



Estudi de la neurodegeneració i les alteracions de la barrera hematoencefàlica en rates tractades amb àcid 3-nitropropionic

Joaquim Duran Vilaregut

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT de FARMÀCIA
DEPARTAMENT de FISIOLOGIA

**Estudi de la neurodegeneració i les
alteracions de la barrera hematoencefàlica
en rates tractades amb àcid
3-nitropropioníc**

JOAQUIM DURAN VILAREGUT

2012



FACULTAT de FARMÀCIA
DEPARTAMENT de FISIOLOGIA

Programa de doctorat:
Recerca, desenvolupament i control de medicaments

Estudi de la neurodegeneració i les alteracions de la barrera hematoencefàlica en rates tractades amb àcid 3-nitropropiònic

Memòria presentada per Joaquim Duran Vilaregut per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Dr. Jordi Vilaplana Hortensi
(Director)

Dra. Carme Pelegrí Gabaldà
(Directora)

Joaquim Duran Vilaregut
(Doctorand)

JOAQUIM DURAN VILAREGUT

2012

L'investigador ha de resistir fermament les temptacions de simplificar en excés i pensar de manera convencional, i ha de fer-se a si mateix dòcil a les indicacions del "fet misteriós".

Aldous Huxley

L'univers és com és, però no és com vostè el pensa.

Iván Oliveros

Als meus pares, per haver estat allà en els moments més difícils

*A la Montse, per acompanyar-me i mantenir sempre la confiança
quan jo no veia sortida*

Així que vaig veure que la UB organitzava un màster de Neurociències, vaig decidir que era el moment de satisfer dues inquietuds que rondaven pel meu cap: una que sempre havia estat allà un cop vaig acabar els meus estudis a la universitat, que era la de fer una tesi doctoral, i una de més recent, que era aprofundir en el coneixement de com funciona el cervell i, principalment, de com funciona jo mateix. A partir d'aquí, em vaig embarcar en el projecte de cursar el màster i intentar posteriorment trobar algun grup de recerca al que incorporar-me per poder fer la tesi. Finalment, la decisió presa ha resultat no ser escabellada del tot, ja que sembla que l'embarcada ha arribat a bon port, i ara mateix em trobo satisfet. Satisfet no només per la tesi en si mateixa, sinó també pel procés d'obertura a noves relacions i maneres de veure el món que durant aquest temps he pogut experimentar.

Heu estat molts els que, d'una manera o d'una altra, directament o des de la distància en l'espai i el temps, participant o no, heu fet possible la consecució d'aquest treball. A tots vosaltres, i esperant que ningú es quedi al tinter (ja em sabreu disculpar si es dóna el cas), us voldria dedicar algunes paraules.

Per començar, moltes gràcies a les Doctores Josefina Prat i Ruth Ferrer per l'oportunitat que em veu donar per treballar a la ULD i per l'interès que sempre heu mostrat per la meua situació tant a nivell acadèmic com professional. Faig extensiu aquest agraïment a la Maria José, la Visi, el Lluís i la Lídia, per totes les facilitats i el tracte rebuts. Ha estat un plaer participar en aquest projecte. Gràcies també a l'Olga Palomar i a la Pilar Vaquero, de l'administració de la facultat de Farmàcia, per haver-me tingut present en els moments oportuns.

Una abraçada pel César, tècnic del departament de Química Inorgànica de la facultat de Química, per l'afabilitat de tracte i les bones estones compartides.

Més abraçades per l'Andrés, la Sílvia, la Mari Carmen, la Brugués, l'Ascensió i tota la gent del departament de Bioquímica de la facultat de Farmàcia, per fer-me senzilla la incorporació i per la confiança i amistat creixents que acompanyen el meu dia a dia.

Agraeixo també a la Conxita Solans la confiança que em va donar en oferir-me l'oportunitat de treballar al seu laboratori del CSIC en un àmbit tan diferent al de la present tesi.

Gent de Granollers i rodalies (en alguns casos quelcom més que rodalies), la tesi inacabable de la que tant heu sentit a parlar, va dedicada també a vosaltres. Als integrants de la caminada dels quaranta, Carles F., Joan G., i Pere C.; als neoagricultors Carles G. i Xavi; al

Pali, filòsof i artista del carrer; al Joan C., l'heroi dels 80; al Pepe, obrint mercat a l'extrem orient; al David i seu humor marca registrada; a l'Albert, tot brutalitat i bondat; al Gerard M. per la llarga amistat que ens uneix; a l'Alfredo per tots els quilòmetres compartits; a l'Ivan per compartir la inquietud pel que escapa al sentit comú; al Sergi L. per les llargues reflexions a peu de barra; al Sergi S. i la seva desbordant creativitat en tema de negocis; al Santi per les recomanacions cinematogràfiques; a l'Isaac, per les bones vibracions; al Joan O., per les seves recomanacions gastronòmiques; a l'Antoni, per la seva calma, i a l'enciclopèdia de la guerra Jordi Ll. Imma, Cristina, Cecília, Núria, Elo, Natàlia, Carmen, Mireia, Bego, Isabel, Mònica, Lídia, Meritxell, Encarna, Sílvia, Bea i Eva: naturalment també va per vosaltres. Gràcies a tots i a totes per les experiències viscudes i per aguantar amb més o menys paciència les meves paranoies passades i les que puguin quedar per venir.

