

**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

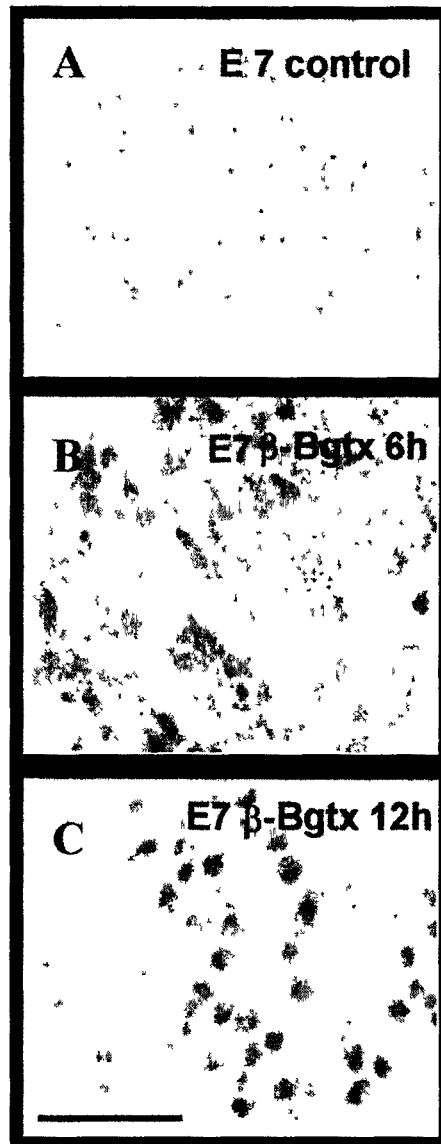


Figura 11. Imatges de la immunohistoquímica per la JNK1 en embrions tractats amb β -Bgtx a E7. Es mostra la LMC on es pot observar un marcatge puntejat a E7 (A), citoplasmàtic a les 6h (B) i nuclear a les 12h (C) després de la injecció intramuscular de 100 ng de β -Bgtx en una de les extremitats inferiors. Barra de calibratge: 200 μ m (vàlida per A-C)

2.5.- Paper de c-Jun en la PCD de les motoneurons induïda per l'ablació perifèrica de les dianes.

Degut a què c-Jun semblava estar relacionat amb la fase d'inducció de la PCD es va realitzar un estudi de la seva expressió en el model de mort de les motoneurons induïda per l'eliminació de l'esbós de l'extremitat (LBR) a E2,5. L'ablació en aquesta etapa inicial del desenvolupament impedeix que les MNs lumbar contactin amb les seves dianes de manera que més d'un 90% de les MNs moren en el mateix període de desenvolupament en què té lloc la mort neuronal fisiològica (Oppenheim et al., 1978). La pèrdua de MNs privades de la seva diana va associada amb un increment en el nombre de cossos apoptòtics i aquest tipus de mort s'accepta com a model vàlid de mort cel·lular programada.

En tots els embrions E2,5 en què es va practicar l'LBR unilateral en el costat dret, es comprovà que les motoneurons espinals lumbar es desenvolupaven normalment fins l'inici del període de la PCD. Entre E6-E9 tenia lloc la mort massiva de les MNs privades de la seva diana en el costat operat (dret=ipsilateral).

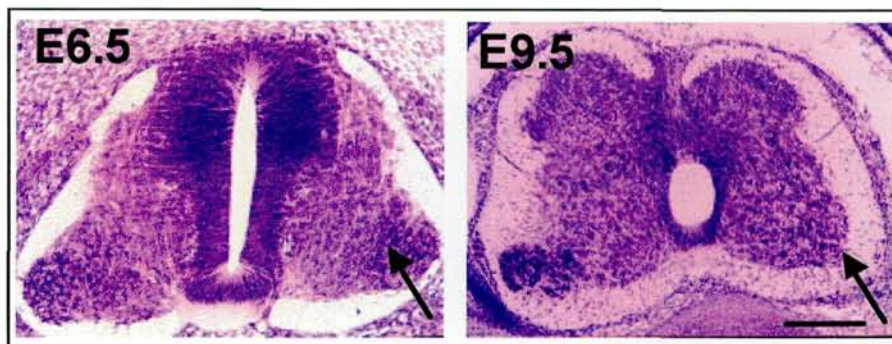


Figura 12. Imatges de medul·la espinal lumbar d'un embrió E6,5 (A) i d'un embrió E9,5 (B) després de practicar l'LBR a E2,5. Ressalta la marcada pèrdua de MNs en la LMC en el costat operat dels embrió E9,5 (B) quan es compara amb el dels embrió E6,5 (A) (veure fletxes en A i B). Barra de calibratge (vàlida per A i B): 200 μ m.

En aquest model, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica amb l'anticòs c-Jun/mAB, es va observar un marcatge de c-Jun en el nucli de les motoneurones i en algunes seccions de determinades regions de la medul·la en què també apareixien algunes cèl·lules marcades al voltant del canal endimari. Aquestes observacions eren idèntiques a les que ja s'havien detectat, tant en els embrions control com en els tractats amb β -Bgtx.

La quantificació del percentatge de cèl·lules amb una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB es va realitzar seguint el mètode descrit anteriorment (apartat de *Resultats 2.2.2.*). Les nostres dades indiquen que el percentatge de cèl·lules c-Jun* positives a nivell de la LMC d'embrions de pollastre a E6,5 i a E7,5, que van ser operats a E2,5, estava incrementat en el costat operat (ipsilateral) respecte al costat control (contralateral). A E6,5, aquest percentatge de cèl·lules c-Jun* positives és significativament superior al detectat a E7,5, tant en el costat control com en el costat operat (Fig.13 i 14).

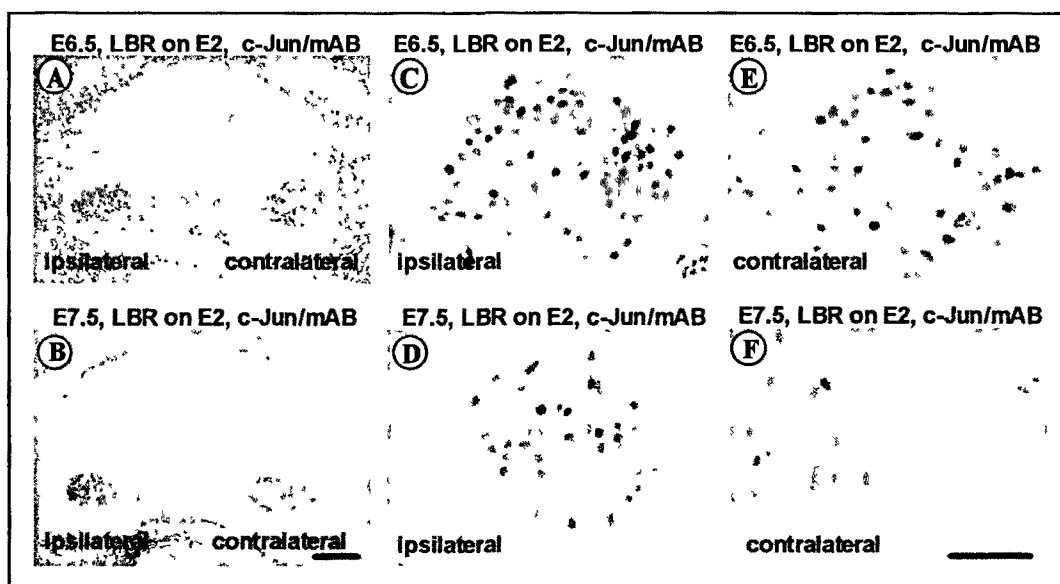


Figura 13. Imatges de la immunohistoquímica amb l'anticòs c-Jun/mAB de medul·la espinal lumbar d'embrions E6,5 (A) i E7,5 (B) als quals s'els hi ha practicat l'LBR a E2,5. S'observa un increment dels nivells de c-Jun en el costat ipsilateral (C i D) respecte el costat contralateral (E i F). Cal destacar que l'increment de c-Jun és superior a E6,5 (C i E) respecte a E7,5 (D i F) tant en el costat ipsilateral com en el contralateral. Barres de calibratge: 250 μ m en (A i B); 100 μ m (vàlida per C, D, E, F).

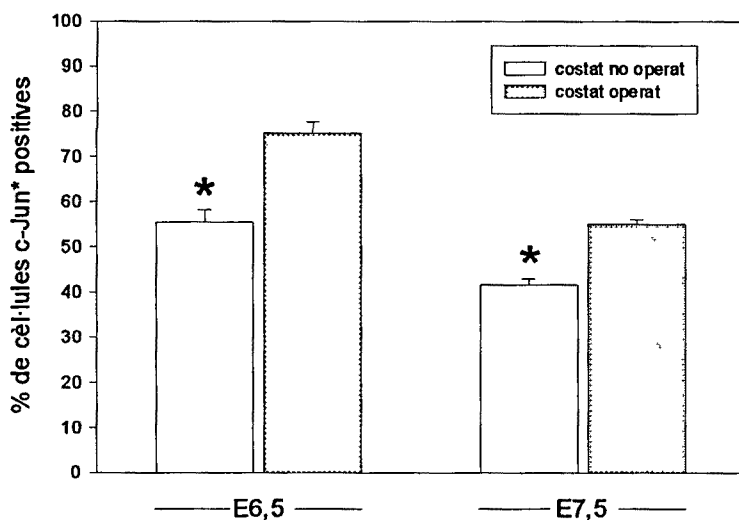


Figura 14 Percentatge de cèl·lules c-Jun* positives (= percentatge de cèl·lules amb una intensa immunoreactivitat per a c-Jun/mAB) de la LMC lumbar en embrions E6,5 o E7,5 en els que s'ha practicat l'LBR a E2,5. La grandària de la mostra és de 4 embrions per cada condició. Test t d'Student $p^* < 0,05$.

Per tal de comprovar si aquest increment dels nivells de c-Jun* està regulat per l'activació de la JNK1, es va realitzar la immunohistoquímica amb anticossos policlonals contra la JNK1 a E6,5, la qual cosa, va permetre observar un increment del marcatge a nivell nuclear de les motoneurons en el costat operat mentre que en el costat control el marcatge era molt dèbil (Fig. 15).

Paral·lelament, es va utilitzar l'anticòs policlonal comercial anti-c-Jun-P-ser63 específic contra c-Jun fosforilat a la serina 63, per tal de comprovar si aquest increment de c-Jun estava associat a la seva fosforilació. Això va permetre constatar que hi havia un increment de marcatge de c-Jun-P-ser63 en el nucli de les motoneurons del costat operat, però en canvi aquest increment no va ser detectat en el costat control. Aquests resultats suggereixen que l'increment de c-Jun associat a la fosforilació de la serina-63 també coincideix amb un increment de la concentració de JNK1 nuclear abans de produir-se el procés de mort cel·lular apoptòtica.

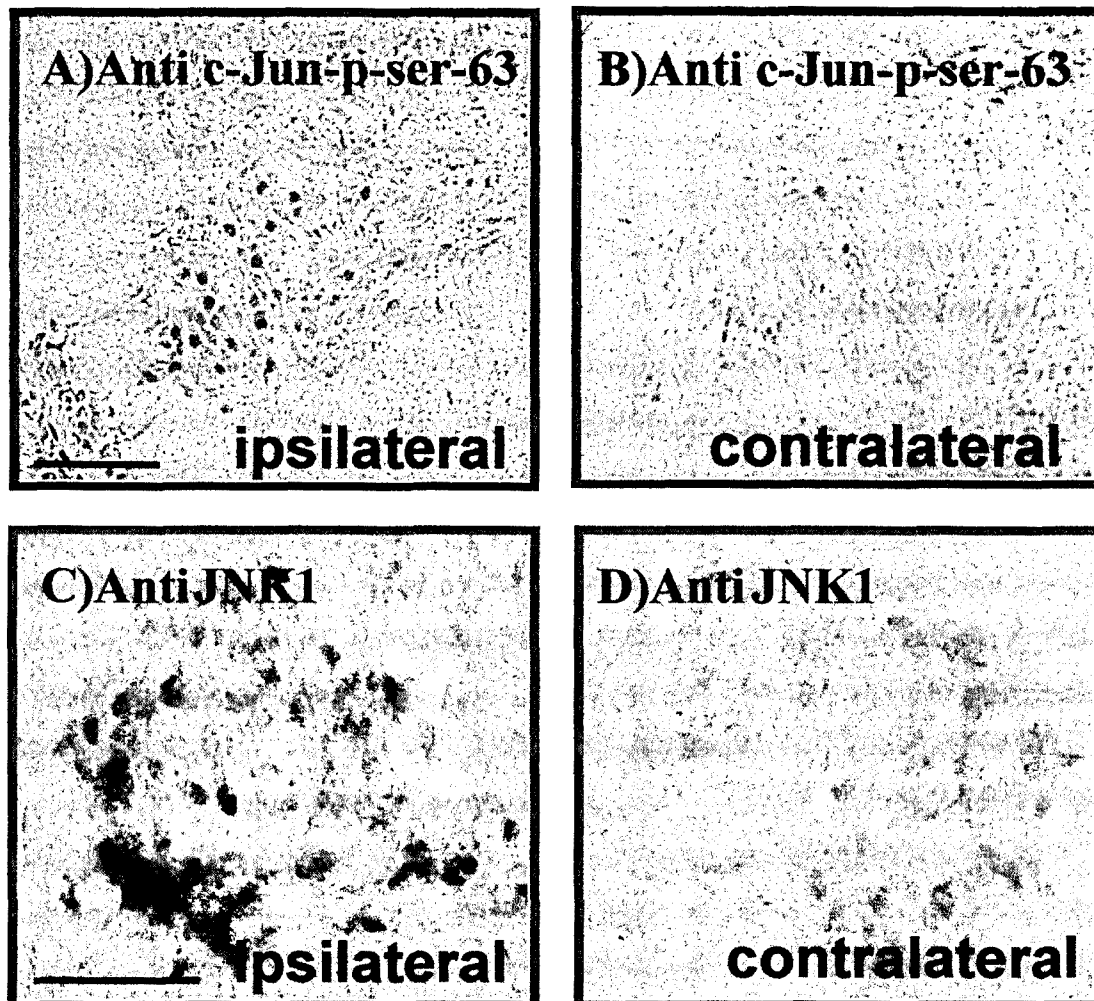


Figura 15. Imatges de la immunohistoquímica per la JNK1 (C i D) i c-Jun-P-ser63 en la LMC d'embrions E6,5 després de practicar l'LBR a E2,5. (A) Nuclis de MNs marcats amb c-Jun-P-ser63 (A) i JNK1 (C) en el costat ipsilateral. Cal destacar que no hi ha marcatge nuclear per c-Jun-P-ser 63 (B) ni per JNK1 (D) en el costat contralateral. Barres de calibratge: 100 μ m (vàlida per A i B); 50 μ m (vàlida per C i D).

