3 (derivat de pGEM) en el què s'havia subclonat el cDNA corresponent a un fragment de 498 nucleòtids de la regió 5' de c-jun de pollastre.

La cadena “antisentit” es va obtenir de la transcripció amb la polimerasa SP6 del plasmidi tallat amb l’enzim de restricció APAl. La cadena “sentit” es va obtenir de la transcripció amb la polimerasa T7 del plasmidi tallat amb l’enzim PstI.

7.1.- Obtenció de la ribosonda.

7.1.1.-Purificació i linearització :

El plasmidi en què tenim clonat el cDNA de c-jun es transforma a E. Coli DH5 α i es guarda a -80°C.

Utilitzem el Kit Wizard Plus MiniPreps DNA purification System (Promega) per obtenir el plasmidi purificat amb el nostre insert a partir d’una colònia d’E.Coli DH5 α que hem fet créixer en un cultiu líquid (LB) i ampicilina durant tota la nit a 37°C i que conté el plasmidi. Una vegada purificat, segons les indicacions de la casa comercial, s’en verifica l’obtenció i s’obté la concentració del plasmidi carregant-lo en un gel d’agarosa.

A continuació es realitza la digestió mitjançant l’enzim de restricció ApaI que ens permetrà linearitzar el plasmidi per poder transcriure la cadena “antisentit” (i mitjançant PstI per la cadena “sentit”). Per a la digestió del plasmidi incubem en un bany a 37°C durant 2 hores:

80 μ l de plasmidi+9 μ l de Buffer (segons l’enzim de restricció)+1 μ l d’H₂O+1 μ l d’enzim de restricció (0,4 unitats/ μ gDNA) (Promega).

Després de la digestió comprovem per electroforesi si s’ha linearitzat bé el plasmidi en un gel d’agarosa.

Eliminem el Buffer per mantenir el DNA dissolt en H₂O₂ abans de transcriure amb un Kit QIAquick Spin Handbook (Qiagen) seguint les instruccions de la casa comercial.

A partir d’ara mantindrem condicions RNasa “free”.

7.1.2.- Transcripció.

- Incubació en un bany a 37°C durant 2h:
 - 2 µl de Buffer de transcripció 10x
 - 1 µl d'HPRI (un inhibidor d'RNases)
 - 2 µl de Dig RNA labelling mix (Boehringer) (barreja de ribonucleòtids en què un d'ells (UTP) va marcat amb digoxigenina)
 - 2 µl d'RNA polimerasa SP6 per obtenir la cadena "antisentit" (i T7 per obtenir la cadena "sentit")
- Inactivació dels enzims durant 10' a 75°C.
- Afegir 78 µl d' aigua bidestilada.
- Afegir 2 µl DNasa a 37°C durant 20' per degradar el DNA motllo.
- Afegir 80 µl d'aigua bidestilada.
- Afegir 20 µl de Na OAc 3 M, pH 5.3.
- Afegim 500 µl d'etanol absolut.
- Congelació a -20°C durant tota la nit.
- Centrifugació 15' a 4°C i un rentat del *pellet* amb 1 ml d'alcohol 70° fred (congelat a -20 °C).
- Centrifugació 5', eliminar el sobrenedant i assecar completament el *pellet* en la bomba de buit.
- Resuspendre en 30 µl d'aigua bidestilada.

Per la valoració de la sonda s'en van fer dilucions i es van analitzar per dot-blot. El revelat es va fer amb NBT-BCIP i es van comparar amb un RNA control marcat amb digoxigenina del qual es coneixia la seva concentració (DIG-labelled control RNA de Boehringer).

7.2- Extracció de les mostres.

La hibridació "in situ" s'ha realitzat amb embrions E7 als quals se'ls ha injectat 1µl de β-Bgtx (100ng/µl) en el múscul de l'extremitat inferior dreta per detectar els canvis d'expressió de c-jun en les motoneurons, després d'induir apoptosi .

- Fixació amb PFA 4% en PB 0,1 M durant tota la nit.

- Crioprotecció amb PBS/sacarosa 30 % durant 24 h.
- Congelació i inclusió en medi *TFM*.
- Es realitzen seccions de 16 µm al criostat amb una ganiveta d'ISH prèviament rentada amb etanol 70%/DEPC. Les mostres es recullen en portaobjectes coberts amb 3-aminopropyltriethoxysilà (Sigma).
- S'eixuguen les mostres tota una nit a 37 °C al forn d'hibridació (Hybaid, Teddington, United Kingdom).

7.3.- Tractament del teixit.

- Fixació de l'RNA en les mostres per calor a 50° C durant 2 minuts. Es fa col·locant les mostres sobre una planxa calenta.
- Deixar assecar les preparacions a temperatura ambient 30 min.
- Rentat de 5 min en PBS.
- Permeabilització del teixit amb PBS TritóX-100 al 0,3% 30 minuts.
- Rentats en PBS 2x 5 min.

7.4.- Tractament amb RNasa com a control de la hibridació.

A una part de les mostres se'ls fa un tractament amb RNasa, com a control de la hibridació:

- Incubar les mostres amb 2x salí citrat estàndard (“Standard Saline Citrate”) (SSC) en un forn de 37°C durant 2'.
- Escalfar 200 ml de 2xSSC a 37°C i afegir-hi 200 µl de RNasa (10 mg/ml). Incubar durant 30 min a 37°C.
- Rentats 2xSSC durant 2 minuts.
- Rentat de totes les mostres, incloent les que hem utilitzat com a controls d'hibridació amb 100 mM Tris, pH 7.5/50 mM EDTA, pH 8.0, durant 2 min.
- Digestió amb proteïnasa K: incubació amb proteïnasa K 0,5 µg/ml en tampó 100 mM TrisHCl/50 mM EDTA pH 8.0, durant 4 min a 37°C. S'ha de preescalfar a 37°C la solució i en el moment d'utilitzar afegir-hi la proteïnasa K. Rentar 2 min amb el mateix tampó.
- Postfixació amb PFA 4%/PBS durant 5 min.

- 2 rentats de 5 min. en PBS.
- Acetilació 10 min. amb el tampó 0,1 M trietanolamina, pH 8, que conté:
 - 200 ml H₂O₂ DEPC
 - 3.7 gr Trietanolamina
 - 1 ml NaOH 5M (per ajustar el pH a 8,0)
 - 0.25% (v/v) àcid acètic anhidre (0,5 ml), que s'afegeix en el moment d'utilitzar-ho, i es manté en tot moment en agitació.
- Rentar les mostres amb 2xSSC 10 min i deixar escórrer uns segons.
- Deshidratació:
 - 3 min en etanol 70°.
 - 2 rentats de 2 min en etanol 95°.
 - 2 rentats de 2 min en etanol absolut.
 - 1 min amb cloroform.
- Deixar assecar de 3 a 4 h.

7.5.- Hibridació.

La hibridació es va realitzar amb 2ng de les ribosondes marcades amb digoxigenina a 57°C durant 24 h.

- Barrejar la sonda marcada amb el tampó d'hibridació i escalfar durant 5 min a 80°C abans d'utilitzar.
- Deixar la sonda a temperatura ambient.
- Incubar en el forn d'hibridació (Hybaid) a 57°C durant 24 h a una concentració 1/200. S'apliquen 60 µl/ porta i es cobreix amb un cobreobjectes siliconitzat.

Composició tampó hibridació per 3 ml final:

	<u>Quantitat</u>	<u>Final</u>
20xSSC	500 µl	4x
100% formamida	1.25 ml	50%
50xDernhards	250µl	5x
Tris pH 7.0	250 µl	0.05M
10% lauronil sarcosina	250µl	1%

ssDNA	38µl	
tRNA	25µl	
0.25 M Napirofosfat	10 µl	1mM
0.5 EDTA pH 8.0	25 µl	5 mM
50% dextransulfat	500µl	10%

El ssDNA s'ha de bullir, prèviament, durant 5 min per desnaturalitzar-lo.

L'especificitat de la hibridació es va controlar per hibridació de les ribosondes en les seccions tractades prèviament amb RNasa.

7.6.- Rentats astringents.

- 2 rentats de 5 min amb 1xSSC / 0.1 % SDS a temperatura ambient.
- 2 rentats de 10 min 0.2xSSC 0.1% SDS a 55° en el forn.
- Rentat de 2 min 2xSSC.
- Incubació amb RNasa (10 µg/ml) en 2xSSC a 37° durant 30 min.
- 2 rentats de 2 min. amb 2xSSC.
- Rentat de 5 min amb TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 400 mM NaCl).

7.7.- Detecció de la hibridació.