De la carrera de química, el que més valoro és l'amistat del Gerard, l'incansable viatger, em plauen en gran mesura els dinars, les llargues passejades i les xerrades sobre tot el que ens pugui passar pel cap que seguim compartint; la del Víctor, no crec que hagués pogut acabar la carrera sense el teu suport i les sessions intensives d'estudi a la biblioteca i al passadís; i la del David i la Pili, la Ivet i el Pol, gaudeixo molt de les nostres trobades (encara que els ja no tan petits em deixen cada vegada més baldat...). Moltes gràcies per poder seguir gaudint de la vostra companyia.

Tot i que l'etapa va ser curta, no em puc oblidar de la gent que vaig tenir la sort de conèixer al CSIC. Manroshan, Àlex, Alberto, Jon, Carolina, Maria, Marina, Jonathan, ha estat un plaer compartir aquest període de temps amb vosaltres.

Un record molt especial per als meus amics de l'altra banda de l'oceà, la Clàudia i, ara ja de nou per aquestes contrades, el Pere i el Jordi, i els que habiten el país veí, la Mari Carmen i la Chong Nee. També per a les meves amistats permaculturals Joan, Marguerite, Juanlu, Santi, Maxime, Núria, Abeleitor Destroyer Killermen, Raúl i Ester.

Entre totes les persones que han estat directament relacionades amb la realització d'aquest treball, agraeixo en primer lloc al Doctor Antoni Camins i a la Doctora Mercè Pallàs totes les facilitats proporcionades a l'hora de tirar endavant el projecte.

Més enllà de ser un grup de recerca, considero al Grup de Barrera Hematoencefàlica com a una petita família per la proximitat amb la que he viscut la relació amb les persones que l'integren. Doctora Carme Pelegrí i Doctor Jordi Vilaplana, Nanen i Jordi, estic molt content i agraït de que m'hagueu acollit al laboratori i hagueu tingut la confiança en que el projecte de

tesi tiraria endavant. Jaume i Gemma, companys d'aventura, gràcies pel vostre suport i el vostre ajut sempre que m'ha fet falta. El mateix puc dir de tota la gent que integra el departament de Fisiologia de la facultat. Ha estat una sort compartir aquest temps amb tots vosaltres.

Em resulta difícil posar en paraules la gratitud que sento per l'Enric Garrido, que durant els últims anys m'ha ajudat tant a entendre'm una mica millor i a combatre els fantasmes interiors. Simplement moltes gràcies.

Finalment, l'agraïment més profund per a la meva família natural i per a la nova família política que m'ha acompanyat durant els últims anys.

Més enllà de tot agraïment possible està el que sento pels meus pares Joaquim i Margarita, que incondicionalment m'han donat suport durant tota la vida, i per la Montse, amb qui comparteixo el dur i inevitable però alhora enriquidor camí del creixement personal. Sabeu que podeu comptar amb mi igual que sé que sempre podré comptar amb vosaltres.

Gràcies a tots.

Aquesta tesi ha estat subvencionada pels projectes BFU 2006-11981 del "Ministerio de Educación y Ciencia", BFU 2009-08352 i BFU 2010-22149 del "Ministerio de Ciencia e Innovación".

ÍNDEX.

I. INTRODUCCIÓ	1
1. Malaltia de Huntington	3
1.1. Manifestacions clíniques.	3
1.2. Manifestacions neuropatològiques.	4
1.3. Mecanismes implicats en la fisiopatologia de la MH.	5
1.3.1. Excitotoxicitat.	5
1.3.2. Alteracions mitocondrials i del metabolisme energètic.	9
1.4. Models experimentals de la MH.	9
1.4.1. Àcid 3-nitropropioníc.	11
1.4.1.1. Neurotoxicitat del 3-NPA.	11
1.4.1.2. Animals i pautes d'administració.....	15
2. Mort cel·lular	17
2.1. Mort cel·lular programada.	17
2.1.1. Apoptosi clàssica (MCP tipus I).....	18
2.1.1.1. Via extrínseca.....	20
2.1.1.2. Via intrínseca.....	20
2.1.1.3. Via del granzim B.	21
2.1.2. Autofàgia (MCP tipus II).	21
2.1.3. Necrosi programada (MCP tipus III).	22
2.1.4. Molècules efectores de la MCP.....	22
2.1.4.1. Caspases.	22
2.1.4.2. AIF i Endo G.....	23
2.1.4.3. Smac/DIABLO i Omi/HtrA2.....	24
2.1.4.4. Catepsines.	25
2.1.4.5. Calpaïnes.	25
2.1.5. Desencadenants de la MCP en neurones.	26