2.6.- Estudi de la immunoreactivitat de c-Jun durant el tractament crònic amb NMDA.

Recentment, s'ha descrit en el nostre laboratori que els receptors de glutamat poden promoure tant la inducció de la mort excitotòxica com la supervivència de les MNs durant la fase de PCD del desenvolupament de la medul·la espinal de l'embrió de pollastre; l'estimulació farmacològica precoç i sostinguda dels receptors NMDA (tractament crònic) durant el període de mort natural de les MNs espinals lumbar té efectes protectors de supervivència sobre les MNs i evita la PCD que té lloc durant el desenvolupament normal. Aquest tractament crònic consisteix en l'administració "in ovo" de 0,5 mg d'NMDA a E5 i E6 i de 0,25 mg d'NMDA d'E7 a E10 que permet el rescat d'un nombre significatiu de MNs. Per altra banda, quan es tracten els embrions amb una dosi aguda a E7 o a E10 s'observa una pèrdua severa de MNs a les 12 h d'aplicar el tractament. En canvi, si prèviament es fa un tractament crònic amb NMDA, les MNs adquireixen una tolerància a l'excitotoxicitat mitjançada per l'NMDA (Lladó et al., 1999).

La utilització d'aquest model en què l'NMDA promou la supervivència de les MNs lumbar durant el període de la PCD ha permès estudiar la seva relació amb l'expressió de c-Jun. Després del tractament crònic amb NMDA vam quantificar el percentatge de motoneurons c-Jun* positives a nivell de la LMC en embrions E6, E7,5 i E8. En aquest estudi es va poder comprovar que els nivells de c-Jun* a E6 eren significativament inferiors als embrions tractats respecte als salins o als E6 no tractats. Cal tenir en compte que durant el desenvolupament, a E6, un dia abans del pic de mort, nosaltres havíem detectat el primer pic de c-Jun*. Per tant, sembla ser que el tractament crònic amb NMDA produeix una regulació a la baixa de l'expressió de c-Jun en les MNs i evita l'aparició del primer pic de c-Jun* a E6. Per altra banda, el tractament crònic amb NMDA no afecta al segon pic de c-Jun* que té lloc durant el desenvolupament a E8, ja que els nivells de c-Jun* són similars tant als embrions tractats com als controls (Fig.16).

Quan vam utilitzar els anticossos anti-JNK-1 i anti-c-Jun-P-ser63 a E6, E7,5 o E8 en embrions tractats amb NMDA, no es va detectar immunoreactivitat positiva per a cap dels dos anticossos.

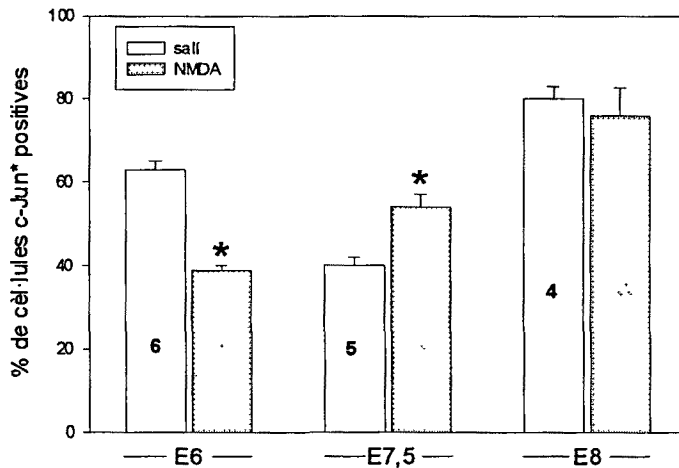


Figura 16. Percentatge de cèl·lules c-Jun* positives (= percentatge de cèl·lules amb una intensa immunoreactivitat per a c-Jun/mAB) de la LMC lumbar en embrions E6, E7,5 i E8 que van rebre el tractament crònic (des d'E5) amb NMDA o en embrions tractats amb salí. Els nombres de dins de les barres indiquen la grandària de la mostra. Test t d'Student *p < 0,05.

2.7.- Estudi de la immunoreactivitat de c-Jun durant el tractament crònic amb muscimol.

Els resultats assolits permetien relacionar el primer pic de c-Jun* amb la inducció de la mort, en canvi, el segon pic podria estar relacionat amb canvis d'activitat elèctrica en les motoneurons ja que diversos estudis indiquen que, en algunes situacions, l'activació de c-Jun podria estar relacionada amb l'activitat. Per tal d'esbrinar si l'expressió de c-Jun estava relacionada amb l'activitat elèctrica, vam utilitzar un model experimental "in vivo" en què inhibíem l'activitat elèctrica de les motoneurons mitjançant muscimol, que és un agonista gabaèrgic. Recentment, s'ha descrit que el muscimol inhibeix indirectament l'activitat neuromuscular durant el desenvolupament de la medul·la espinal de pollastre, sense afectar la PCD de les MNs (Usiak i Landmesser, 1999). Els embrions van ser tractats amb muscimol (0,1mg/dia) des d'E5,5; i posteriorment diverses mostres d'embrions E6, E7,5 i E8 foren analitzades amb tècniques d'immunohistoquímica amb l'anticòs monoclonal c-

Jun/mAB. La seva quantificació es va realitzar seguint el protocol establert anteriorment per a tots els recomptes (veure apartat de *Resultats 2.2.2.*). Amb aquest tipus de tractament es va observar que el percentatge de cèl·lules c-Jun* positives a E6, E7,5 i E8 a nivell de la LMC no presentava variacions significatives i que era molt similar entre E6 i E8 en els embrions tractats amb muscimol (Fig.17). Aquests resultats indicaven que el tractament amb muscimol mantenia constants els nivells de c-Jun i era capaç d'evitar els canvis d'expressió cíclica de c-Jun que es produeixen durant aquest període de desenvolupament, ja que:

- Rebaixa el nivells de c-Jun a E6, moment en què es produeix el primer pic de c-Jun* abans de la mort.
- Incrementa els nivells de c-Jun a E7.5, moment en què es produeix la davallada de c-Jun* i que coincideix amb el pic de mort.
- Rebaixa el nivells de c-Jun a E8, moment en què es produeix el segon pic de c-Jun* després de la mort.

Així doncs, el tractament amb muscimol semblava que impedia les oscil·lacions de c-Jun entre E-6 i E-8 .

Era sorprenent el fet que a E7,5, la immunoreactivitat per a c-Jun/mAB en els embrions tractats amb muscimol es veia incrementada respecte dels embrions tractats amb salí (Fig.17). Aquestes observacions eren una prova indirecta de què el muscimol podia afectar tant a la viabilitat de les motoneurons com a la seva activitat. És per aquest motiu que es va aprofundir en l'estudi dels efectes del muscimol i decidir estudiar si el tractament amb muscimol podia afectar la supervivència de les motoneurons. Després del tractament, i quantificat el nombre de cèl·lules picnòtiques a E7,5 es va observar que, en els embrions tractats, la PCD sí que estava afectada, ja que el nombre de cèl·lules picnòtiques era significativament inferior al dels embrions control (Fig.18). Aquests resultats no coincideixen amb els estudis realitzats per Usiak i Landmesser, (1999) que consideren que el tractament amb muscimol no afecta la PCD. Davant d'aquests resultats contradictoris, ens vam proposar aprofundir en l'estudi d'aquest model per tal de comprovar si el muscimol tenia algun efecte sobre el procés de la PCD en les MNs durant el desenvolupament.

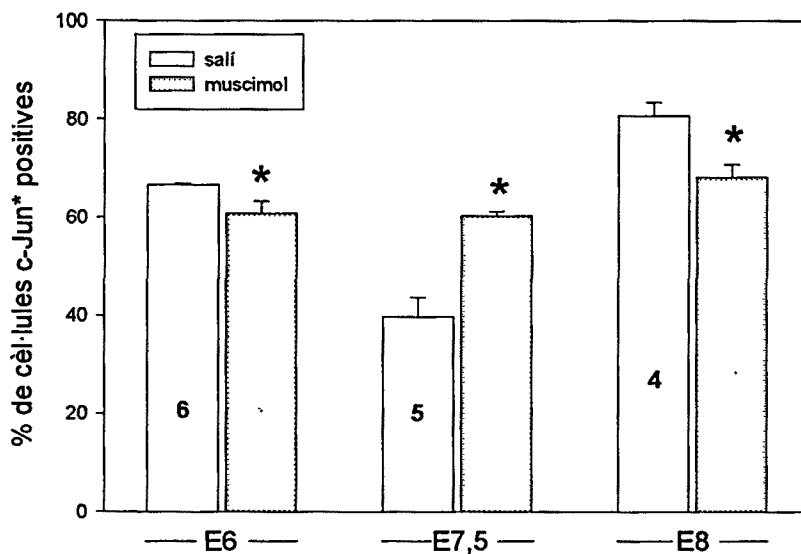


Figura 17. Percentatge de cèl·lules c-Jun* positives (= percentatge de cèl·lules amb una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB) de la LMC lumbar en embrions E6, E7,5 i E8 que van rebre el tractament crònic (des d'E5,5) amb muscimol (amb una dosi diària de 0.1mg) o en embrions tractats amb salí. Els nombres de dins de les barres indiquen la grandària de la mostra. Test t d'Student *p < 0,05.

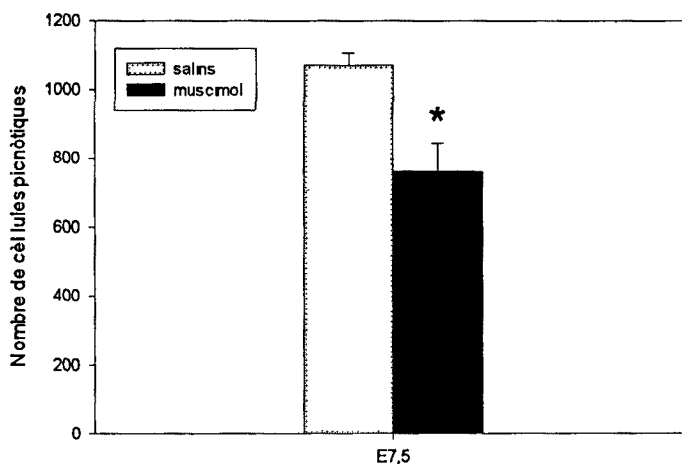


Figura 18. Nombre (mitjana ± SEM) de cèl·lules picnòtiques en la LMC lumbar en embrions E7,5 controls (tractats amb salí) o amb el tractament crònic amb muscimol (d'una dosi diària de 0.1mg). Test t d'Student *p 0,05.

2.8.- El tractament crònic amb muscimol protegeix les MNs de la PCD.

El tractament crònic entre E5,5-E10 amb diferents dosis de muscimol administrades diàriament va permetre observar que, a E10, els embrions que es van tractar amb una dosi de 0,05 mg/dia de muscimol tenien un nombre de motoneurons significativament superior respecte al dels embrions control. Quan les dosis emprades eren de 0,1 mg/dia o 0,2 mg/dia s'obtenia un rescat més nombros de MNs que amb la dosi 0,05 mg/dia. Per tant, com es pot observar en la Figura 19, es demostra que hi ha un efecte del muscimol sobre la regulació de la PCD en les MNs, que és dosi dependent.

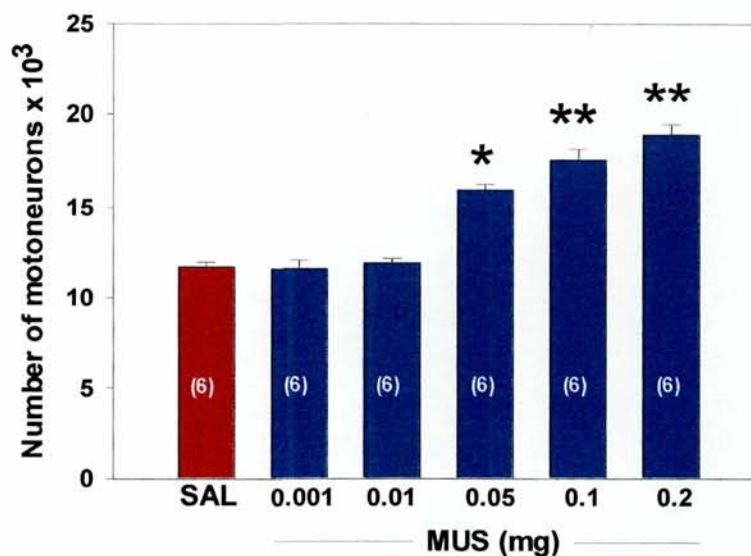


Figura 19. Nombre (mitjana \pm SEM) de MNs lumbar a E10 després del tractament amb diferents dosis de muscimol aplicades diàriament durant el període de mort cel·lular programada. * $p < 0,005$, ** $p < 0,0005$ vs. salins (test t d'Student).

Per tal de comprovar si aquest efecte era degut a l'acció del muscimol sobre els receptors GABA_A i no a un efecte secundari d'aquest, van ser tractats els embrions simultàniament, amb muscimol i bicuculina, que és un antagonista gabaèrgic capaç de revertir l'efecte del muscimol sobre tal receptor. Després de tractar embrions de forma crònica, entre E5,5-E8 amb bicuculina (0,2 mg/dia), més muscimol (0,1 mg/dia), vam poder comprovar que la bicuculina era capaç de revertir els efectes del muscimol sobre la supervivència de les MNs. Per altra banda, no vam observar diferències significatives en el nombre de MNs entre els embrions tractats únicament amb bicuculina i els controls. En canvi, sí que es va observar un increment significatiu en el nombre de MNs dels embrions tractats amb muscimol sol. Això indicava que l'efecte observat era degut a l'efecte del muscimol sobre els receptors GABA_A.

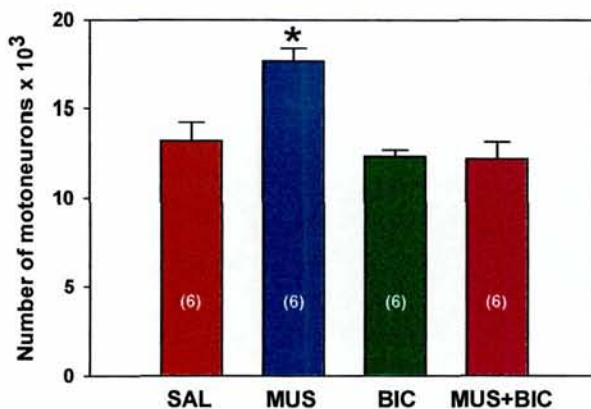


Figura 20. Nombre (mitjana \pm SEM) de motoneurons lumbars a E9 després del tractament amb salí (control), muscimol (MUS, 0,1mg/dia), bicuculina (BIC, 0,2 mg/dia) o muscimol més bicuculina de E5,5 a E8. * $p < 0.001$ vs. (test t d'Student).