- Incubació amb la solució de bloqueig (0.5 % (w/v) de l'agent bloquejant en TBS) durant 1 h.
- Rentat amb TBS durant 1 minut.
- Incubar durant 1 hora amb l'anti-Digoxigenina, diluït 1:500 en TBS/ 0.5 % BSA fracció V.
- 3 rentats de 5 min en TBS.
- Rentat amb tampó de detecció (100mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂), durant 5 min.
- Incubar amb el revelador compost per: tampó de detecció amb 0,45% de "nitroblue tetrazolium" (NBT) i 0,35% de %-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat (BCIP) com a mínim durant 4 h o tota la nit, a les fosques. Aplicar 500 µl de revelador per porta.
- 2 rentats de 2 min en ddH₂O.

- Muntar amb gliceringelatina/PBS.

8.- ANÀLISI DE WESTERN-BLOT.

Per a cada experiment s'han utilitzat al voltant de 10 medul·les espinals de la zona lumbar d'embrions E5, E6, E7,5, E10, E14 i d'embrions E8 salins i tractats amb β -Bgtx a E7. També s'han analitzat mostres amb 2 o 3 retines d'embrions E8 salins i tractats amb β -Bgtx a E7.

8.1.- Preparació de les mostres.

Tant les medul·les com les retines s'han dissecat en fred, s'han congelat amb Nitrogen líquid i s'han guardat congelades a -80°C .

Per obtenir extractes totals de proteïnes es realitza la homogeneïtzació amb una xeringa per on fem pasar les mostres diverses vegades, mantingudes sempre en un tampó bullint 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 amb un detergent "sodium dodecyl sulfate" (SDS) al 2%. Després centrifuguem 10' a 12000 rpm i guardem el sobrenedant per valorar la concentració de proteïnes d'aquests extractes totals.

Alternativament, s'han processat les mostres per separar la fracció citoplasmàtica de la nuclear:

- Homogenització en un tampó de lisi que conté:

10 mM Hepes, ph 7.9

10 mM KCL

0,2 mM EDTA

1 mM DTT

0,5 mM PMSF

10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina

- Les mostres es resuspenen en fred en aquest tampó amb una punta de pipeta groga fins a obtenir una textura homogènia de la mostra. Després es mantenen en gel durant 15 minuts.
- Afegir Nonidet P-40 (en una concentració final del 0,65%).

- Centrifugació de l'homogenat durant 30 segons.
- Separar en dos tubs el sobrenadant que conté la fracció citoplasmàtica del pellet, que conté la fracció nuclear .
- Centrifugar la fracció citoplasmàtica 10 minuts a 4° C. Guardar el sobrenadant per valorar la concentració de proteïnes citosòliques i descartar el pellet que conté la fracció de membranes.

Per a l'extracció de proteïnes de la fracció nuclear es segueix el mateix procediment que s'ha descrit abans amb els extractes totals.

La concentració proteica s'ha determinat utilitzant el "DC Protein Assay" (BioRad, Hercules, Ca).

8.2.- Electroforesi.

Els diferents extractes s'han processat per la tècnica d'electroforesi en gels de poliacrilamida amb el detergent "sodium dodecil sulfate" (SDS-PAGE). El detergent aniònic solubilitza, dissocia i desnatura la majoria de proteïnes donant lloc a cadenes polipeptídiques úniques. La majoria de proteïnes uneixen suficient SDS per emascarar la càrrega intrínseca de les cadenes polipeptídiques i la càrrega per unitat de massa es torna aproximadament, constant. D'aquesta forma, els complexos SDS-proteïna migren cap a l'ànode durant l'electroforesi i la separació electroforètica depèn només del seu pes molecular. La concentració d'acrilamida en el gel determina el rang de separació de les proteïnes en l'electroforesi. Les proteïnes que s'han analitzat són relativament petites, i per això s'ha utilitzat un gel de separació amb un 10 % d'acrilamida.

- Preparar el gel de separació i deixar-lo polimeritzar durant 45-60 min.
- Preparar el gel de concentració (al 3%) i una vegada polimeritzat el gel de separació es diposita a sobre i es deixa polimeritzar uns 30 min.
- Preparació de les mostres: les mostres s'han diluït 1:1 amb un tampó de càrrega 2x.

Composició del tampó de càrrega 2x:

Tris HCl 0,29 M, pH 6.8

8,57% w/v SDS

30% w/v glicerol

4,17% mercaptoetanol

0,01% w/v blau de bromofenol

- Es barrega bé la mostra amb el tampó de càrrega i es bull la mescla durant 5 min.
- Es carreguen 20 µg de proteïna per a cada carrera i també cal carregar 5 µl d'un estàndard de baix pes molecular (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) com a referència dels pesos moleculars. A més s'han carregat els anticossos policlonals c-Jun/sc45, prèviament incubats amb el pèptid immunògen per descartar una possible contaminació dels anticossos.
- S'omplen els espais de les carreres i la cubeta amb el tampó d'electroforesi.

Composició del tampó d'electroforesi:

25 mM Trizma base, pH 8.3

191 mM glicina

0,1 % SDS

- Es fa córrer el gel a 30 mA aproximadament durant 1 h.

8.3.- Transferència.

Després de l'electroforesi, es fa la transferència de les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa PVDF (Millipore, Bedford, MA) aplicant un camp elèctric perpendicular al pla del gel. S'ha realitzat en un sistema de transferència en semisec (Sistema continu, Bio-Rad). Per això la membrana i el gel es mantenen en contacte envoltats de paper (Blot Paper, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA) a manera d'esponja, sota pressió.

- Es permeabilitza la membrana, primer en metanol, i es renta amb aigua, i finalment, se submergeix en tampó de transferència durant 5 min com a mínim.
- Es mullen els papers de filtre en tampó de transferència i es col·loquen amb la

- membrana i el gel entremig, evitant que quedin bombolles d'aire.
- S'aplica el camp elèctric durant 1 h a 50 mA.
 - Preparació del tampó de transferència:
 - Tris 48 mM pH 9.2
 - Glicina 39 mM
 - SDS 1,3 mM
 - Metanol 10% (v/v)
 - Al final de la transferència i per a minimitzar la fixació inespecífica de l'anticòs, es fa un bloqueig durant 1 h a temperatura ambient, o tota la nit a 4°C amb TBST (20 mM Tris pH 8.0, 125 mM NaCl, 0,05% Tween-20) i llet desnatada 5% amb agitació suau.
 - Rentat ràpid amb el tampó TBST contenint 0,2 % de llet desnatada.
 - Aplicar l'anticòs primari diluït en TBST amb 0,2% de llet desnatada durant 1 h, amb agitació molt suau. S'han utilitzant els anticossos primaris: c-Jun/sc-45 (1:1000) i c-Jun/mAB (1:1000).
 - Rentats amb TBST contenint 0,2% de llet desnatada.
 - Incubació durant 1 h amb els anticossos secundaris (anti-immunoglobulines de conill o ratolí) conjugats amb peroxidasa (Amersham, Buckinghamshire, UK), diluïts 1:5000.
 - 3 rentats amb TBST, de 5 min.
 - La immunoreactivitat és va detectar amb el revelat durant un minut, a temperatura ambient, amb els reactius ECL ("Enhanced Chemiluminescence") d'Amersham. Aquest sistema de detecció utilitza peroxidasa conjugada amb l'anticòs secundari com a catalitzador de l'oxidació de luminol en presència de peròxid d'hidrògen. Després d'aquesta reacció, el luminol passa a un estat excitat i torna al seu estat inicial de baixa energia emetent llum. Entre els reactius de l'ECL s'inclou un agent fenòlic que és capaç d'amplificar més de 100 vegades la intensitat de llum emesa. La llum emesa presenta un màxim entre els 5 primers minuts d'exposició després dels quals decau lentament.
 - Exposar la pel·lícula fotogràfica Fuji film (Fuji Photo Film CO, Tokyo, Japó) durant 15 min.

- Paral·lelament es detecta i quantifica la immunoreactivitat amb el sistema “Lumi-Imager” (Boehringer Mannheim).

9.- EXPERIMENTS *IN VITRO* I *IN SITU* PER A LA INDUCCIÓ PROTEOLÍTICA MITJANÇADA PÈR LA CASPASA-3.

S’han analitzat extractes de la fracció citoplàsmatica de medul·la espinal i seccions histològiques a E10 amb caspasa-3 activa recombinant, d'origen humà (Pharmingen/Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

El tractament dels extractes amb caspasa-3 activa s’ha realitzat pel mètode descrit per Stennike et al., (1997) modificat. Els extractes s’incuben amb la caspasa-3 activa en un tampó 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) que conté 25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1% CHAPS, 10% sacarosa i diversos inhibidors de proteases. La reacció enzimàtica es porta a terme a 37°C durant un hora, en un volum de 15µl que conté:

30 µg d’extractes de proteïnes citoplasmàtiques
100 ng de caspasa-3 activa.

Les mostres van ser analitzades per western i dot blot.