2.9.- Perfil de supervivència de les MNs espinals lumbars durant el període de la PCD mitjançada per muscimol.

Per tal de determinar el curs temporal de l'efecte del muscimol sobre la supervivència de les MNs durant el període de la PCD, es va fer un estudi sobre el nombre de MNs totals de la regió lumbar que hi havia entre E5-E12, després de tractar els embrions amb una dosi diària de 0,1 mg de muscimol.

El nombre de MNs era significativament major, a E8 i a E10 en els embrions tractats crònicament, però quan el tractament s'aturava en E10 es podia observar una dràstica disminució del nombre total de MNs. Per altra banda, si el tractament amb muscimol es continuava fins a E12, el nombre de MNs es mantenia més alt que en els controls. Això indica que els efectes del muscimol sobre la supervivència de les MNs desapareix quan es finalitza el tractament, de manera que els embrions tractats, un cop aturat el tractament, arriben a tenir el mateix nombre de MNs que els embrions control.

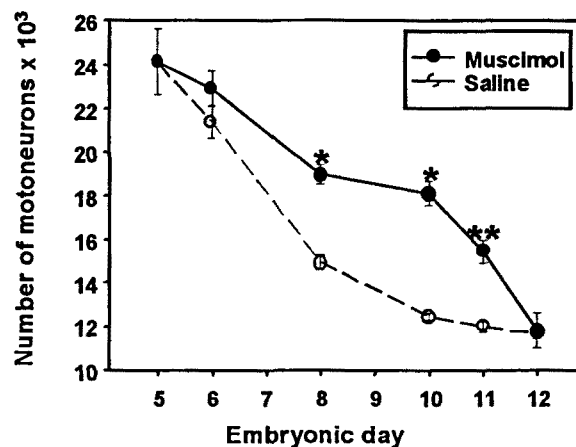


Figura 21. Nombre (mitjana \pm SEM) de motoneurons lumbars de la columna motora lateral de la medulla espinal d'embrions salins (control) o tractats amb muscimol (0,1 mg/dia). El tractament es va realitzar des d'E5,5 a E10. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de 5 a 9 embrions. * $p < 0.0001$ i ** $p < 0.0005$ vs. control (test t d'Student).

2.10.- El rescat de les motoneurons per muscimol podria estar relacionat amb una disminució de la motilitat embrionaria.

En els embrions tractats crònicament entre E5 i E10 amb muscimol fou observada una important atròfia i paràlisi muscular en totes les edats estudiades, ja que el nombre de moviments durant 3 minuts disminuïa dràsticament a les 3 h de l'administració diària de 0,1mg de muscimol. Aquesta disminució de l'activitat motora durava mentre s'aplicava el tractament i en canvi, quan es parava el tractament a E10 la motilitat dels embrions es recuperava molt ràpidament (Fig.22) de forma que a E12 la freqüència de moviments dels embrions que havien rebut el tractament fins a E10 era similar a la dels salins. Quan el tractament s'allargava fins a E12 l'activitat motora també és mantenia inhibida .

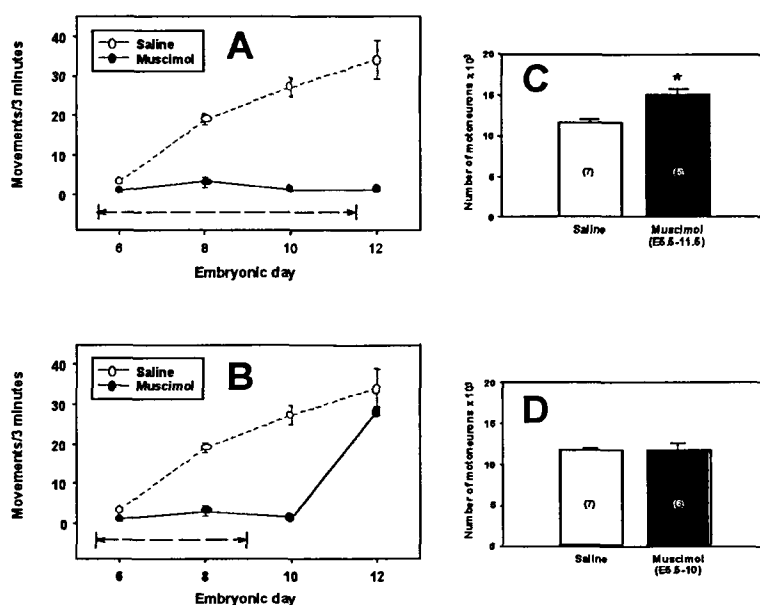


Figura 22. Motilitat observada després del tractament diari amb salí o muscimol (0,1mg/dia) a partir d'E5,5 fins a E11,5 (A i C) o fins a E10 (B i D). Es va comptar el nombre de moviments actius (mitjana ± SEM) en períodes de 3 min de qualsevol part de l'embrió a E5 i E6 i a partir d'E7 només els de la pota (veure Material i Mètodes per detalls). S'observa en (A) i (B) que l'activitat motora està inhibida amb el tractament amb muscimol, però els moviments es recuperen un cop s'ha aturat el tractament a E9. Cada punt representa la mitjana ± SEM de 6 a 19 embrions. Les línies per sota de les gràfiques signifiquen el període de tractament. (C) i (D) representa el nombre de motoneurons (mitjana ± SEM) a E12. Les motoneurons poden sobreviure amb el tractament amb muscimol només si aquest es manté fins a E11,5 (C), en canvi, si s'atura el tractament a E10, el nombre de motoneurons dels embrions tractats amb muscimol a E12 es similar al dels salins. (D). El nombre de dins les barres representa la grandària de la mostra. *p< 0.01 vs salí (test t d'Student).

3.- ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS POLICLONALS c-JUN/SC45.

Com hem vist en l'inici d'aquest treball (apartat 1 de *Resultats*), l'anticòs policlonal c-Jun/sc45 no és específic de c-Jun, ja que reconeix diferents bandes i presenta un patró d'immunoreactivitat citoplasmàtica molt diferent del patró nuclear que s'observa amb l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB (veure Figura 2). És per aquest motiu, que ens vam proposar aprofundir en el seu estudi i en la caracterització dels components cel·lulars que eren detectats amb c-Jun/sc45. Degut a què, inicialment, va fer-se evident una estreta relació, a nivell cel·lular, entre la mort cel·lular i la immunoreactivitat de c-Jun/sc45, ens vam proposar estudiar-ne l'expressió en diferents models de mort neuronal fisiològica i induïda que té lloc durant el desenvolupament de l'embrió de pollastre.

3.1- Immunoreactivitat per c-Jun/sc45 durant el període de PCD en les MNs lumbars de la medul·la espinal i en les cèl·lules del DGR.

Inicialment es va realitzar un estudi d'immunofluorescència, amb l'anticòs policlonal c-Jun/sc45, utilitzant seccions de medul·la espinal d'embrions E7,5. En aquest estadi, té lloc el pic màxim de mort programada en les motoneurons lumbars. En aquesta etapa del desenvolupament, es va detectar, fonamentalment, la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 a nivell de la LMC de la medul·la espinal. Les cèl·lules marcades presentaren una morfologia típicament neuronal i mostraren un patró de marcatge citoplasmàtic molt ben definit per tot el soma en les projeccions dendrítiques i axonals. En canvi, el nucli d'aquestes cèl·lules, generalment estava exclòs de marcatge encara que en algun cas s'hi apreciava un marcatge molt dèbil (Fig.23 A i B, D i G). En general, el marcatge citoplasmàtic era molt intens i homogeni, però en alguns casos apareixien unes partícules marcades més densament distribuïdes pel soma cel·lular o a nivell de les neurites.

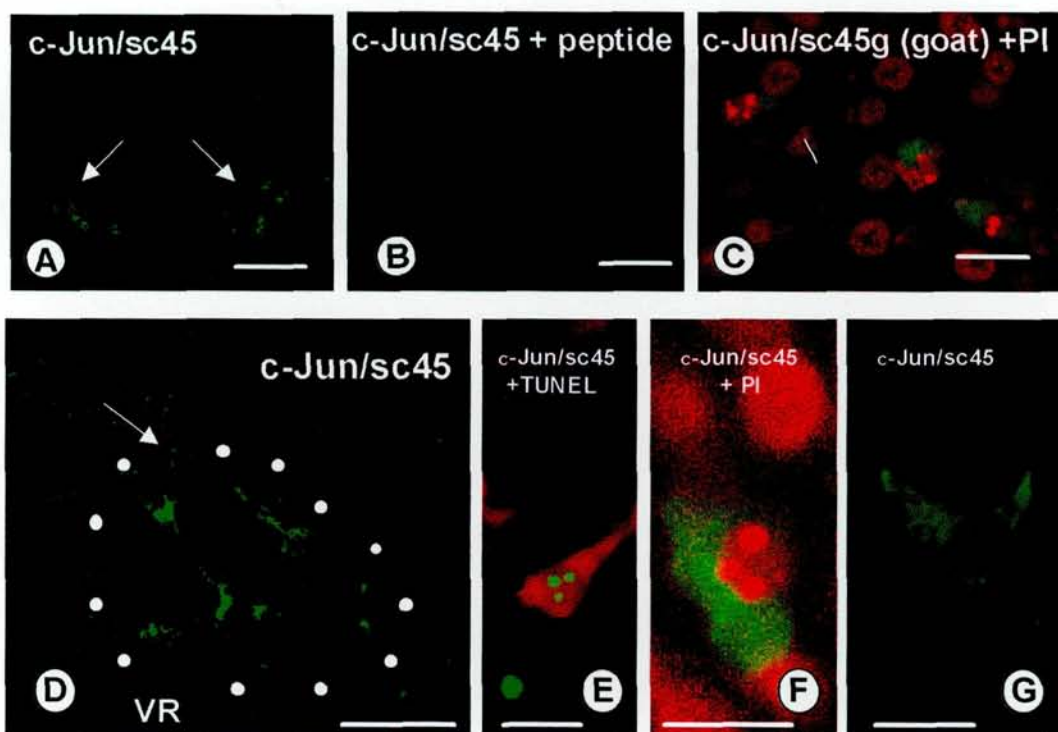


Figura 23. Imatges de microscòpia confocal de la immunofluorescència amb els anticossos c-Jun/sc45 i c-Jun/sc45g en seccions de criostat de medul·la espinal d'embrió de pollastre a E7-E8. La immunofluorescència es detecta amb un anticòs secundari associat a FITC (verd, **(A-D,F,G)**). El immunomarcatge s'ha combinat amb iodur de propidi (PI) (vermell, **(C,F)**) per visualitzar la morfologia de la cromatina o amb la tècnica TUNEL (verd, **(E)**) per detectar el DNA fragmentat i en aquest cas, s'ha utilitzat TRITC (vermell) per detectar la immunoreactivitat per c-Jun/sc45. **(A)** La immunoreactivitat per c-Jun/sc45 és localitzada principalment a nivell de la LMC (veure fletxes A), en canvi, no s'observa marcatge quan incubem el mateix anticòs amb el pèptid immunògen **(B)**. **(C)** La immunoreactivitat amb c-Jun/sc45g (verd) es detecta en el citoplasma de MNs picnòtics (PI,vermell). Aquest anticòs s'ha generat contra el mateix pèptid que c-Jun/sc45. **(D)** Cal destacar que el patró d'immunoreactivitat "Golgi-like" de c-Jun/sc45 s'observa a nivell del soma, axons i dendrites de les MNs (veure fletxa) (VR=ventral nerve root). **(E)** Es mostra una MN c-Jun/sc45 positiva (vermell) amb el DNA fragmentat (TUNEL,verd) i una partícula TUNEL positiva no marcada amb c-Jun/sc45. **(F)** La immunoreactivitat de c-Jun/sc45 (verd) mostra partícules denses en el citoplasma d'una MN picnòtica (PI,vermell). **(G)** La immunoreactivitat de c-Jun/sc45 (verd) respecta les partícules de cromatina condensada de les MNs picnòtiques. **(D)** La columna motora lateral de la banya ventral de la medul·la espinal s'indica rodejada per punts. Barres de calibratge: 10 μm (E-G), 20 μm (C), 100 μm (D), 250 μm (A,B).

En analitzar les mostres, combinant el marcatge amb l'anticòs c-Jun/sc45 i el iodur de propidi, o la tècnica TUNEL, vam observar que la majoria de les neurones marcades amb c-Jun/sc45 tenien una morfologia nuclear picnòtica típica i que els seus nuclis presentaven diferents graus de condensació de la cromatina. Alguns d'aquests nuclis contenien partícules molt petites i denses, mentre que d'altres tenien partícules esfèriques molt més grans. Aquestes partícules nuclears, que corresponen a condensacions de la cromatina, estaven totalment excloses de marcatge. Les cèl·lules marcades amb c-Jun/sc45 tenien nuclis amb la morfologia picnòtica típica de les motoneurones que moren per apoptosi durant aquest període (Chu-Wang i Oppenheim, 1978) (Fig.23 F). Per altra banda, amb la tècnica TUNEL vam comprovar que les cèl·lules marcades amb c-Jun/sc45 també eren TUNEL positives cosa que va indicar que el DNA estava fragmentat (Fig.23 E). També vam poder observar algunes cèl·lules que eren TUNEL positives i que no presentaven marcatge citoplasmàtic per c-Jun/sc45. Concretament, només un $9.14 \pm 0,52\%$ (mitjana \pm error estàndard (SEM), n=8) del total de les partícules TUNEL positives presentaven immunoreactivitat positiva per c-Jun/sc45.

Es va comptar el nombre de neurones c-Jun/sc45 positives a partir de mostres processades amb la tècnica de la immunoperoxidasa en 1 de cada 10 seccions al llarg de tota la regió lumbar per tal de determinar la mitjana del nombre de cèl·lules marcades per nucli motor. Els comptatges es van realitzar a diferents edats, incloent el període de mort cel·lular programada. En paral·lel, es va fer un recompte del nombre de les cèl·lules picnòtiques totals. Els resultats s'han materialitzat en dues gràfiques (Fig.24) que, en ser comparades, posen de manifest que l'increment del nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives es correspon amb un increment del nombre de cèl·lules picnòtiques. El nombre màxim de cèl·lules c-Jun/sc45 positives es va observar a E7,5 i coincidia amb l'etapa del desenvolupament en què hi havia el nombre màxim de cèl·lules picnòtiques. Per altra banda, el nombre de cèl·lules picnòtiques com el de cèl·lules c-Jun/sc45 positives és molt baix, pràcticament insignificant, a E5 i a E10, és a dir, abans o després del període de la PCD (Fig.24).