Per comprovar l’activitat proteolítica de la caspasa-3 es va afegir un inhibidor de caspasa-3 a la reacció. Es va utilitzar Z-VAD-FMK (Enzyme Systems Products, Livermore, CA) a una concentració final de 80 µM.

Pel tractament *in situ* es van utilitzar seccions de criostat que es van incubar amb 10 ng de caspasa-3 activa en un tampó 25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1% CHAPS, 10% sacarosa (*Tampó A*). Les seccions de 10 µm es van recollir en portaobjectes SuperFrost Plus (Menzel-Glaser, Germany) i es van deixar secar tota la nit a temperatura ambient. Es van realitzar 3 rentats de 10’ amb *Tampó A* a 37°C i seguidament es van incubar les mostres amb 10 ng de caspasa-3 activa en *Tampó A* durant 4 hores a 37°C. A continuació es van rentar les mostres amb PBS i es van processar per immunofluorescència. Com pels extractes de proteïnes, en

aquestes seccions també es va testar l'activitat proteolítica de la caspasa-3 afegint Z-VAD a la reacció.

10.- EXPERIMENTS FARMACOLÒGICS.

El dia abans de començar els experiments es disposen els ous de forma horitzontal, es fa una petita finestra en la closca de l'ou que es segella amb cinta adhesiva, i els ous es retornen a l'incubadora. Els tractaments s'han portat a terme injectant volums de 50 a 150 µl de les solucions indicades, directament amb una pipeta sobre la membrana corioalantoïda que, donat que està força vascularitzada, permet una ràpida absorció del fàrmac (excepte els experiments amb β-bgtx en què s'ha injectat la solució directament en el múscul). Totes les drogues utilitzades són solubles amb aigua i s'han dissolt en sèrum fisiològic esterilitzat per ultrafiltració.

10.1.- Tractament amb un agonista del receptor NMDA.

S'han realitzat experiments amb l'agonista típic N-Methyl-D-Aspartic àcid (NMDA) (Sigma).

10.1.1- Tractament agut amb NMDA.

Per estudiar la immunoreactivitat dels anticossos c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada en un model d'excitotoxicitat, s'ha realitzat un tractament agut amb NMDA que produeix la mort necròtica de les motoneurons, tot lesionant la medulla espinal com s'ha descrit en l'estudi realitzat per Calderó et al., (1997). En aquest tractament s'ha administrat una sola dosi d'1 mg d'NMDA a E7 i després de 12 h s'han sacrificat els embrions, s'ha dissecat la zona lumbar de l'embrió i s'han processat per immunohistoquímica.

10.1.2.- Tractament crònic amb NMDA.

S'ha utilitzat aquest tractament per estudiar la immunoreactivitat de l'anticòs c-Jun/mAB en un model que promou la supervivència de les MNs tal i com s'ha descrit en els estudis realitzats per Lladó et al., (1999).

Pel tractament crònic amb NMDA s'han administrat 0,5 mg a E5, E6 i 0,25 mg a E7, E8, E9, i s'han sacrificat els embrions a E6, E7,5 i E8 .

10.2.- Tractament amb β -Bgtx.

La β -Bungarotoxina (β -Bgtx) és una neurotoxina que es troba en el verí de *Bungarus multicinctus* i que s'ha vist que inhibeix la transmissió sinàptica a través de la membrana presinàptica. Encara que el seu mecanisme d'acció és desconegut, s'ha demostrat que és capaç d'induir la mort apoptòtica massiva de les motoneurons de la medulla espinal de pollastre durant el període de la PCD (Pittman et al., 1978).

Per induir experimentalment la mort massiva de motoneurons s'han tractat els embrions amb 1 μ l de β -Bgtx (100ng) (Sigma, St. Louis, MO) a E7 de la següent manera:

S'ha realitzat una petita incisió en una àrea no vascularitzada de la membrana coriolantoidea (CAM), després s'ha extret l'extremitat inferior dreta amb l'ajut d'unes pinces i s'ha lligat amb un fil molt prim per tal de subjectar-la. A continuació, se li ha injectat, per via intramuscular, una dosi d'1 μ l (100 ng) de β -Bgtx diluïda en sèrum fisiològic amb una microxeringa de 10 μ l Hamilton (amb un capil·lar tubular en forma d'agulla molt fina en l'extrem). Els embrions s'han sacrificat a les 3h, 6h, 12h, 24h i 36h després de la injecció. Els efectes produïts per β -Bgtx en el costat contralateral són molt similars als produïts en el costat ipsilateral, ja que s'ha vist que un nombre suficient de mol·lècules són transportades a través del flux sanguini produint pràcticament els mateixos efectes fora de l'àrea injectada (Pittman et al., 1978). S'han utilitzat, com a controls, embrions injectats amb sèrum fisiològic.

10.3.- Tractaments crònics amb muscimol i bicuculina.

Els embrions s'han tractat amb Muscimol (MUS) (Sigma, ST. Louis, MO) que és un agonista dels receptors GABA_A que bloqueja indirectament l'activitat neuromuscular mitjançant la inhibició de l'activitat elèctrica de les motoneurons de la medulla espinal en l'embrió de pollastre (Usiak i Landmesser, 1999). S'han estudiat els efectes del muscimol durant el període de PCD i els possibles efectes que pot provocar en l'expressió de c-Jun pel bloqueig de l'activitat neuronal.

La (+)-bicuculina (SIGMA, St. Louis, MO) és un antagonista que inhibeix el receptor GABA_A que s'ha utilitzat per bloquejar els efectes del muscimol.

S'han realitzat els tractaments crònics següents:

– Tractament amb Muscimol (MUS) de 0,1mg/dia (E5,5-E10):

1 injecció a E5.5 de 0,05 mg MUS/100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6, E7, E8 i E9 de 0,05 mg MUS/100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6.5, E7.5, E8.5 i E9.5 de 0,05 mg MUS /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E10 de 0,05 mg MUS /100µl sèrum fisiològic

Els embrions s'han sacrificat a E6, E8, E10, després de tres hores de la injecció amb MUS, i a E12.

Es va realitzar el mateix tractament amb dosis diferents de muscimol: 0.001, 0.01, 0.05, 0.1 i 0.2 mg/dia . Aquests embrions es van sacrificar a E10, després de tres hores de la injecció amb MUS.

– Tractament amb Muscimol i (+)-bicuculina (E5,5-E8)

1 injecció a E5.5 de 0,05 mg MUS + 0,1mg (+)-bicuculina /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6, E7, E8 i E9 de 0,05 mg MUS + 0,1mg (+)-bicuculina /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6.5, E7.5, E8.5 i E9.5 de 0,05 mg MUS + 0,1mg (+)-bicuculina /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E10 de 0,05 mg MUS + 0,1mg (+)-bicuculina /100µl sèrum fisiològic

Aquests embrions es van sacrificar a E9, després de tres hores de la injecció amb MUS i (+)-bicuculina.

– Tractament amb (+)-bicuculina (E5.5-E8)

1 injecció a E5.5 de 0,1mg (+)-bicuculina /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6, E7, E8 i E9 de 0,1mg (+)-bicuculina /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6.5, E7.5, E8.5 i E9.5 de 0,1mg (+)-bicuculina /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E10 de 0,1mg (+)-bicuculina /100µl sèrum fisiològic

Aquests embrions es van sacrificar a E9, després de tres hores de la injecció amb (+)-bicuculina.

– Tractament Muscimol (E5.5-E11.5)

1 injecció a E5.5 de 0,05 mg MUS /100µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6, E7, E8, E9, E10 i E11 de 0,05 mg MUS /100 µl sèrum fisiològic

1 injecció a E6.5, E7.5, E8.5, E9.5, E10.5 i E11.5 de 0,05 mg MUS /100 µl sèrum fisiològic

Els embrions s'han sacrificat a E12, després de tres hores de la injecció amb MUS.

11.- ESTUDIS DE MOTILITAT DE L'EMBRIÓ.

Els estudis de motilitat es van realitzar amb l'ajuda d'un microscopi binocular en un grup d'embrions que havien de ser processats tant pels recomptes cel·lulars com per immunohistoquímica. Es va utilitzar una font lluminosa de fibra òptica. Es van comptar els moviments en períodes de 3 min, abans de sacrificar els embrions tractats amb muscimol. A E5 i E6 es va comptar el nombre de moviments actius de qualsevol part de l'embrió i a partir d'E7 es van comptar els moviments de la cuixa.

12.- OPERACIONS D'ABLACIÓ DE L'ESBÓS DE L'EXTREMITAT (LBR).

Es tracta d'eliminar l'esbós de la pota a E2,5, que es correspon amb l'estadi 16-18 segons el mètode de Hamburger i Hamilton, (1951). El mètode quirúrgic consisteix a eliminar l'esbós de la pota dreta amb una agulla de tungsté afilada amb una flama (Chu-Wang i Oppenheim, 1978; Oakley et al., 1997; Calderó et al., 1998). Només es van analitzar els embrions que presentaven una absència completa del múscul de l'extremitat en el moment del seu sacrifici. Com que l'LBR unilateral en el pollastre no té cap efecte sobre el desenvolupament de les MNs contralaterals (Oppenheim et al., 1978), es va utilitzar el costat contralateral com a control. Els embrions es van sacrificar a E6,5, E7,5, E9,5.

13.- AXOTOMIA.

S'ha realitzat l'axotomia unilateral a E13 mitjançant l'amputació de la pota dreta a embrions prèviament anestesiats amb xilocaine segons el mètode descrit per Houenou et al., (1994). Els embrions es van sacrificar 24h després de l'operació.

14.- ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS.

Les dades s'han analitzat estadísticament segons el test *t* d'Student i Mann-Whitney. Es considera que les diferències són significatives quan la *p* és menor de 0,05.

VI. RESULTATS

1.- CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS ANTI-c-JUN UTILITZATS:

Com ha estat exposat anteriorment, diversos treballs han posat de manifest que c-Jun és un factor de transcripció que podria estar implicat en la mort neuronal. Partint d'aquesta hipòtesi de treball, ens vam plantejar estudiar el paper de c-Jun en el model de la PCD natural o induïda de les motoneurons espinals lumbars durant el desenvolupament embrionari. Per portar a terme aquest estudi s'han caracteritzat dos tipus diferents d'anticossos comercials anti-c-Jun:

- 1) L'anticòs monoclonal c-Jun/mAB generat contra un fragment peptídic de 15,5 Kd que correspon als aa 26-175 de c-Jun de ratolí (Laboratoris Transduction, Lexington, KY).
- 2) Els anticossos policlonals:
 - a) de conill (c-Jun/sc45) o de cabra (c-Jun/sc45g) dirigits contra el pèptid TPTPTQFLCPKNVTD que es correspon amb els aa 91-105 del domini amino-terminal de c-Jun p39 de ratolí (Laboratoris Santa Cruz Biotechnology).
 - b) de conill (c-Jun/AB2) dirigits contra un pèptid que conté els 15 aminoàcids (73-87) corresponents al domini amino-terminal de v-jun (PC07, Oncogene Research Products). Aquesta seqüència es correspon amb la mateixa seqüència que l'anterior.

Per determinar l'especificitat d'aquests anticossos es van analitzar, per western-blot, extractes totals de mostres procedents de medul·la espinal lumbar d'embrió de pollastre a E7,5 i es va observar que els anticossos policlonals i el monoclonal evidenciaven patrons de bandes molt diferents. Mentre que, l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB reconeixia específicament una única banda de 39kD amb una mobilitat que es corresponia amb l'esperada per a c-Jun de pollastre (Fig.1), els anticossos policlonals mostraven un ampli patró de bandes de diferents pesos moleculars, i només, quan els anticossos c-Jun/sc45 s'utilitzaven molt concentrats es detectava dèbilment la banda de 39kD (Fig.1). Es va observar que l'anticòs c-Jun/mAB només reconeixia la banda de 39kD a la fracció nuclear, mentre que els anticossos c-Jun/sc45 detectaven diferents bandes en la fracció citoplasmàtica i

algunes d'aquestes bandes, juntament amb la de 39 kD, en la fracció nuclear.

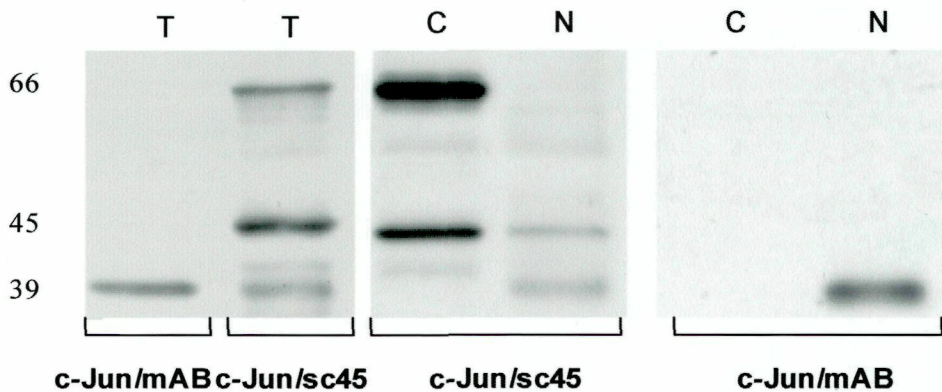


FIGURA 1. Western blots de medul·la espinal d'embrions de pollastre a E7,5 pels anticossos c-Jun/mAB i c-Jun/sc45. L'anàlisi de Western blot amb l'anticòs c-Jun/mAB d'extractes fraccionats de medul·la espinal a E7,5, posa de manifest la presència de c-Jun p39 en la fracció nuclear, mentre que amb l'anticòs c-Jun/sc45 es detecten diverses bandes majoritàriament distribuïdes en la fracció citoplasmàtica. T= extractes totals de medul·la espinal; C= extractes de la fracció citoplasmàtica de medul·la espinal; N=extractes de la fracció nuclear de medul·la espinal.

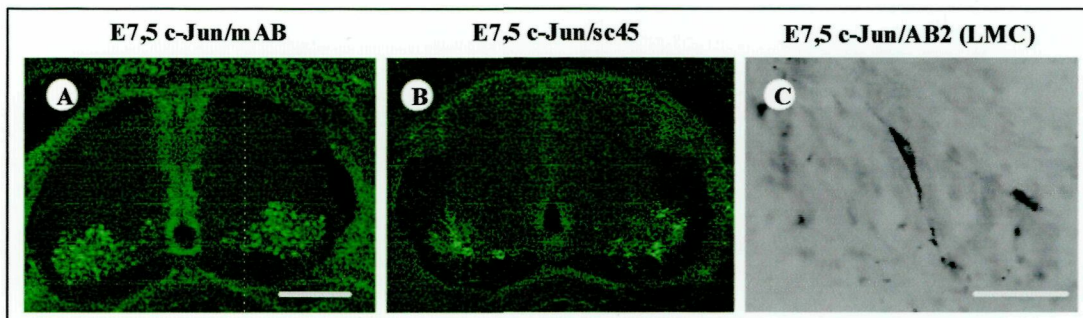


FIGURA 2. Imatges de la immunohistoquímica amb els anticossos c-Jun/mAB (A), c-Jun/sc-45 (B) i c-Jun/AB2 (C) en seccions de medul·la espinal d'embrions de pollastre a E7,5. La immunoreactivitat amb aquests anticossos es localitza majoritàriament a nivell de la LMC (A, B i C). El marcatge per immunofluorescència amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB té un patró nuclear (A) i amb l'anticòs policlonal c-Jun/sc45 té un patró citoplasmàtic (B). En la figura (C) el marcatge per immunoperoxidasa amb l'anticòs policlonal c-Jun/AB2 també mostra un patró citoplasmàtic tant en el soma cel·lular com en els axons i les dendrites. Barra de calibratge per A i B = 250 µm, per C= 50 µm.

En els estudis immunohistoquímics realitzats amb aquests anticossos en seccions de criostat de medul·la espinal a E7,5, es va observar que els dos tipus d'anticossos definien patrons d'immunomarcatge molt diferents. Per una banda, l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB presentava el patró d'immunomarcatge esperat el qual es caracteritzava per ser un marcatge molt específic dels nuclis de determinades poblacions neuronals (Fig.2A) i per l'altra, tots els anticossos policlonals (c-Jun/sc45, c-Jun/sc45g i c-Jun/AB2) mostraven un patró d'immunomarcatge clarament citoplasmàtic, "Golgi-like", el qual sovint era propi de cèl·lules que tenien el nucli picnòtic (Fig.2B i C).

Amb aquests resultats tan contradictoris ens vam plantejar tota una sèrie de qüestions a resoldre:

- 1) Podrien aquests dos tipus d'anticossos reconèixer diferents formes o estadis funcionals de c-Jun?
- 2) La immunoreactivitat citoplasmàtica, podria ser una conseqüència d'una translocació de c-Jun del nucli al citoplasma?
- 3) Reconeixen els mateixos antígens els anticossos policlonals i el monoclonal?
- 4) Quina relació tenen les proteïnes detectades amb c-Jun/sc45 amb la PCD de les MNs espinals?