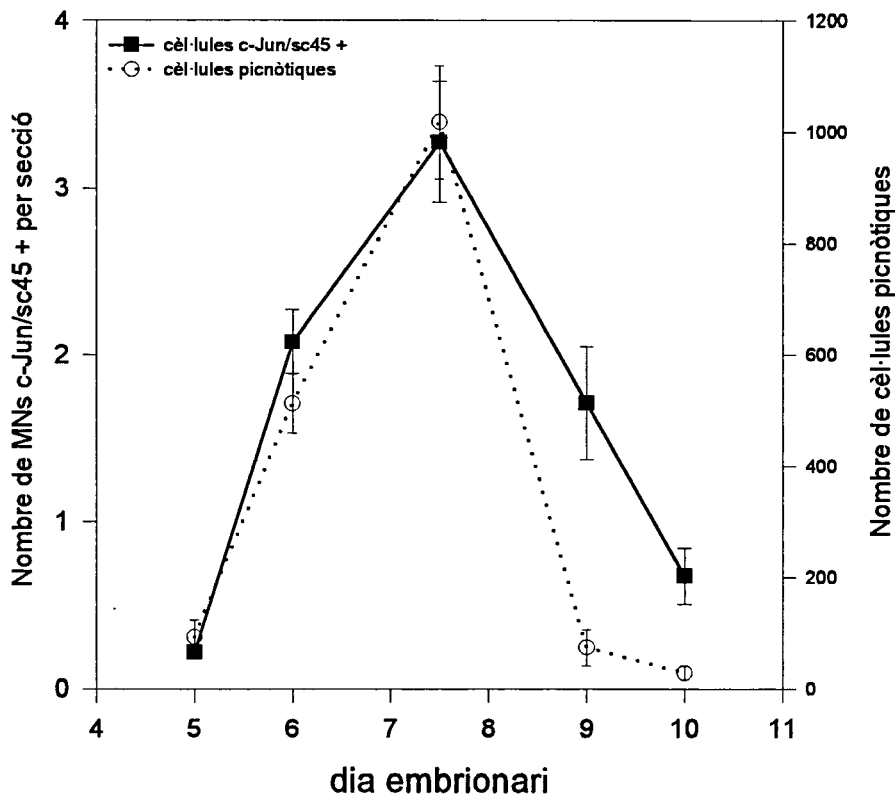


Figura 24. Canvis en el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives per secció i cèl·lules picnòtiques de la LMC lumbar de la medul·la espinal a diferents dies del desenvolupament de l'embrió de pollastre. Els canvis en el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives són paral·lels als canvis en el nombre de cèl·lules picnòtiques. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de 3 a 7 embrions.

Cal tenir en compte que la PCD també afecta el gangli de l'arrel dorsal de l'embrió de pollastre on les cèl·lules moren per apoptosi (Hamburger i Levi-Montalcini, 1949; Hamburger et al., 1981). També es va observar a nivell del DGR, que algunes cèl·lules, majoritàriament picnòtiques, presentaven una intensa immunoreactivitat per c-Jun/sc45 per tot el citoplasma cel·lular, incloent les projeccions centrals i perifèriques que s'estenen vers la substància blanca de la medul·la espinal (Fig.25 G, H, I, J).

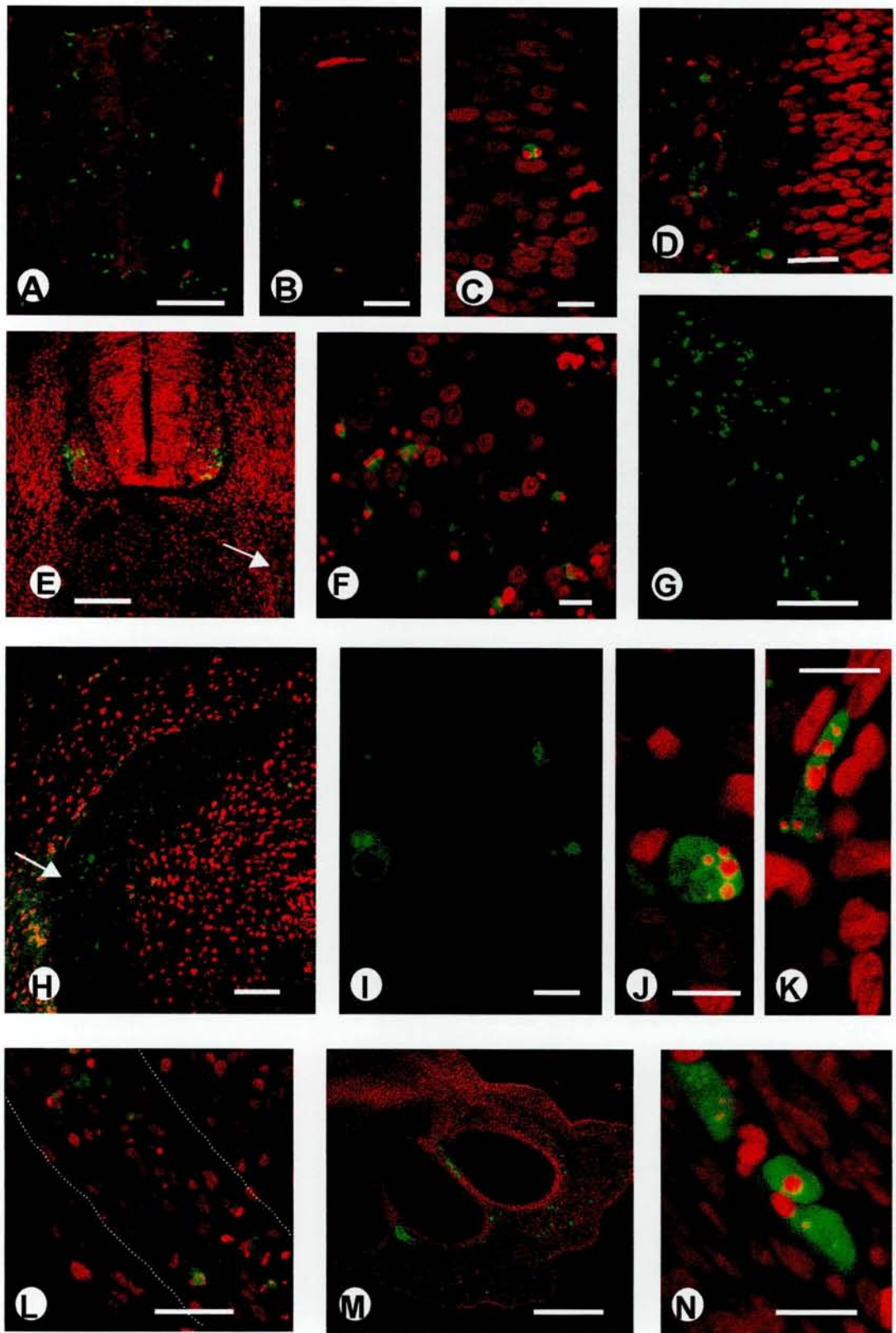


Figura 25. Imatges de microscòpia confocal de la immunofluorescència amb l'anticòs c-Jun/sc45 en seccions de criostat de diferents regions de l'embrió de pollastre a diferents dies del desenvolupament. La immunoreactivitat s'ha detectat amb anticossos secundaris associats a FITC (verd) o TRITC (vermell). En alguns casos, la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 s'ha combinat amb iodur de propidi (vermell) per l'observació de la morfologia de la cromatina o amb la tècnica TUNEL (verd) per detectar el DNA fragmentat. (A-D) Crioaccions de medul·la espinal d'embrions en els estadis embrionaris 17 (A) o 18 (B-D). Cal destacar la presència d'un gran nombre de cèl·lules TUNEL positives (verd) en el tub neural (A) i que algunes d'aquestes cèl·lules també són c-Jun/sc45 positives (vermell, (B)). En (C) i (D) es mostra una intensa immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (verd) en el citoplasma d'una cèl·lula picnòtica del tub neural (C) i algunes cèl·lules picnòtiques possiblement de la cresta neural (D) en les quals les esferes de cromatina nuclear estan tenyides amb iodur de propidi (PI, vermell). (E,F) Seccions de la regió cervical de medul·la espinal d'embrions E4,5 (c-Jun/sc45 en verd i iodur de propidi en vermell). En (E) es destaca una intensa immunoreactivitat en motoneurons de la columna motora lateral i en els seus axons perifèrics (veure fletxa); (F) magnificació de la regió cervical de la medul·la espinal en la qual es mostren motoneurons marcadets amb c-Jun/sc45 (verd) amb nuclis picnòtics (vermell). (G) Neurons c-Jun/sc45 positives en el DGR d'un embrió E7,5. (H) Neurons c-Jun/sc45 positives (verd) en les projeccions aferents primàries entren en la medul·la espinal que possiblement pertanyen a neurones que s'estan morint en el DGR, d'un embrió E7 (veure fletxa); aquesta mostra s'ha contrastat amb iodur de propidi (vermell). (I,J) Magnificació de neurones c-Jun/sc45 positives del DGR a E7,5 que mostren un marcatge citoplasmàtic difus que s'esten cap a les projeccions perifèriques; també s'observen alguns grànuls marcats més densos prop del nucli. Totes les cèl·lules del DGR c-Jun/sc45 tenen el nucli picnòtic com s'observa en (J) mitjançant iodur de propidi (vermell). (K) Cèl·lula muscular apoptòtica de la cuixa d'un embrió E7,5, c-Jun/sc45 positiva (verd) amb el nucli picnòtic (PI,vermell), després del tractament amb NMDA. (L) El tractament amb NMDA també provoca la mort apoptòtica de les cèl·lules de Schwann com a conseqüència de la degeneració axonal de les motoneurons; les cèl·lules de Schwann d'un nervi intramuscular d'embrions tractats amb NMDA a E10 identificades amb iodur de propidi (vermell), també mostren immunoreactivitat citoplasmàtica per c-Jun/sc45 (verd); els límits del nervi s'indiquen amb dos línies puntejades. (M,N) Cèl·lules apoptòtiques del mesènquima interdigital a E7 mostren immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (verd) que colocalitza amb nuclis picnòtics tenyits amb iodur de propidi (vermell), com es demostra en (N). Barres de calibratge: 10 µm (C,I-K,N); 25 µm (B,D,F,L); 50 µm (H); 100 µm (A,G); 250 µm (M).

3.2- Estudi de l'expressió dels antigens detectats amb c-Jun/sc45 en altres poblacions neuronals i no neuronals.

Durant el desenvolupament s'ha descrit que la PCD afecta tant poblacions neuronals com no neuronals. S'ha estudiat l'expressió de c-Jun/sc45 en algun d'aquests models com són: la mort de MNs de la regió cervical, la mort de cèl·lules indiferenciades en la fase inicial del desenvolupament de la medul·la, en la formació dels espais interdigitals i la mort de cèl·lules de Schwann i musculars induïda per privació nerviosa.

S'ha descrit que la mort massiva de les motoneurons de la regió cervical de la medul·la espinal de l'embrió de pollastre té lloc entre E4 i E5. La mort que té lloc en les MNs durant aquest període, a diferència de la que té lloc en la regió lumbar entre E6 i E10, no s'aconsegueix evitar ni bloquejant l'activitat neuronal ni amb la

presència de factors neurotròfics, la qual cosa indica que la regulació d'aquest tipus de PCD és independent de la diana (Yaginuma et al, 1996). S'ha estudiat el patró d'expressió de c-Jun/sc45 en aquest model, ja que és un nou tipus de PCD que també afecta les motoneurons espinals, però que probablement, està regulada per mecanismes diferents als del model anterior. En aquesta situació també es va observar, en seccions transversals de la regió cervical a E4,5, que hi havia un gran nombre de cèl·lules picnòtiques, localitzades exclusivament en la LMC, que també eren c-Jun/sc45 positives. El seu patró de marcatge era citoplasmàtic i idèntic al que havíem observat en la regió lumbar durant el període E5-E10 (Fig.25 E i F).

S'han comptat el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives en la LMC de la medul·la espinal cervical entre E4 i E7,5 (Fig.26). El perfil obtingut durant aquest període, pel que fa al nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives, és comparable al del nombre de motoneurons picnòtiques descrit per Yaginuma et al., (1996). El nombre màxim de cèl·lules c-Jun/sc-45 positives així com el de cèl·lules picnòtiques té lloc a E4,5.

S'ha descrit un altre període de PCD que té lloc en els estadis inicials del desenvolupament de la medul·la espinal de l'embrió de pollastre que afecta cèl·lules indiferenciades ubicades a diferents àrees de la medul·la espinal (Hommma et al., 1994). En aquesta fase de desenvolupament també s'observa immunoreactivitat de c-Jun/sc45 en el tub neural i en la regió més dorsal de la medul·la espinal d'embrions de pollastre en els estadis 17 i 18. Al combinar la immunofluorescència de c-Jun/sc45 amb iodur de propidi o amb la tècnica TUNEL vam observar que les cèl·lules c-Jun/sc45 positives eren cèl·lules picnòtiques i TUNEL positives (Fig.25 A, B, C, D).

La formació dels dits en molts vertebrats terrestres comporta la pèrdua selectiva del teixit interdigital durant el seu procés morfogenètic. Aquesta pèrdua de teixit és deguda fonamentalment a una mort programada de cèl·lules mesenquimàtiques que donarien lloc a la membrana interdigital (Saunders, 1966). En aquest model, s'hi observa que a E7,5, coincidint amb el període de mort d'aquestes cèl·lules, un gran nombre de cèl·lules interdigitals són c-Jun/sc45 positives i presenten una morfologia nuclear picnòtica (Fig.25 M i N).

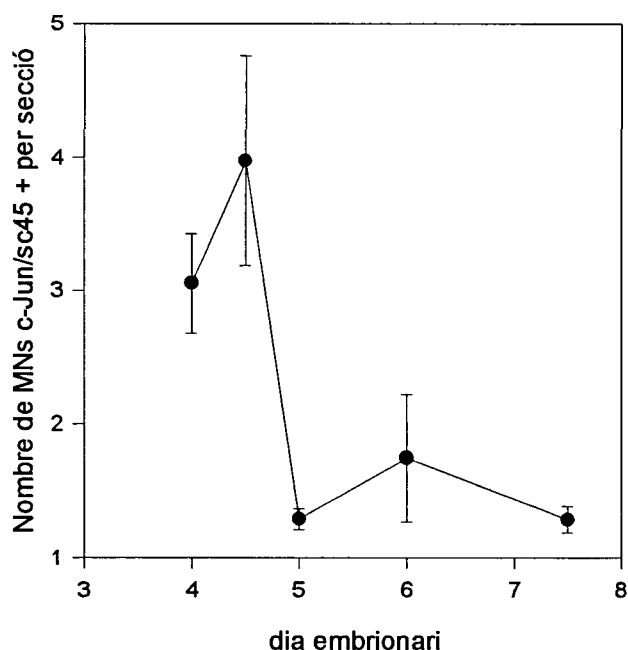


Figura 26. El nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives per secció de la LMC cervical de la mèdula espinal a diferents dies del desenvolupament de l'embrió de pollastre presenta un perfil molt similar al perfil del nombre de cèl·lules picnòtiques descrit per Yaginuma et al.(1996). El pic de cèl·lules c-Jun/sc-45 positives també s'observa a E4,5. (comparar amb la Fig. 2 de Yaginuma et al., 1996). Cada punt representa la mitjana \pm SEM de almenys 3 embrions.

S'ha descrit que la mort de les MNs, per exemple induïda per NMDA, produeix com a efecte secundari la mort apoptòtica de les cèl·lules de Schwann que estan associades als axons de les motoneurons que degeneren per necrosi (Ciutat et al., 1996), i a la mort apoptòtica d'algunes cèl·lules musculars que estan inervades per les motoneurons (Calderó et al., 1997). També s'ha observat immunoreactivitat per c-Jun/sc45 en cèl·lules de Schwann i en cèl·lules musculars després d'un lesió excitotòxica amb NMDA (Fig. 25 L i K). Aquestes cèl·lules musculars i d'Schwann immunoreactives per c-Jun/sc45 tenien nuclis amb morfologia picnòtica i eren TUNEL positives.

Paral·lelament, es van realitzar estudis immunohistoquímics utilitzant mostres de mèdula espinal a E7,5 amb diferents anticossos que estan dirigits contra el

mateix pèptid que c-Jun/sc45 com són c-Jun/AB-2 (c-Jun/AP-1 d'Oncogene) i c-Jun/sc45g fabricat amb cabra (Santa Cruz). Amb aquests anticossos es van obtenir els mateixos resultats que els obtinguts amb c-Jun/sc45. Respecte als anticossos c-Jun/sc45g, l'única diferència que s'hi va trobar és que es necessitaven utilitzar 10 vegades més de concentrats i el seu marcatge de fons era molt prominent (Fig.23 C). Per altra banda, en les cèl·lules de pollastre, els anticossos c-Jun/sc45 definien molt millor i més clarament el marcatge citoplasmàtic que no els c-Jun/AB-2. Per això, en aquest treball s'ha utilitzat bàsicament l'anticòs c-Jun/sc45, ja que és el més específic i econòmic, però cal destacar que sempre utilitzant els anticossos c-Jun/AB2 o c-Jun/sc45g hem obtingut el mateixos resultats que amb c-Jun/sc45.

3.3.-Immunoreactivitat per c-Jun/sc45 en la PCD de les MNs induïda per diferents estímuls o factors.

3.3.1. Mort induïda per ablació perifèrica de les dianes.

Com s'ha esmentat anteriorment, l'ablació de l'esbós de la pota (LBR) a E2,5 provoca una mort massiva de MNs entre E6-E10. Aquesta lesió afecta només el costat dret de cada embrió i s'ha demostrat que l'LBR practicat unilateralment no té cap efecte sobre el desenvolupament de les MNs contralaterals (Oppenheim et al., 1978). Així, en aquest estudi es pot utilitzar el costat esquerra del mateix animal com a control. En aquest model, també s'observa que en el costat on estaven ubicats els cossos de les motoneurons que havien d'inervar la pota eliminada (costat ipsilateral, dret) hi havia moltes més MNs c-Jun/sc45 positives que en el costat contralateral (o esquerra). A més, les cèl·lules amb un patró d'immunoreactivitat citoplasmàtic per c-Jun/sc45 eren picnòtiques i TUNEL positives (Fig.27 A, E). Els comptatges de cèl·lules c-Jun/sc45 positives en cadascun dels costats indiquen que hi ha un increment del 62% en el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives al costat operat respecte del nombre del costat control (n=18 seccions d'un total de dos embrions).

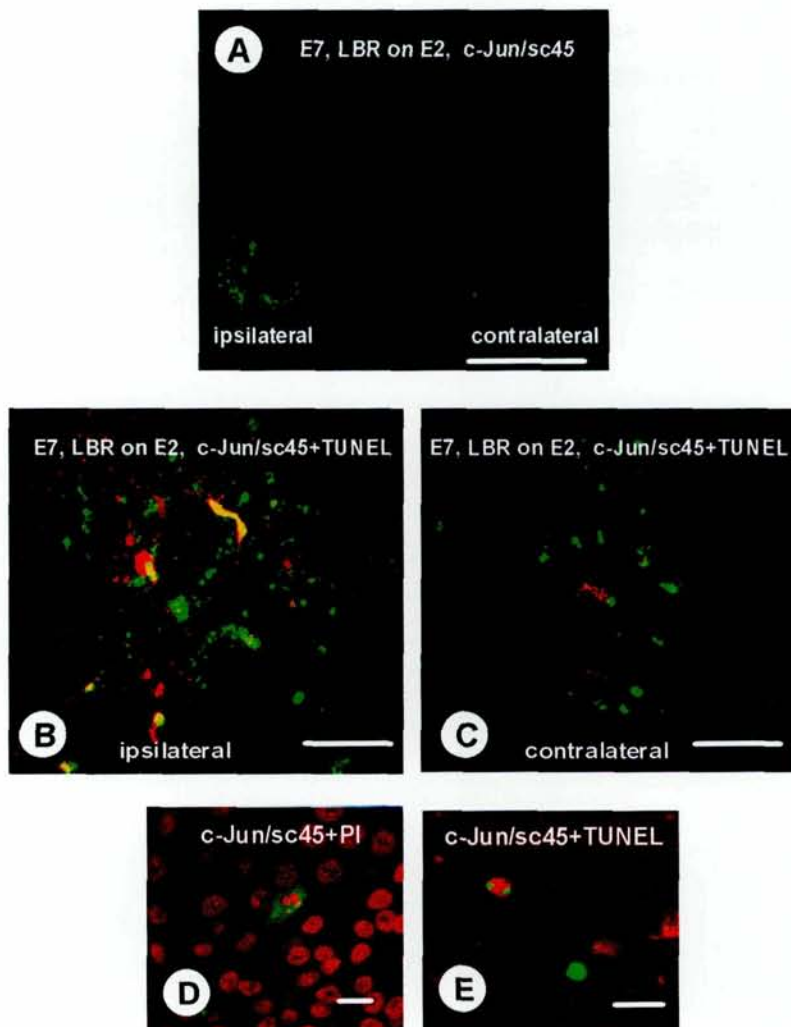


Figura 27. Imatges obtingudes per microscòpia confocal de la immunofluorescència en seccions de criostat de la medul·la espinal que demostren un increment de la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 associat a la mort neuronal induïda després de l'ablació unilateral de l'esbós de la pota (LBR) a E2,5 (A-E). Aquests embrions es van sacrificar a E7. S'han utilitzat anticossos secundaris associats a FITC (verd) o TRITC (vermell). En alguns casos, la immunofluorescència es va combinar amb iodur de propidi (PI) (vermell) per observar al morfologia de la cromatina o amb la tècnica TUNEL (verd) per detectar el DNA fragmentat. En (A) s'observa una secció de la medul·la espinal amb un gran nombre de MNs c-Jun/sc45 positius (verd) en el costat operat (ipsilateral) després de l'LBR. En (B,C) detall de la banya ventral on s'observa que totes les cèl·lules c-Jun/sc45 (vermell) positius són TUNEL positius (verd o groc), en canvi moltes cèl·lules positius pel TUNEL no mostren immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (verd). Si es compara (B) i (C) s'observa un increment del nombre de cèl·lules apoptòtiques en el costat ipsilateral. Magnificacions de MNs picnòtics (PI) (vermell) (D) o TUNEL positius (verd) (E) en que es mostra en més detall la immunoreactivitat per Jun/sc45 (verd en (D) i vermell en (E)) en cèl·lules apoptòtiques després de l'LBR. Barres de calibratge: 10 μm (D, E); 50 μm (B, C); 250 μm (A)

3.3.2. Mort neuronal induïda per axotomia.

Quan es practica l'axotomia en embrions de pollastre E13 s'indueix la mort apoptòtica en un nombre més moderat de motoneurons (Houenou et al., 1994, 1996). En aquesta edat, al contrari del que passa amb el model d'LBR, les motoneurons afectades per la lesió són més madures i la mort induïda experimentalment té lloc un cop ja ha finalitzat el principal període de PCD. Es va utilitzar aquest model per estudiar si la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 estava també associada a un tipus de mort que podríem considerar com a patològica.

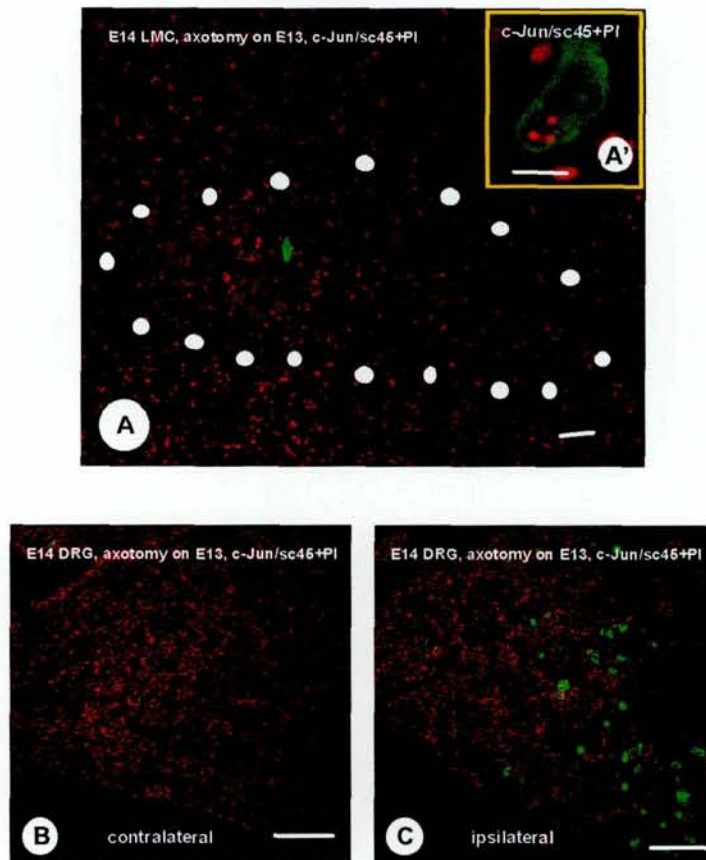


Figura 28. Imatges de microscòpia confocal de la immunofluorescència en seccions de criostat de la medulla espinal que demostren un increment de la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 associat a la mort neuronal induïda després de l'axotomia a E13. Aquests embrions es van sacrificar a E14. S'han utilitzat anticossos secundaris associats a FITC (verd) o TRITC (vermell). La immunofluorescència es va combinar amb iodur de propidi (PI) (vermell) per observar la morfologia de la cromatina. (A) Tot i que després de les 24h de l'axotomia el nombre de cèl·lules apoptòtiques de la LMC que es pot apreciar per secció és molt baix, aquestes cèl·lules mostren immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (verd). (A') Magnificació d'una MN del costat ipsilateral marcada per c-Jun/sc45 (verd) amb el nucli picnòtic (PI) (vermell). (B,C) mostren els DGRs d'una mateixa secció; en el ipsilateral (axotomitzat) hi ha un increment del nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives (verd) (C). Barres de calibratge: 10 µm (A'); 50 µm (A); 100 µm (B,C).

L'estudi immunohistoquímic es va realitzar 24h després de seccionar transversalment la pota a E13 i es va observar que hi havia algunes cèl·lules picnòtiques aïllades al llarg de la LMC del costat axotomitzat les quals mostraven una clara immunoreactivitat per c-Jun/sc45 en el citoplasma del seu cos cel·lular, axons i dendrites (Fig.28 A, A'). A nivell del DGR en el costat axotomitzat també es va detectar un increment en el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives que eren picnòtiques (Fig.28 B, C).

3.3.3. Mort neuronal induïda per β -Bgtx.

La mort neuronal massiva en la LMC i el DGR pot induir-se mitjançant la injecció d'una neurotoxina (β -Bgtx) en l'extremitat inferior de l'embrió de pollastre per via intramuscular (Pittman et al., 1978; Ciutat et al., 1996). Com es pot veure en la gràfica de la Figura 29, s'hi observa el nombre màxim de motoneurons picnòtiques a les 24h després de la injecció. Quan es compara el curs temporal de l'aparició de motoneurons c-Jun/sc45 positives, després d'una injecció intramuscular de β -Bgtx a E7, amb el del nombre de cèl·lules picnòtiques, es pot comprovar que les dues corbes segueixen un perfil d'expressió molt similar i paral·lel. Es pot veure que els efectes de la β -Bgtx són transitoris ja que s'obté un pic màxim tant de cèl·lules picnòtiques com de cèl·lules c-Jun/sc45, a les 24h, el qual decreix ràpidament.

Aquesta neurotoxina també afecta les cèl·lules del DGR on es detecta un increment de neurones que són c-Jun/sc45 positives i picnòtiques (Fig.30 A, F).

Per tal de demostrar que la β -Bgtx també afecta altres cèl·lules nervioses fora de la medul·la espinal i del DGR es va realitzar un estudi immunohistoquímic amb c-Jun/sc45 en seccions longitudinals de la retina procedent d'embrions en què s'havia practicat la injecció intraocular de β -Bgtx a E7. En aquest cas, també es veu augmentat dràsticament el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives que tenen els nuclis picnòtics. Les cèl·lules de la retina marcades són neurones ganglionars que moren de forma massiva a les 24 hores posteriors a la injecció amb β -Bgtx (Fig.30 G, L).