Amb la finalitat d'intentar resoldre totes aquestes qüestions sorgides a partir dels resultats immunohistoquímics preliminars, ens vam plantejar realitzar primer un estudi sobre l'expressió i localització de c-Jun durant la PCD natural o induïda amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB, el qual marcava selectivament el nucli cel·lular que consideravem que era un excel·lent marcador de c-Jun; i en segon lloc, fer un estudi paral·lel amb els anticossos policlonals c-Jun/sc45 i AB-2, destinat a esbrinar la identitat de les molècules que reconeixen aquests anticossos i la seva relació amb la PCD, natural o induïda, en la medul·la espinal d'embrions de pollastre.

Per tal de fer aclaridors aquests resultats els presentarem en dos apartats: un relacionat amb l'expressió de c-Jun detectat per l'anticòs monoclonal i l'altre vinculat als determinants antigènics reconeguts pels anticossos policlonals.

2.- EXPRESSIÓ DE c-JUN DURANT LA PCD NATURAL O INDUÏDA DE LES MOTONEURONES ESPINALS LUMBARS DE L'EMBRIÓ DE POLLASTRE.

Tenint en compte que l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB reconeix una proteïna de 39kD, ubicada preferentment al nucli cel·lular, s'ha considerat que aquest anticòs identifica realment c-Jun. És per aquest motiu que ha estat utilitzat l'anticòs c-Jun/mAB per estudiar l'expressió de c-Jun durant el desenvolupament i les seves possibles implicacions en la PCD de les motoneurones.

2.1.- Expressió i localització de c-Jun.

En l'embrió de pollastre, la PCD que afecta la LMC de la regió lumbosacra de la medul·la espinal té lloc entre E6-E9. Durant aquest període s'ha descrit que el pic màxim de motoneurones que moren per apoptosi es troba entre E7 i E8 (Hamburger, 1975; Chu-Wang i Oppenheim, 1978).

Es va realitzar la immunohistoquímica en seccions lumbar de medul·la espinal a E7,5 amb la finalitat d'estudiar la relació de c-Jun amb el procés de mort apoptòtica. El marcatge de c-Jun/mAB és localitzava exclusivament en el nucli cel·lular i era especialment abundant en les neurones de la LMC, però també es va detectar en algunes cèl·lules que envolten el canal endimari de la medul·la espinal (Fig.2 A i 3A). Mitjançant, tècniques d'hibridació "in situ", utilitzant una ribosonda específica de c-jun de pollastre marcada amb digoxigenina, es va comprovar que el mRNA de c-jun també s'expressava a nivell de la LMC i que la seva distribució coincidia amb la que havíem observat amb c-Jun/mAB (Fig.3 B i C).

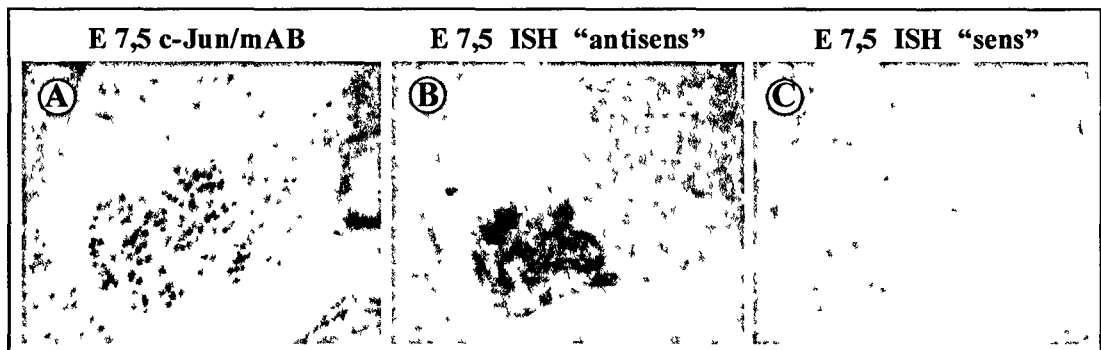


Figura 3. Imatges de la immunoperoxidasa amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB (A) i de la hibridació *in situ* pel mRNA de c-jun (B i C). En seccions de medul·la espinal a E7,5, tant la proteïna c-Jun (A) com el seu mRNA (B) es localitzen a nivell de la LMC. En (C) es mostra el "sens". Barra de calibratge: 200µm (vàlida per A, B i C).

Quan les mostres processades per immunofluorescència es van tenir simultàniament amb l'anticòs c-Jun/mAB i amb iodur de propidi, un marcador fluorescent específic de nuclis, es va poder observar la morfologia i el tamany nuclear, la qual cosa facilitava identificar i distingir les cèl·lules que tenien el nucli picnòtic de les cèl·lules amb nuclis normals. Les cèl·lules c-Jun/mAB positives tenien els nuclis grans i es tenien menys intensament amb iodur de propidi, cosa que ens va fer pensar que les cèl·lules de la LMC immunoreactives per c-Jun/mAB podrien ser motoneurons i no interneurons o cèl·lules gials, les quals tenen els nuclis més petits i es marquen molt intensament amb iodur de propidi. A més, vam comprovar que la gran majoria de nuclis c-Jun/mAB positius no tenien morfologia picnòtica (Fig.4 B). Així doncs, la immunoreactivitat de c-Jun/mAB només es detecta en cèl·lules que són aparentment normals o que, almenys, no presenten una morfologia nuclear alterada. També vam observar que els nuclis que es marcaven amb c-Jun/mAB no ho feien tots amb la mateixa intensitat i es podien observar a la LCM diferents nivells o intensitats de marcatge nuclear (Fig.4 A).

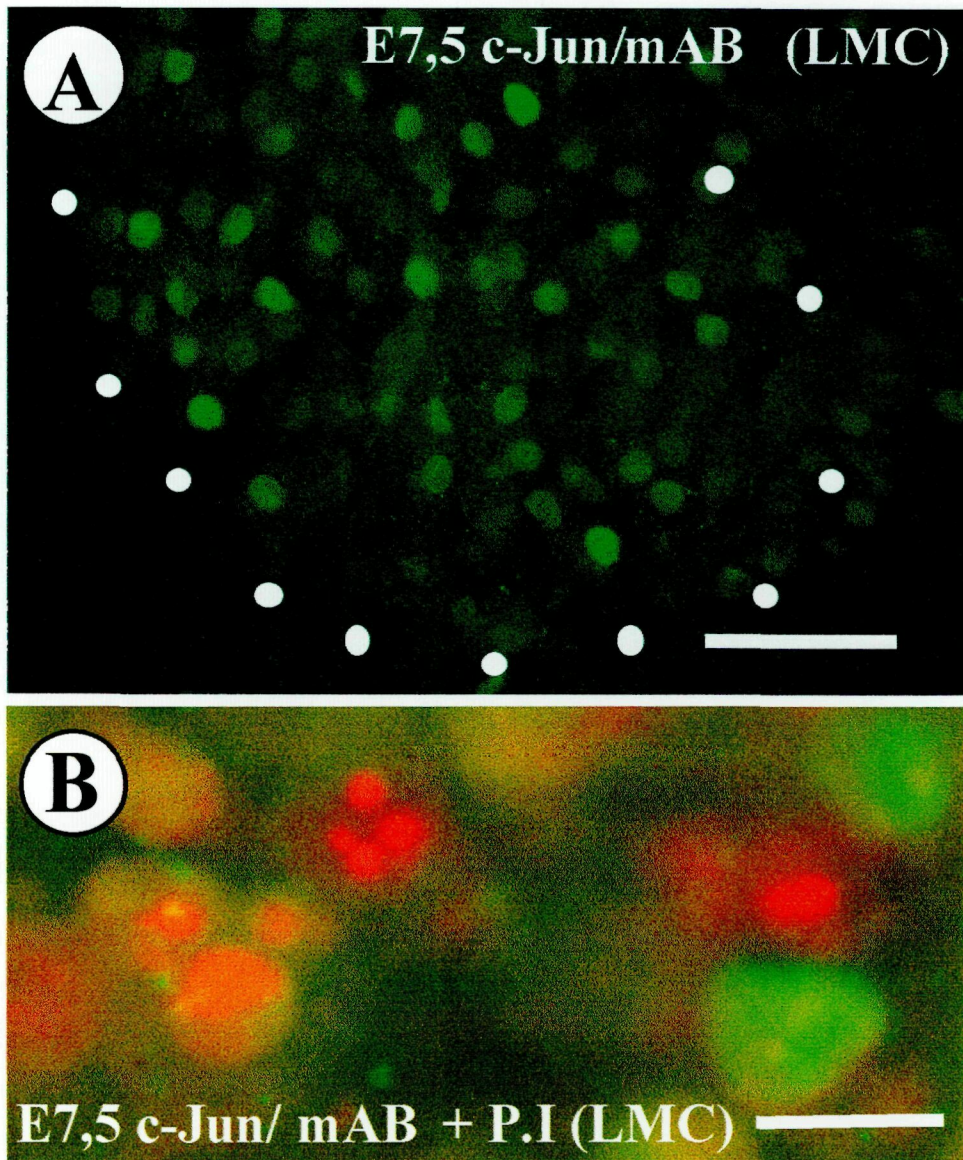


Figura 4. Imatges de la immunofluorescència en seccions de criostat de medul·la espinal d'embrió de pollastre a E7,5 amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB. **(A)** L'anticòs c-Jun/mAB mostra una immunoreactivitat nuclear específica de les MNs en la LMC, on s'observen diferents nivells en la intensitat del marcatge per c-Jun. **(B)** Detall de la LMC, la immunofluorescència amb c-Jun/mAB s'ha combinat amb iodur de propidi (PI) (vermell) per observar la morfologia del nucli. Cal destacar que no totes les cèl·lules picnòtiques mostren el marcatge de c-Jun (taronga) i la majoria de cèl·lules c-Jun/mAB positives corresponen a MNs amb nuclis normals (verd). Altres cèl·lules picnòtiques no presenten immunoreactivitat positiva per c-Jun/mAB (vermell). Barra de calibratge: 50 μ m(A) i 10 μ m (B).

2.2.- Canvis en els nivells de c-Jun durant el període de la PCD.

El fet que no detectéssim c-Jun en cèl·lules amb morfologia picnòtica suggereix que, probablement, c-Jun no és present durant la fase d'execució de la mort apoptòtica, almenys en el nostre model.

Per altra banda, hi ha diversos estudis realitzats "in vitro" que proposen que c-Jun podria estar relacionat amb la fase inductora de l'apoptosi (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Watson et al., 1998; Xia et al., 1995). Al observar diferents nivells d'intensitat en el marcatge de c-Jun es va interpretar que una major intensitat de marcatge podria significar un estat funcional de c-Jun diferent i que podria estar relacionat amb les fases inicials de l'apoptosi. Per aquest motiu es va realitzar un estudi destinat a analitzar els nivells de c-Jun, a nivell de proteïna, per western blot i per immunohistoquímica a diferents edats del desenvolupament, incloent-hi el període de la PCD.

2.2.1.- Anàlisi de Western blot.

L'anàlisi per Western-Blot amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB d'extractes de la fracció nuclear de medul·la espinal lumbar de diferents dies embrionaris mostrava que els nivells de c-Jun eren molt similars entre E5 i E7,5. Aquests nivells de c-Jun decreixen a partir d'E10, és a dir, quan ha finalitzat el període de mort cel·lular programada (Fig.5).

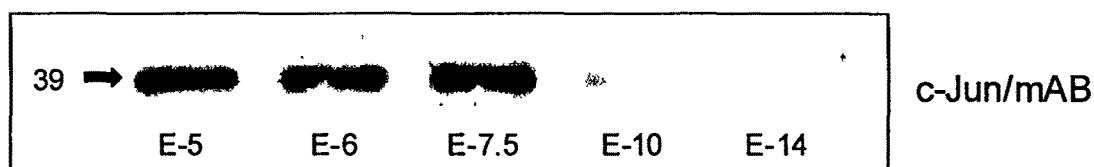


Figura 5. Western Blot d'extractes totals de medul·la espinal d'embrió de pollastre amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB a diferents dies embrionaris. Es detecta una banda de 39kD que decreix a partir d'E10.

2.2.2.- Immunohistoquímica.

Degut a què, prèviament, s'ha observat que en la banya ventral de la medul·la espinal existeixen nuclis amb una diferent intensitat de marcatge per c-Jun/mAB (Fig.4), es va realitzar una anàlisi de les variacions d'aquesta intensitat d'immunomarcatge nuclear de c-Jun en diferents etapes del desenvolupament.

Es va processar 1 de cada 10 seccions de la regió lumbar amb la tècnica de la immunoperoxidasa per tal d'obtenir seccions de tots els segments d'aquesta regió de la medul·la espinal. Totes les mostres van ser processades alhora i la immunohistoquímica es va portar a terme en totes les seccions en idèntiques condicions.

Posteriorment, es va quantificar, amb el programa d'anàlisi d'imatges Visilog 5, la intensitat del marcatge nuclear per c-Jun nuclear mesurant els nivell de grisos de cadascun dels nuclis marcats de la LMC. Aquesta mesura ens va donar un valor numèric per a cada nucli, atenent el seu nivell de grisos. Aquesta mesura és comparable a la densitat òptica (D.O.). Per tant, aquesta mesura és un paràmetre que ens indica la proporció de c-Jun en cadascun dels nuclis. Aquest tipus d'anàlisi ens va permetre observar que els nuclis tenien diferents intensitats d'immunomarcatge, que anaven des de 77 fins a 170, valors que corresponen a diferents nivells de grisos (Fig.6). Cal tenir en compte que el valor zero correspon al negre (màxima immunoreactivitat) i el valor 255 correspon al blanc (immunoreactivitat nul·la). Degut a què tots els nuclis marcats presentaven valors, en quant al nivell de grisos, entre 77 i 170 van ser considerades les mesures com a vàlides, ja que no es detectaven nuclis pròxims a la saturació (valor zero), ni nuclis que es poguessin confondre amb el fons, que té un valor entre 200 i 250. Per tal de facilitar la interpretació d'aquestes mesures vam establir dos poblacions, una de nuclis més clars que es correspon amb les cèl·lules amb un immunomarcatge nuclear de 115 o valors superiors, i un altra de nuclis més foscos que es correspon amb les cèl·lules amb un immunomarcatge nuclear inferior a 115, és a dir, nuclis amb una intensa immunoreactivitat per c-Jun /mAB que seria superior als nivells basals i que es podria produir degut a una activació funcional diferent de c-Jun (Fig.6).

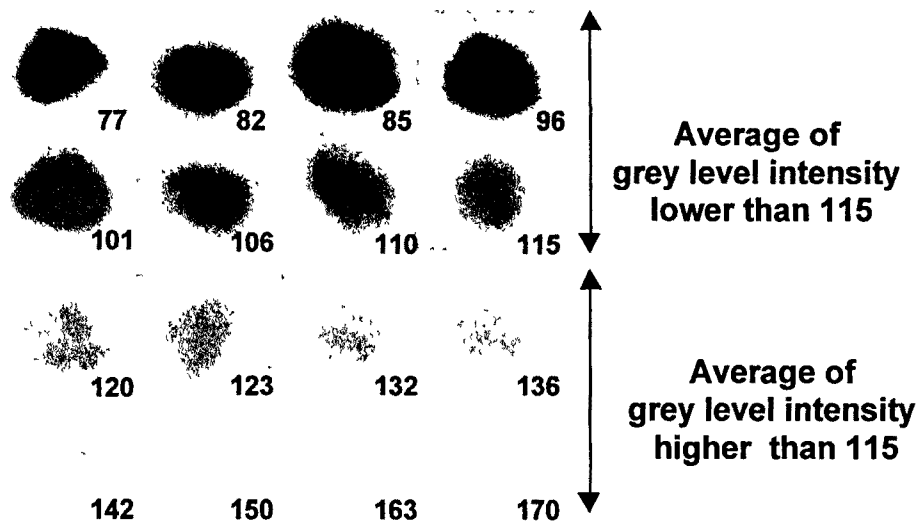


Figura 6. Nuclis amb diferents nivells d'intensitat de marcatge per c-Jun/mAB. S'ha mesurat el valor numèric de cada nucli que correspon al nivell de grisos detectat per l'anticòs c-Jun/mAB. Les mesures s'han realitzat amb el programa d'anàlisi d'imatges Visilog 5. Els nuclis amb valors superiors a 115 els considerem nuclis amb nivells basals de c-Jun. Els nuclis amb valors inferiors a 115 els considerem nuclis amb una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB (= nivells de c-Jun superiors als basals).

Per tal d'emprar un criteri uniforme en la quantificació dels canvis d'intensitat de la immunoreactivitat, vam establir un ratio que ens indiqués el nombre de nuclis que tenien una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB (és a dir, amb valors inferiors a 115 quan es mesura el nivell de grisos) respecte al nombre total de cèl·lules amb el nucli marcat. Aquest ratio ens va permetre detectar canvis importants sobre el percentatge de cèl·lules en què c-Jun està més activat (nuclis més foscos o nivells de grisos inferior a 115). A més, aquest va ser l'únic paràmetre que ens va permetre veure canvis significatius, ja que la població de motoneurons c-Jun positius es manté constant fins a E10. Per tant, es va mesurar el percentatge del nombre de cèl·lules totals de la LMC que presenten una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB (valors inferiors a 115). Aquest ratio el significarem com a c-Jun* en cada una de les diferents situacions i edats estudiades.