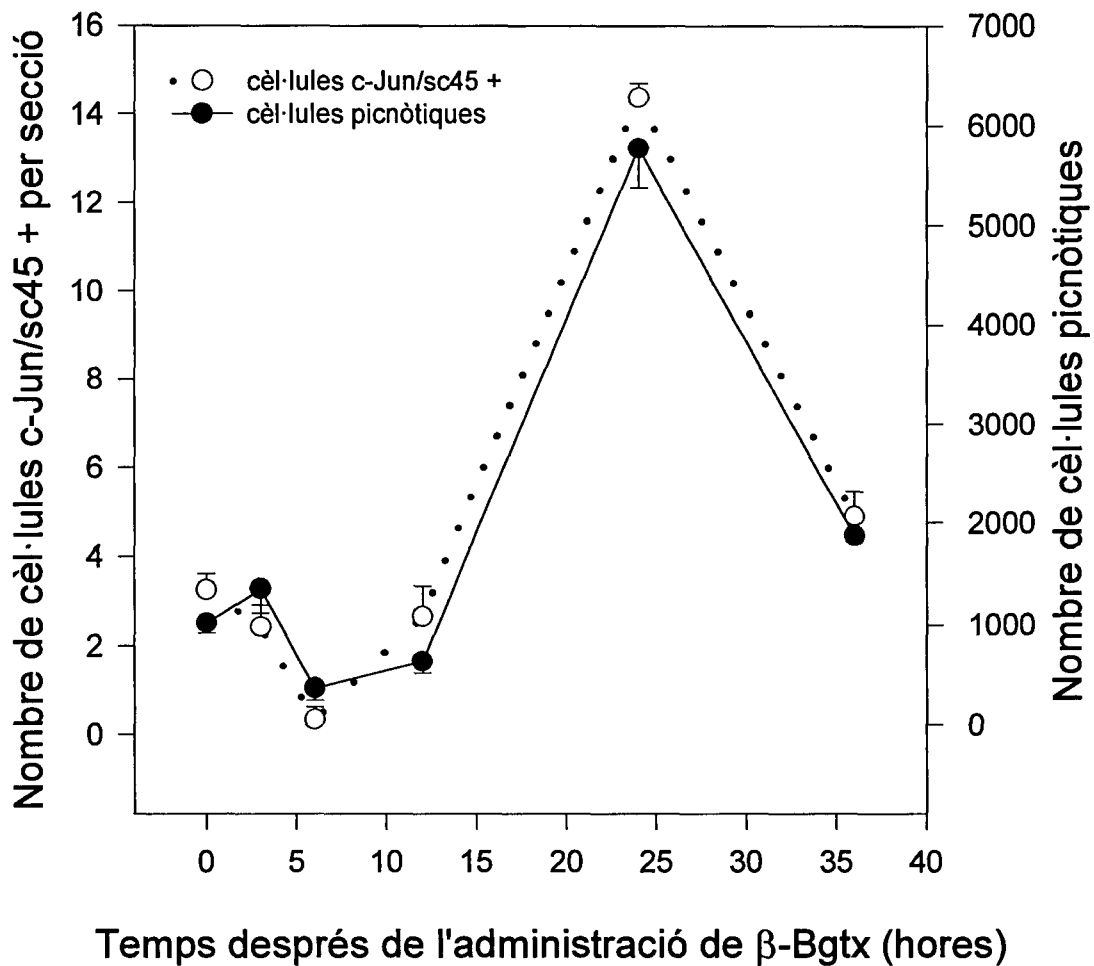


Figura 29. Canvis en el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives per secció (A) i cèl·lules picnòtiques (B) de la LMC lumbar de la mèdul·la espinal després de la injecció de β -Bgtx a E7. La β -Bgtx indueix una mort massiva de les motoneurons de manera transitòria amb la qual s'obté un pic de cèl·lules picnòtiques a les 24h després de la injecció. És important destacar que els canvis en el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives són paral·lels als canvis en el nombre de cèl·lules picnòtiques. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de 3 a 5.

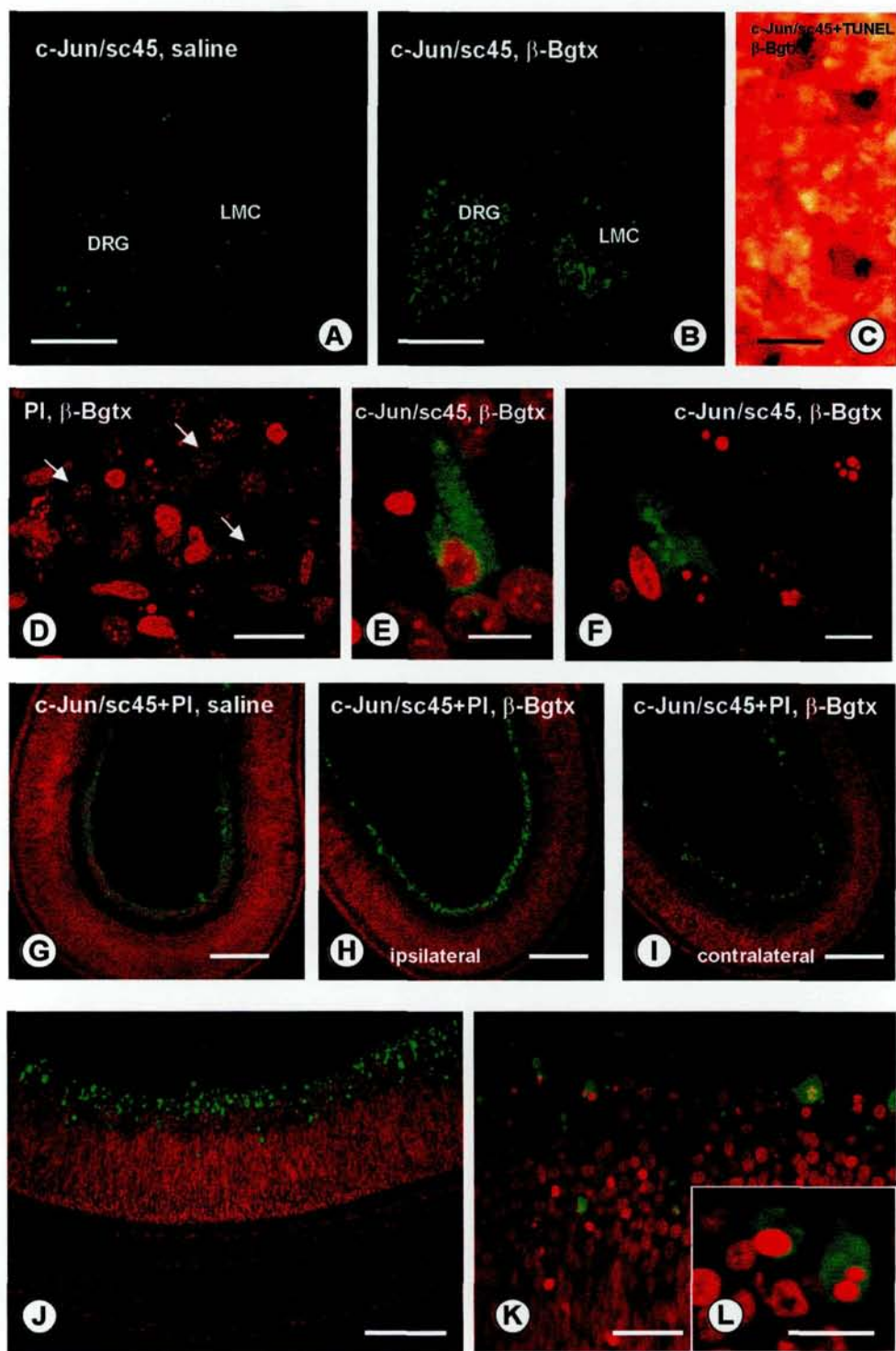


Figura 30 Imatges de microscòpia confocal de la immunofluorescència en seccions de criostat de medulla espinal (A-F) i retina (G-L) per mostrar la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 en embrions E8 salins o tractats amb β -Bgtx (per més detalls, veure Material i Mètodes). S'ha utilitzat un anticòs secundari associat a FITC (verd). En alguns casos, la immunofluorescència s'ha combinat amb iodur de propidi (vermell) per observar la morfologia de la cromatina, i en altres (C) s'ha realitzat una immunoperoxidasa amb c-Jun/sc45 que s'ha detectat amb el mètode AEC (vermell) i s'ha combinat amb la tècnica TUNEL mitjançant un anticòs secundari associat amb fosfatasa alcalina que s'observa

al microscopi òptic de color blau fosc. (A,B) Intensa immunoreactivitat per c-Jun/sc45 en la LMC i el DGR a les 24h del tractament amb salí (A) o amb β -Bgtx (B), on es pot observar un gran nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives tant en la LMC com en el DGR després del tractament amb β -Bgtx. (C) Motoneurons c-Jun/sc45 (vermell) positives i TUNEL positives (blau fosc). En (D) es mostren nuclis picnòtics després del tractament amb β -Bgtx; les fletxes indiquen els nuclis normals de les MNs tenyits amb iodur de propidi; (E,F) el doble marcatge amb c-Jun/sc45 i iodur de propidi demostra que les cèl·lules picnòtiques de (D) són immunopositives. (G) Després de la injecció intraocular de salí, molt poques neurones de la retina són c-Jun/sc45 positives (verd), en canvi, en els embrions tractats amb β -bgtx, el nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives en el costat ipsilateral (H) és superior al del costat contralateral (I). Magnificacions de retines tractades amb β -Bgtx (J-L). Cal destacar (K,L) que totes les cèl·lules c-Jun/sc45 positives (verd) tenen els nuclis picnòtics (vermell), però que alguns nuclis picnòtics (probablement cossos apoptòtics en fases finals de l'apoptosi) no són c-Jun/sc45 positius. Barres de calibratge: 10 μ m (E,F,L); 25 μ m (D,K); 40 μ m (C); 125 μ m (G-J); 250 μ m (A,B).

3.4.- Localització ultraestructural de la immunoreactivitat per c-Jun/sc45.

Per les dades exposades anteriorment es pot apreciar que existeix una estreta relació entre la inducció de mort cel·lular i l'expressió a nivell citoplasmàtic de components que són immunoreactius per c-Jun/sc45. És per aquest motiu i amb la intenció de poder determinar si les cèl·lules c-Jun/45 positives tenien morfologia apoptòtica, i per identificar quina era la localització subcel·lular del marcatge c-Jun/sc45, es va realitzar un estudi immunocitoquímic a nivell ultraestructural mitjançant preembedding i la tècnica de revelat de la immunoperoxidasa.

Aquesta tècnica va permetre observar una sèrie de partícules electrodenses immunoreactives a c-Jun/sc45 distribuïdes per tot el citoplasma de les neurones de la LMC, que no estava associada a cap compartiment cel·lular. Per altra banda, vam poder comprovar que l'immunomarcatge solament es detectava en cèl·lules que tenien una morfologia apoptòtica amb condensació de la cromatina típica de cèl·lules apoptòtiques (Fig.31 A).

A nivell de les neurites, que eren immunoreactives per c-Jun/sc45, es van observar uns cossos marcats que eren molt electrodensos i tenien un aspecte molt semblant al dels lisosomes secundaris (Fig.31 B). Considerem que aquests cossos electrodensos es podrien correspondre amb les partícules granulars que havíem observat prèviament per immunofluorescència (Fig.31 D, F).

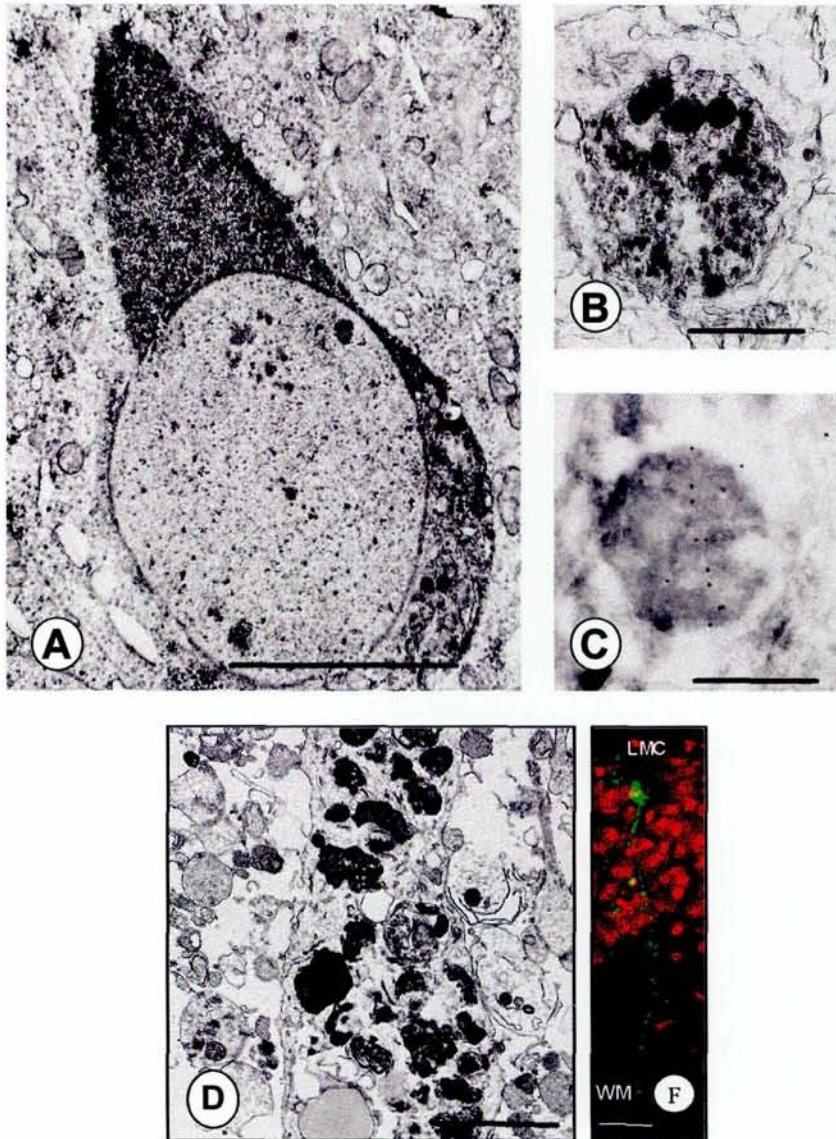


Figura 31. Imatges de microscòpia electrònica de la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (A, B i C). (A, B) Immunoperoxidasa pel procediment de preinclusió en que es mostra la immunoreactivitat citoplasmàtica per c-Jun/sc45 en MNs apoptòtiques i en cossos densos detectats en les neurites (C). Immunomarcatge per c-Jun/sc45 amplificat amb partícules d'or col·loïdal de 10 nm acoblades a proteïna A en ultracrioseccions on es mostra un cos dens com el que s'observa en (B). En (D) es mostra l'ultraestructura d'un axó que travessa la substància blanca i que podria pertànyer a una motoneurona a E7,5 que s'està morint després de la injecció intramuscular de β -Bgtx; el axó és ple de cossos densos semblants a lisosomes. En (E) es mostra la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (verd) d'una motoneurona tant en el soma com en la prolongació neurítica que travessa la substància blanca i on s'observen partícules més denses marcades amb c-Jun/sc45, les quals podrien correspondre als cossos densos semblants a lisosomes observats en (D), aquesta secció s'ha contrarrestat amb iodur de propidi (vermell). Barres de calibratge: (A) 3,6 μ m; (B) 0,9 μ m; (C) 0,7 μ m; (D) 2,9 μ m; (E) 10 μ m.

Per amplificar el senyal del marcatge c-Jun/sc45 i tenir més definició, es realitzà un estudi immunocitoquímic complementari, en algunes seccions, amb un anticòs secundari conjugat amb partícules d'or col·loïdal d'1nm seguit d'una amplificació amb plata (AuroProbe™ M Silver enhancement kit Amersham). Amb aquest mètode es van obtenir uns resultats similars als anteriors.

Per tal de demostrar que el marcatge d'aquests cossos densos per immunoperoxidasa no era un marcatge inespecífic, paral·lelament, es van processar crioseccions ultrafines en les quals es van utilitzar partícules d'or col·loïdal de 10 nm unides a la proteïna A (Fig.31 C). En tots aquest procediments emprats per microscòpia electrònica s'ha detectat el mateix patró citoplasmàtic d'immunoreactivitat per c-Jun/sc45 i la seva correlació amb la morfologia apoptòtica.

3.5.- Associació entre la immunoreactivitat citoplasmàtica de c-Jun/sc45 i la caspasa-3.

L'activació de la caspasa-3 té lloc durant la fase d'execució de l'apoptosi de molts tipus de cèl·lules, incloent les neurones (Cohen, 1997). Actualment, la detecció de la forma activa de la caspasa-3 constitueix un mètode excel·lent per a la identificació de cèl·lules apoptòtiques. Recentment, s'han obtingut anticossos molt específics contra la caspasa-3 activada que permeten la seva detecció en seccions histològiques gràcies a tècniques immunohistoquímiques. Altres mètodes són de caire indirecte i consisteixen en la detecció dels productes que resulten del trencament de proteïnes com la PARP i l'espectrina, a conseqüència de l'activitat caspasa. En conseqüència, es va recórrer a utilitzar anticossos contra la caspasa-3 per estudiar si existia algun tipus de correlació entre l'aparició de la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 i l'activitat casapasa-3, ja que s'ha observat, tant "in vivo" com "in vitro", que la caspasa-3 activa està associada a la mort apoptòtica de les motoneurons d'embrió de pollastre (Li et al., 1998).

Mitjançant la immunohistoquímica amb un anticòs policlonal dirigit contra la caspasa-3 activada, en seccions de mèdula espinal lumbar a E8, es va detectar un

marcatge molt similar al observat amb els anticossos c-Jun/sc45. Aquest marcatge evidenciava un patró clarament citoplasmàtic que exclouïa el nucli i es localitzava en cèl·lules de la LMC que tenien una morfologia típicament neuronal. La diferència més destacada entre el marcatge de la caspasa 3 activada i el de c-Jun/sc45, era que la caspasa-3, pràcticament, no s'observava en les prolongacions axonals i dendrítiques i que el seu marcatge es limitava a la regió del soma (Fig.32 A,D). A més, vam observar que les neurones grans, segurament motoneurons, immunoreactives a la caspasa-3 activada, sovint eren cèl·lules amb morfologia nuclear picnòtica, i TUNEL positives com les detectades amb c-Jun/sc45 (Fig.32 B, E, C, F).

Tenint en compte que els dos anticossos, caspasa-3 activada i c-Jun/sc45, marcaven cèl·lules que tenien les mateixes característiques vam realitzar un estudi de doble marcatge immunohistoquímic amb el dos anticossos sobre el mateix tall histològic per tal de comprovar si els epítops que reconeixien aquests anticossos es localitzaven en les mateixes cèl·lules apoptòtiques. Com que els dos anticossos han estat fabricats en conill, es va realitzar, primer, la immunohistoquímica amb l'anticòs caspasa-3 activada i fotografiar les imatges. Posteriorment, els anticossos foren eluïts mitjançant la tècnica d'oxidació amb una barreja de KMnO_4 i H_2SO_4 (Tramu et al., 1978). Un cop comprovat amb el microscopi que s'havia eliminat per complet el marcatge de la caspasa-3 activada fou processada la mostra amb l'anticòs c-Jun/sc45. Aquest mètode ha permès demostrar que les cèl·lules amb una immunoreactivitat citoplasmàtica positiva per la caspasa-3 activada, també presenten immunoreactivitat per c-Jun/sc45 (Fig.32 G1, G2).

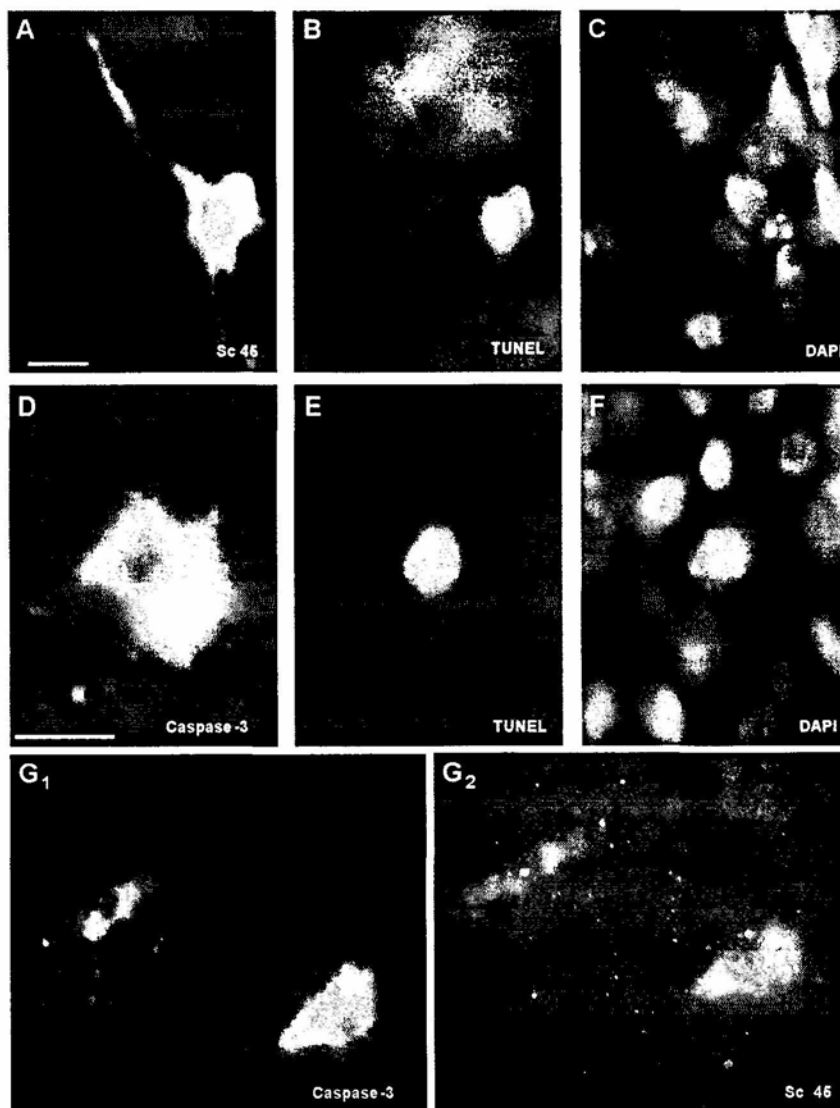


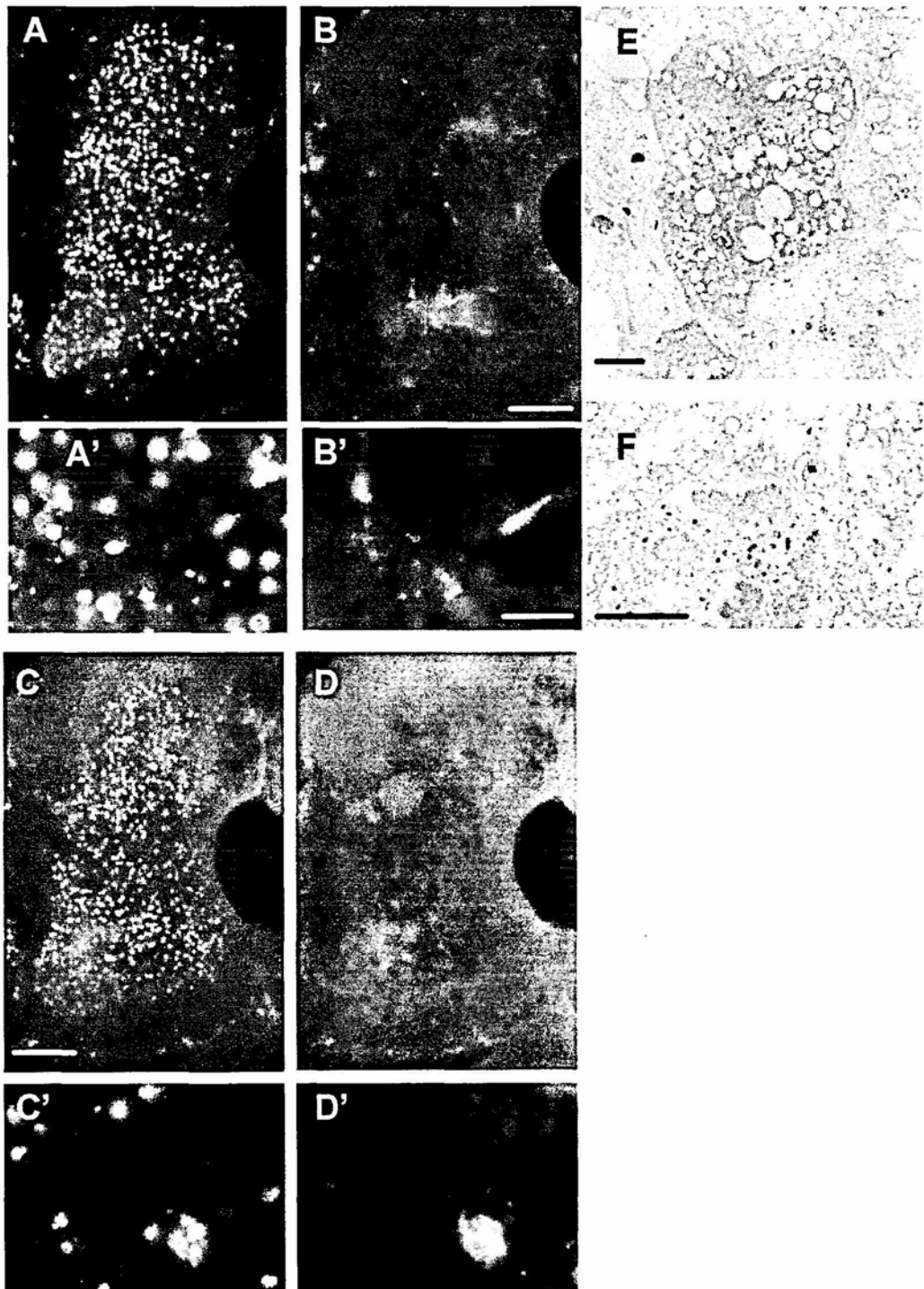
Figura 32. Magnificacions de la immunofluorescència amb els anticossos c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada en seccions de criostat de la LMC de la medul·la espinal. En alguns casos s'han combinat els anticossos amb DAPI (C i F) per visualitzar la morfologia de la cromatina o amb la tècnica TUNEL (B i E) per detectar la fragmentació del DNA. Totes les imatges es mostren per separat. (A) Motoneurona marcada amb anti-c-Jun/sc45. En (B) tinció amb DAPI i en (C) positivitat al TUNEL de la mateixa motoneurona que en (A). En (D) Motoneurona marcada amb anti-caspasa-3 activada; en (E) marcatge amb DAPI i en (F) amb la tècnica TUNEL de la mateixa motoneurona que en (D). En (G1 i G2) s'observen les mateixes motoneurons, degut a que s'ha realitzat un doble marcatge amb els dos anticossos (veure Material i mètodes), primer s'ha fet la immunohistoquímica amb l'anticòs caspasa-3 activada (G1) i després amb c-Jun/sc45 (G2). Barres de calibratge: 25 µm (vàlida per totes les imatges).

3.6.- La immunoreactivitat per c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada no està associada a la mort per necrosi induïda per NMDA.

Per tal de demostrar el tipus de mort que està associat a la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 i per caspasa-3 activada es realitzà un estudi de la seva expressió en dos models de mort: un necròtic i l'altre apoptòtic, els quals poden ser induïts experimentalment en la medul·la espinal d'embrions de pollastre. La mort necròtica la vam induir amb NMDA i l'apoptòtica amb β -Bgtx

L'administració d'una dosi única d'1 mg d'NMDA en embrions E7 provoca un efecte excitotòxic dramàtic a les 12h després del tractament que es capaç de lesionar gairebé tota la medul·la espinal (Calderó et al.,1997). Els estudis de microscòpia electrònica dels embrions tractats amb NMDA van posar de manifest que les cèl·lules afectades per la lesió tenien característiques típiques de les cèl·lules necròtiques, com són la vacuolització i edema intracel·lular, la disrupció dels orgànuls i la fragmentació de la membrana plasmàtica i de la nuclear (Fig.33 E i F). Després de provocar aquesta lesió es va observar que apareixien nombroses cèl·lules distribuïdes per tota la medul·la, i especialment en les regions dorsal i intermitja, que eren TUNEL positives (Fig.33 A i C). Per contra, pràcticament no hi havia cèl·lules c-Jun/sc45 o caspasa-3 activada positives en tota la medul·la espinal, únicament es podia observar, de forma excepcional, alguna cèl·lula aïllada que era c-Jun/sc45 positiva i caspasa-3 activada (Fig.33 B i D). Les cèl·lules que presentaven immunoreactivitat per c-Jun/sc45 o caspasa-3 eren TUNEL positives, i estaven localitzades a nivell de la LMC (Fig.33 A', B', C', D'). Aquestes cèl·lules marcades eren molt petites i presentaven una morfologia que correspondria més aviat a interneurons o cèl·lules no neuronals que no pas a motoneurons (Fig.33 B' i C').

Figura 33. Imatges de la immunofluorescència amb c-Jun/sc45 (**B** i **B'**) i caspasa-3 activada (**D** i **D'**) en hemimedul·les d'embrions E7,5 tractats amb NMDA. S'han combinat els anticossos amb la tècnica TUNEL (**A**,**A'** i **C**,**C'**) per detectar la fragmentació del DNA. Les imatges es mostren per separat. En (**A** i **C**) s'observa la positivitat al TUNEL distribuïda per tota la medul·la. Cal destacar que en la LMC hi ha menys cèl·lules TUNEL positives que en la resta. En (**B**) algunes MNs marcades amb c-Jun/sc45 i en (**D**) amb caspasa-3 activada. (**A'** i **C'**) cèl·lules de la columna motora lateral TUNEL positives que corresponen a detalls de A i B respectivament. (**B'**) Imatge magnificada de la LMC de (**B'**), i (**D'**) imatge magnificada de la LMC de (**D**). Cal destacar que les cèl·lules amb immunoreactivitat a c-Jun/sc45 (**B'**) i a caspasa-3 activada (**D'**) són TUNEL positives. (**E**) Aspecte ultraestructural de MNs de la LMC d'un embrió E7,5 a les 12 hores de l'administració d'1mg d'NMDA. (**F**) Destaca la intensa vacuolització del reticle endoplasmàtic i la dilatació de les mitocondries després del tractament amb NMDA. Barres de calibratge: 200 μ m per A, B, C, i D; 50 μ m per A', B', C', D'; 2 μ m (E), 1 μ m (F).