Els estudis realitzats durant el desenvolupament, entre E5 i E10, indiquen que l'activació de c-Jun* en les MNs lumbar segueix un perfil de la corba amb dos pics màxims. Un a E6, abans del pic de mort, i l'altre a E8, després del pic de mort,

coincidint amb la disminució del nombre de cèl·lules picnòtiques. A més, s'ha detectat una forta davallada de c-Jun* a E7,5 coincidint amb el pic màxim de cèl·lules picnòtiques que té lloc durant la PCD (Fig.7)

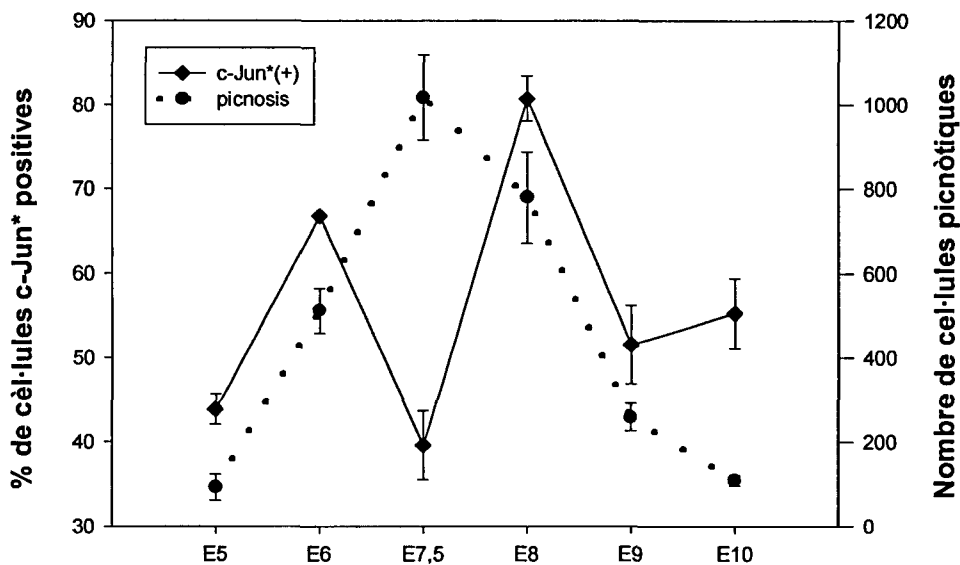


Figura 7. Canvis en el nombre de cèl·lules picnòtiques i percentatge de cèl·lules amb una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB (= percentatge de cèl·lules c-Jun* positives, valor del nivell de grisos inferior a 115) de la LMC lumbar de medul·la espinal d'embrions de pollastre de diferents dies embrionaris durant el desenvolupament. S'observen dos pics de cèl·lules c-Jun* positives: el primer pic a E6 i el segon pic a E8. El pic de cèl·lules picnòtiques té lloc normalment a E7,5. Cal destacar que el primer pic de c-Jun* a E6 és anterior al pic de cèl·lules picnòtiques i que el segon pic de c-Jun* a E8 és posterior al pic de cèl·lules picnòtiques. Cada punt representa la mitjana ± SEM de 4 embrions.

2.3.- Expressió de c-Jun en la PCD induïda per β -Bgtx.

La β -Bgtx és una neurotoxina que s'extreu del verí de la serp *Bungarus multicinctus*. Aquesta toxina actua a nivell presinàptic de la unió neuromuscular bloquejant l'alliberament del neurotransmissor acetilcolina, la qual cosa acaba provocant la mort per una fallida respiratòria com a conseqüència del bloqueig de la sinapsi neuromuscular (Lee i Chang, 1966; Chang et al., 1973). La PCD a nivell de la

LMC i el DGR es pot induir de forma massiva mitjançant la injecció intramuscular de β -Bgtx en una de les extremitats inferiors de l'embrió de pollastre. La β -Bgtx provoca efectes similars tant al costat ipsilateral com al costat contralateral, ja que s'ha comprovat que dosis molt baixes són suficients per afectar dràsticament altres àrees situades fora de la regió injectada. Aixó és degut a un transport de molècules de β -Bgtx a través de la sang. S'ha descrit que aquesta neurotoxina provoca una mort massiva de les motoneurons i cèl·lules ganglionars (Pittman et al., 1978; Ciutat et al., 1996).

Els mecanismes d'acció de la β -Bgtx que provoquen la PCD neuronal encara es desconeixen. El que hem pogut observar és que a nivell ultraestructural, 24h després de la injecció de β -Bgtx a E7, les MNs afectades tenen les característiques morfològiques pròpies de la mort apoptòtica com són: la reducció del volum cel·lular, la condensació de la cromatina amb la preservació inicial de la integritat dels orgànuls citoplasmàtics i una posterior fragmentació que comporta la formació de cossos apoptòtics. També s'ha observat la coexistència simultània de MNs en diferents fases de l'apoptosi, i en una mateixa secció vam trobar des de MNs en estadis molt inicials de condensació de la cromatina fins a restes de MNs formant cossos apoptòtics que estaven envoltats per macròfags (Fig.8 B-E). Això ens indicava que en aquest model les motoneurons morien de forma apoptòtica.

Es va utilitzar aquest model per provocar una mort massiva de motoneurons amb el propòsit d'estudiar els canvis de l'expressió de c-Jun relacionats amb la PCD induïda experimentalment.

Primer, es van estudiar els efectes que provocava la β -Bgtx sobre les MNs espinals lumbars després de l'administració d'1 μ l de β -Bgtx (100 ng) a E7 mitjançant una injecció intramuscular.

El recompte del nombre de cèl·lules picnòtiques i el de c-Jun* positives en la LMC es va fer en diferents temps després de la injecció de β -Bgtx (3h, 6h, 12h, 24h, i 36h). La quantificació de les cèl·lules picnòtiques i les c-Jun* positives es va realitzar aplicant la metodologia descrita en l'apartat de *Resultats 2.2.2*. Així, vam observar que la mort de les MNs induïda per β -Bgtx té lloc entre les 12-36h després

del tractament, essent a les 24h quan el nombre de cèl·lules picnòtiques és màxim (veure Figura 9).

En l'estudi immunohistoquímic es va observar un primer pic del percentatge de cèl·lules c-Jun* positives a les 12h i un segon pic a les 36h. En canvi, a les 24h, moment en que fou detectat el pic màxim de cèl·lules picnòtiques, aquest percentatge era molt baix. Això ens indica que c-Jun s'activa tant unes hores abans (a les 12h) com unes hores després (a les 36h) del moment en què es detecta el pic de cèl·lules picnòtiques (a les 24h). Aquests resultats presenten un perfil molt similar al que s'observà durant el desenvolupament, ja que el percentatge de cèl·lules c-Jun* positives segueix un corba amb dos pics i amb una davallada entre els dos pics. Un primer pic de c-Jun* es produeix abans de la mort, la davallada en el moment que hi ha més mort i un segon pic després del pic de mort. Això ens indica que el patró d'activació de c-Jun és similar en els dos models estudiats, però en el model de la mort induïda per β -Bgtx es produeix en un període de temps més curt (Figura 9, comparar amb Figura 7).

Per tal d'estudiar si l'increment de c-Jun estava associat a una inducció de la seva transcripció i la seva síntesi de "novo" vam aplicar tècniques d'hibridacions "in situ" amb una ribosonda específica per a c-jun de pollastre. Això va permetre detectar un increment de l'expressió de c-jun a nivell de la LMC a les 12 i les 36 hores després de la injecció de β -Bgtx (Fig.10 D i H) i una forta davallada de la seva expressió a les 24h (Fig.10 F). Així doncs, vam poder comprovar que l'increment dels nivells d'mRNA de c-jun coincidia amb el dels nivells de la proteïna detectats per immunohistoquímica tant en els embrions tractats com en els salins.