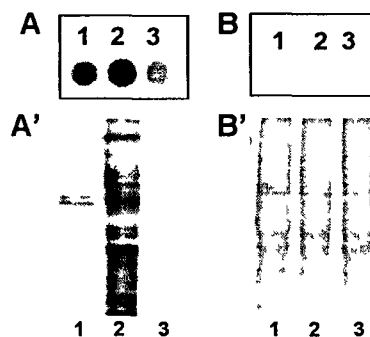
Per altra banda, com s'ha dit anteriorment, la injecció intramuscular de β -Bgtx a E7 provoca una mort a gran escala que afecta fonamentalment les motoneurons de la LMC i del DGR. En aquest model de mort s'observa un increment del nombre de cèl·lules TUNEL positives, preferentment a la LMC, el qual també es correspon amb un increment del nombre de cèl·lules picnòtiques i c-Jun/sc45. A més, es va observar una molt bona colocalització entre c-Jun/sc45, picnosis i positivitat al TUNEL. També amb l'anticòs contra la forma activa de la caspasa-3 vam poder comprovar que aquestes cèl·lules també tenien la caspasa-3 activada.

Aquests dos models van permetre veure que la immunoreactivitat a c-Jun/sc45 i l'activació de la caspasa-3 eren dos fenòmens que es donaven en paral·lel en situacions en què hi havia un increment del nombre de cèl·lules que morien de forma apoptòtica, però no necròtica.

3.7.- Els anticossos c-Jun/sc45 reconeixen els epítops generats per l'activitat caspasa-3.

Diferents estudis indiquen que la detecció de l'activitat caspasa-3 és un bon marcador d'apoptosi; és per això, que els anticossos dirigits contra la caspasa-3 activada o contra neoepítops que sorgeixen de l'acció de la caspasa-3 són considerats uns bons marcadors d'apoptosi. Aquest segon tipus d'anticossos s'ha utilitzat com a marcador histològic de cèl·lules apoptòtiques en diferents estudis realitzats "in vitro" i "in vivo" (Kouroku et al., 1998; Tanaka et al., 2000). Per altra banda, Siman et al., (1999), quan utilitzen un anticòs contra un heptapèptid que sorgeix del trencament de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) per la caspasa-3, van observar que la seva expressió seguia el mateix patró que els antígens detectats per c-Jun/sc45. Més recentment, s'ha observat en el nostre laboratori que c-Jun/sc45 detecta, entre altres, un epítop de la proteïna "seryl-tRNA synthetasa" que sorgeix després del seu trencament per la caspasa-3 (Casas et al., 2001). Aquests resultats ens indiquen que c-Jun/sc45 podria reconèixer components cel·lulars que s'originen per acció de la caspasa-3 durant la fase d'execució de l'apoptosi. És per això que ens vam plantejar

realitzar un estudi intentant reproduir “in vitro” i “in situ” l’activitat proteolítica de la caspasa-3 en mostres de medul·la espinal d’embrions de pollastre a E10, estadi en què el nombre de cèl·lules apoptòtiques i c-Jun/sc45 positives és molt baix (veure Figura 24). Per una banda, es procedia a incubar amb caspasa-3 activa extractes de medul·la espinal de pollastre a E10 i posteriorment foren analitzats per dot i western-blot i, per altra banda, s’incubaren seccions histològiques d’embrions E10, obtingudes amb criostat, amb la caspasa-3 activa per tal d’emular “in situ” el seu efecte sobre el citoplasma cel·lular.



1= Fracció soluble E-10 SC 5 μ l
 2= Fracció soluble E-10 SC 5 μ l digerida amb caspasa-3
 3= Fracció soluble E-10 SC 5 μ l digerida amb caspasa-3 +Z-VAD

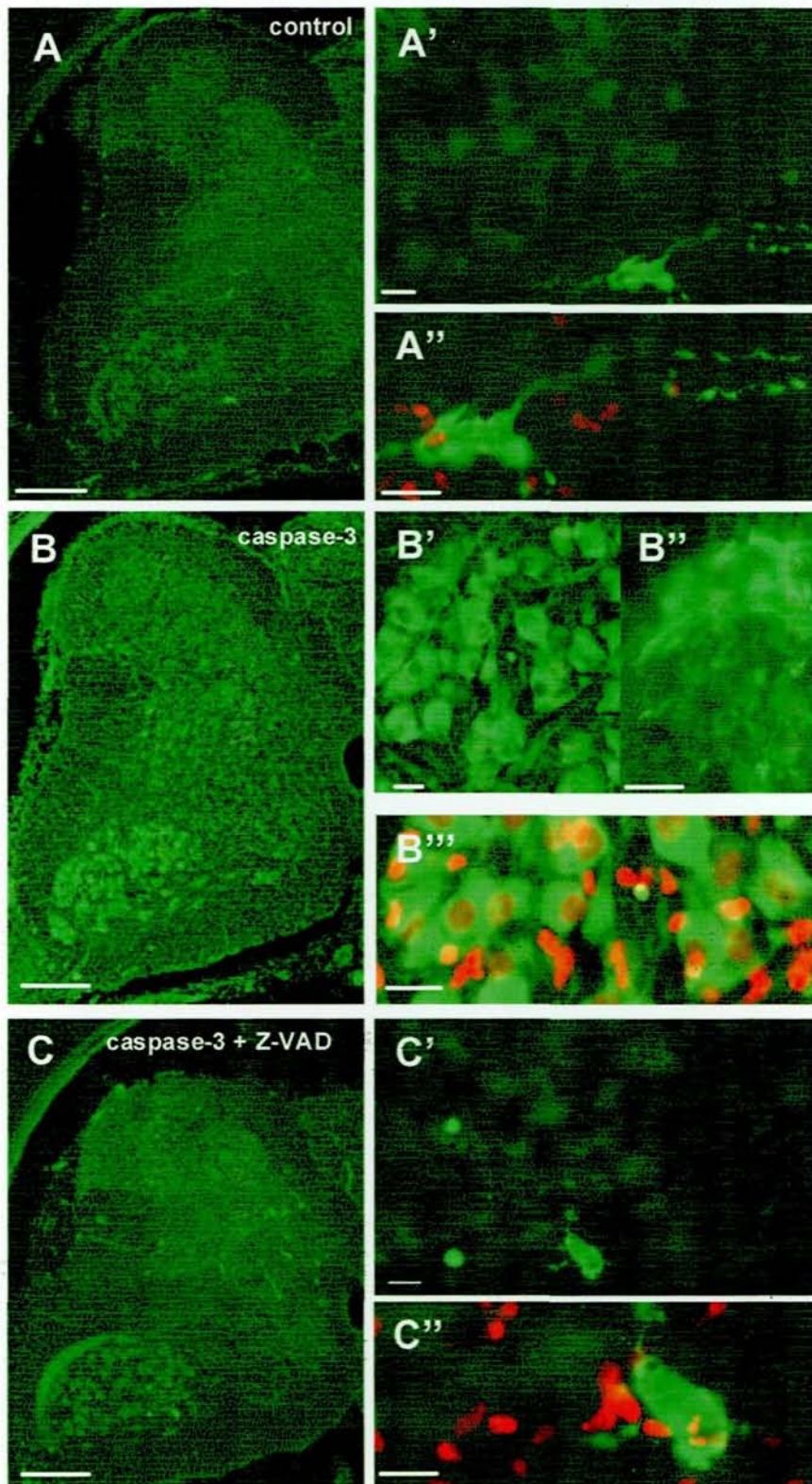
Figura 34. Anàlisi per dot (A) i western blot (A') amb l'anticòs c-Jun/sc45 d'extractes citoplasmàtics de medul·la espinal a E10 controls (1) o incubats amb caspasa-3 activa (2) o amb caspasa 3-activa i Z-VAD (3). En (B i B') es mostra la concentració i el patró de proteïnes després de tenyir les membranes amb cromasie blue.

L’anàlisi per dot-blot dels extractes citoplasmàtics de medul·la espinal a E10 que han estat prèviament incubats durant 1h amb l’enzim caspasa-3 mostren una immunoreactivitat per c-Jun/sc45 substancialment incrementada respecte als extractes control. L’ efecte de la caspasa-3 és eliminat amb Z-VAD, un inhibidor de l’activitat caspasa-3. Quan les mateixes mostres es van analitzar per western-blot es va observar que c-Jun/sc45 reconeixia un ampli ventall de bandes, les quals corresponien a diferents proteïnes i que cadascuna d’elles migrava amb una mobilitat diferent. Aquestes bandes també desapareixen al afegir Z-VAD (Fig.34).

L'estudi immunohistoquímic amb c-Jun/sc45 de seccions de medul·la espinal a E10, que van ser tractades amb l'enzim caspasa-3 durant 4h, va permetre observar que després de l'acció de la caspasa-3 es detectava una intensa immunoreactivitat citoplasmàtica per c-Jun/sc45 que afectava tota la medul·la espinal. Aquest marcatge es veia incrementat, sobretot, en la banya ventral on pràcticament totes les MNs presentaven una intensa immunoreactivitat per c-Jun/sc45. Les motoneurons marcades presentaven una morfologia aparentment normal amb un patró d'immunoreactivitat citoplasmàtic molt ben delimitat que no afectava els nuclis (Fig. 35 B', B'''). També es va observar immunoreactivitat positiva en axons i dendrites a nivell de la substància blanca de la medul·la espinal. Aquest marcatge era idèntic al que havíem observat en cèl·lules apoptòtiques (Fig.35 B'', A). Quan les mostres s'incubaven simultàniament amb caspasa-3 i Z-VAD, el marcatge immunohistoquímic de c-Jun/sc45 no apareixia i les mostres tenien el mateix patró de marcatge que les mostres control (Fig.35 A i C).

Aquestes digestions amb caspasa-3 activa posaven de manifest que la presència dels epítops que reconeixia l'anticòs c-Jun/sc45 era una conseqüència de l'activitat proteolítica produïda per la caspasa-3 sobre diferents substrats cel·lulars.

Figura 35. Imatges de la immunofluorescència amb l'anticòs c-Jun/sc45 en hemimedul·les d'embrions E10 control (A) i tractats amb caspasa-3 activa (B) o amb caspasa-3 activa més Z-VAD (C). En (A' i A'') s'observa en detall la immunoreactivitat citoplasmàtica per c-Jun/sc45 en el soma i prolongacions axonals i dendrítiques d'una MN apoptòtica. L'activitat caspasa-3 posa de manifest la presència d'antígens que reconeix c-Jun/sc45 en MNs sanes que han estat incubades amb l'enzim; es pot observar que totes les MNs presenten immunoreactivitat positiva per c-Jun/sc45 (B' i B''') amb un patró citoplasmàtic que inclou axons i dendrites (B''). Cal destacar que l'activitat caspasa-3 pot inhibir-se per complet amb Z-VAD, un inhibidor específic de caspasa-3. (C) La immunoreactivitat per c-Jun/sc45 després de la incubació de les mostres amb caspasa-3 i Z-VAD és similar a la dels embrions control (A), on les cèl·lules immunopositives són sempre picnòtiques (C i C'). Barres de calibratge: 200 µm per A, B i C; 30 µm per A', A'', B', B'', C' i C''.



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.

La majoria de teixits que s'utilitzen per a estudis anatomopatològics en diferents laboratoris, generalment és processen i es guarden inclosos en parafina durant llargs períodes de temps. La utilització d'anticossos capaços de reconèixer cèl·lules que es troben en la fase d'execució de l'apoptosi, en aquest tipus de mostres, pot representar una eina molt útil a l'hora d'identificar aquestes cèl·lules per immunohistoquímica en seccions histològiques.

Per això, s'ha portat a terme un estudi immunohistoquímic amb els anticossos c-Jun/sc45 i caspasa-3 en mostres de medul·la espinal a E7,5 que van ser processades i incloses en parafina fa tres anys.

També s'ha aprofitat aquest estudi per comparar-ne la sensibilitat, ja que tots dos anticossos són capaços de reconèixer cèl·lules durant la fase d'execució de l'apoptosi. Així, s'ha observat que els dos anticossos presenten un patró d'immunoreactivitat citoplasmàtic similar al patró que havíem observat en les seccions de criostat. La immunoreactivitat citoplasmàtica per c-Jun/sc-45 és localitza també a nivell de les dendrites i axons, mentre que el marcatge de la caspasa-3 està restringit, bàsicament, al soma cel·lular. En les mostres processades en parafina és molt més intens el marcatge que es detecta amb els anticossos c-Jun/sc45 que no pas el detectat amb els anticossos contra la caspasa-3 activa (Fig.36).

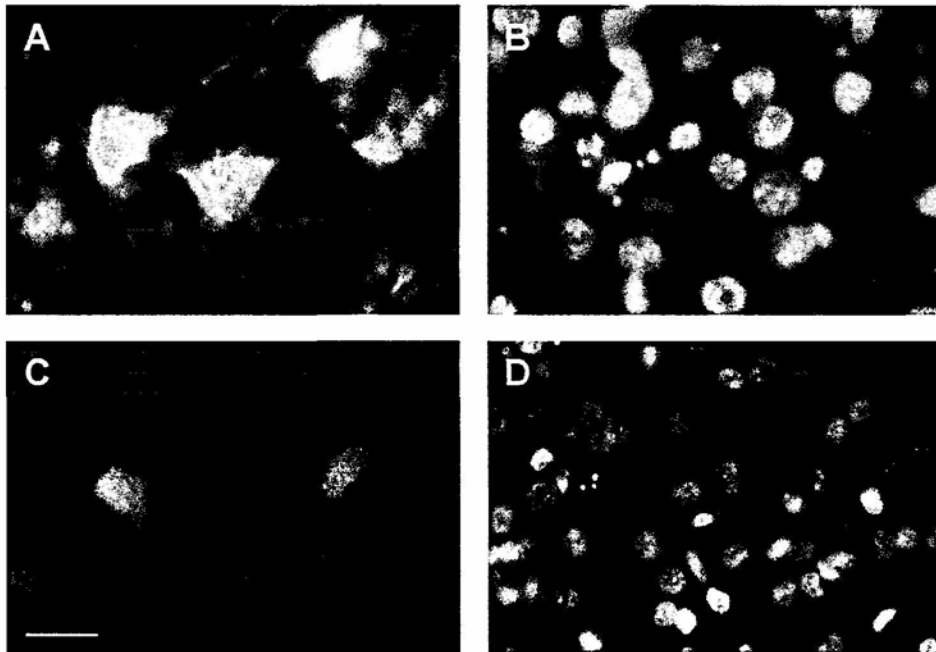


Figura 36. Magnificacions de la immunofluorescència en MNs immunoreactives a c-Jun/sc45 (A) i caspasa-3 (B). El doble marcatge amb els anticossos c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada s'ha combinat amb DAPI per visualitzar la morfologia de la cromatina. Les imatges s'han fotografiat per separat. En (A) es mostren MNs intensament marcades amb c-Jun/sc45 que són picnòtiques (B), i en (C) s'observa el marcatge més dèbil de la caspasa-3 activada (C) en MNs picnòtiques (C') de seccions histològiques processades per inclusió en parafina. Barra de calibratge: 25 μ m.