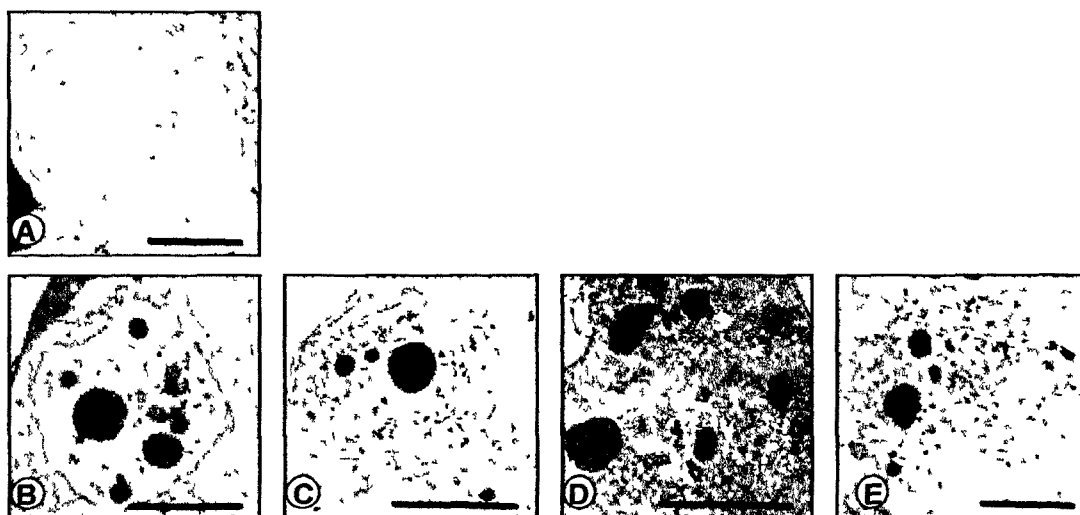


Figura 8. Imatges de microscòpia electrònica de MNs d'embrions E8, 24h després del tractament amb β -Bgtx on es mostra una seqüència progressiva dels canvis morfològics de l'apoptosi Motoneurons sanes (A) i MNs en diferents fases de l'apoptosi (B-E). Barres de calibratge: 3,6 μ m (A i C); 2,9 μ m (B, D) i 2,3 μ m (E).

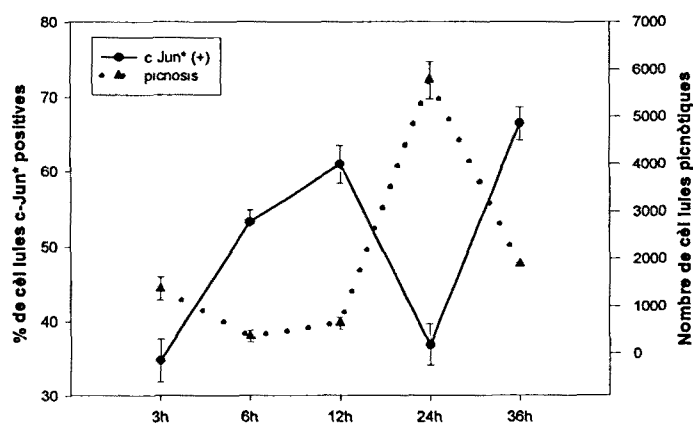


Figura 9. Canvis en el nombre de cèl·lules picnòtiques i percentatge de cèl·lules amb una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB (= percentatge de cèl·lules c-Jun* positives) de la LMC lumbar de medul·la espinal d'embrions de pollastre després de la injecció de β -Bgtx a E7. La β -Bgtx induïx una mort massiva de les motoneurons de manera transitòria amb la qual s'obté un pic de cèl·lules picnòtiques a les 24h després de la injecció. S'observen dos pics de cèl·lules c-Jun* positives, un a les 12h (anterior al pic de cèl·lules picnòtiques) i l'altre a les 36h (posterior al pic de cèl·lules picnòtiques). Cada punt representa la mitjana \pm SEM de 4 embrions.

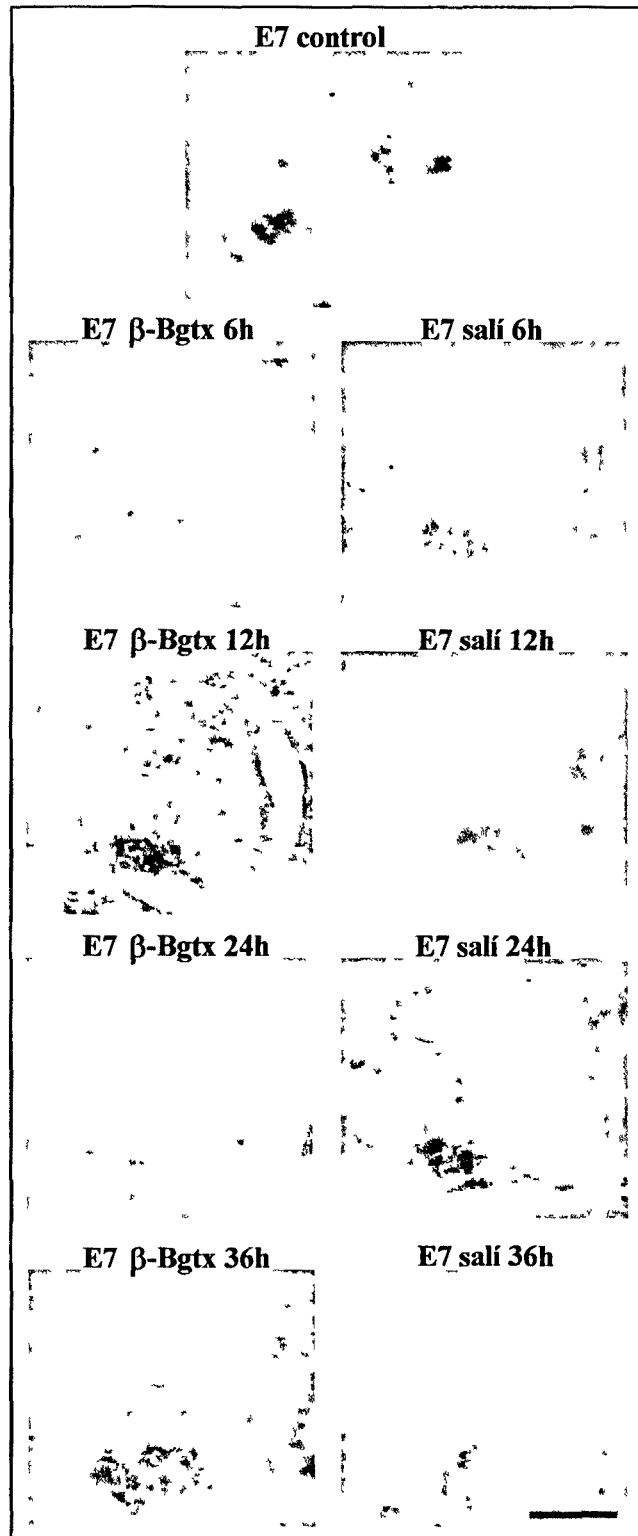


Figura 10. Imatges de la hibridació *in situ* del mRNA de c-jun en seccions de medul·la espinal lumbar a les 6, 12, 24 i 36h després de la injecció de β-Bgtx (B-E) i salí (A-I) a embrions E7, on es mostra

que c-jun s'expressa majoritàriament a nivell de la LMC. En els embrions tractats amb β -bgtx s'observa un increment de l'expressió de c-jun a les 12 (C) i les 36h (E), coincidint amb l'increment dels nivells de la proteïna. En els embrions salins, el perfil d'expressió de c-jun també coincideix amb el de la proteïna ja que l'increment s'observa a E7(A) i E8 (H), mentre que a E7,5 (G) hi ha una clara davallada. Barra de calibratge: 500 μ m (vàlida per A-I)

2.4.- Canvis en la localització i en els nivells de la JNK1 en la mort induïda per β -bgtx.

Un altre dels factors que modulen l'activitat funcional de c-Jun és la seva fosforilació a les serines 63 i 73 situades en el domini amino terminal de c-Jun, la qual es mitjançada per la família de les JNKs. Diversos estudis realitzats en diferents models de mort apoptòtica, induïda experimentalment, indiquen que l'increment dels nivells de c-Jun nuclear està relacionat amb l'activació d'aquestes cinases (Xia et al., 1995; Kawaski et al., 1997; Schwarzschild et al., 1997; Eilers et al., 1998). A més, s'ha observat que en embrions de pollastre, l'administració in "ovo" d'un inhibidor de la via JNK1 (CEP-1347/KT7515) promou la supervivència del 40% de motoneurons destinades a morir durant el període de la PCD (Glicksmann et al., 1998). Per tal d'elucidar si la inducció de c-Jun després de l'administració de β -Bgtx està regulada a través de la via de les JNKs es va fer un estudi immunohistoquímic amb anticossos policlonals dirigits contra la JNK1 en embrions tractats i salins. En aquest estudi va resultar que a E7 els embrions control presenten un marcatge molt dèbil amb un patró puntejat a nivell de la LMC (Fig.11 A). A partir de les 6h de la injecció de β -Bgtx, vam detectar un increment significatiu d'aquest marcatge en el citoplasma de les motoneurons (Fig.11 B), mentre que a les 12h del tractament s'observava un marcatge molt intens que estava concentrat exclusivament en el nucli de les motoneurons (Fig.11 C). A partir de les 24 hores ja no es va detectar cap marcatge específic. Aquest estudi posa de manifest que podria haver-hi una translocació de la JNK1 del citoplasma al nucli, 12h després de la injecció de β -Bgtx, fet que coincidiria amb el moment en què es produeix el primer pic de c-Jun*; en canvi no es va observar marcatge per la JNK1 en el segon pic de c-Jun* corresponent a les 36h. (veure Figura 9).