2.2. Mitochondria i MCP.....	26
2.2.1. Mecanismes de permeabilització de la MEM.....	27
2.2.2. Mecanismes de permeabilització de la MIM.....	28
2.2.3. Paper de la mitochondria en l'homeòstasi del Ca ²⁺	29
2.2.4. Producció d'energia i generació d'estrès oxidatiu a la mitochondria.....	30
2.3. Reactivació del cicle cel·lular com a inductora de la mort neuronal.....	30
2.3.1. Regulació del cicle cel·lular.....	31
2.3.2. Punts de control del cicle cel·lular i apoptosi neuronal.....	32
2.3.2.1. Punt de control G1/S.....	32
2.3.2.2. Fase S.....	34
2.3.2.3. Punt de control G2/M.....	34
2.3.3. Reactivació del cicle cel·lular en malalties neurològiques.....	34
2.3.4. Vies de senyalització relacionades amb el cicle cel·lular.....	36
2.3.4.1. ATM/p53.....	36
2.3.4.2. PI3K/Akt.....	38
2.3.4.3. GSK3.....	40
3. Barrera Hematoencefàlica.....	45
3.1. Estructura i funció de la BHE.....	46
3.1.1. Les unions estretes.....	46
3.1.1.1. Ocludina.....	47
3.1.1.2. Claudines.....	48
3.1.1.3. JAM.....	49
3.1.1.4. Proteïnes citoplasmàtiques accessòries.....	49
3.1.1.5. Actina.....	50
3.1.2. Unions adherents.....	51
3.1.3. Mecanismes de transport.....	51
3.1.3.1. Sistemes de transport específic.....	52
3.1.3.1.1. Transportador de glucosa de tipus 1.....	52
3.1.3.1.2. MCT1.....	53

3.1.3.1.3 Transportadors d'aminoàcids.....	53
3.1.3.1.4. Transportadors de vitamines.....	54
3.1.3.2. Sistemes de transport d'ions.	54
3.1.3.3. Sistemes de transport de reflux actiu.....	54
3.1.4. Barrera metabòlica.....	55
3.2. Unitat neurovascular.....	55
3.2.1. Perícits.....	56
3.2.2. Astròcits.....	57
3.2.3. Micròglia.....	57
3.2.4. Membrana basal.....	58
3.3. Òrgans circumventriculars i plexe coroide.....	58
3.4. Alteracions de la BHE en les malalties neurodegeneratives.....	60
3.5. La BHE en el model del 3-NPA.....	61
II. OBJECTIUS	63
III. RESULTATS	67
Article 1.....	69
Article 2.....	83
Article 3.....	97
Article 4.....	111
Article 5.....	129
Article 6.....	143
IV. DISCUSSIÓ.....	163
1. Reactivació del cicle cel·lular en el model del 3-NPA.....	165
2. Alteracions de la BHE en el model del 3-NPA.....	177
V. CONCLUSIONS	185
VI. BIBLIOGRAFIA.....	191

ÍNDIX DE FIGURES.

Figura 1	Mecanisme d'excitotoxicitat secundària o indirecta	7
Figura 2	Fórmules químiques del 3-NPA i de l'àcid succínic	12
Figura 3	Mecanisme d'inhibició de la succinat deshidrogenasa per part del 3-NPA	13
Figura 4	Mecanisme de neurotoxicitat del 3-NPA.....	14
Figura 5	Formes de mort que pot experimentar una cèl·lula	18
Figura 6	Vies d'activació de l'apoptosi en mamífers	19
Figura 7	Família de proteïnes Bcl-2	21
Figura 8	Família de les caspases.....	23
Figura 9	Estructura d'un PTP mitocondrial	28
Figura 10	Regulació de la concentració de Ca^{2+} , de la producció d'energia i de l'estrès oxidatiu a la mitocòndria	29
Figura 11	Esquema de la regulació del cicle cel·lular.....	32
Figura 12	Activació dels punts de control del cicle cel·lular per part de l'ATM.....	37
Figura 13	Via de senyalització responsable de l'activació de l'Akt.....	39
Figura 14	Alguns dels substrats de l'Akt i les seves funcions.....	40
Figura 15	Regulació de l'activitat de la GSK3 per fosforilació.....	42
Figura 16	Experiments de Goldman sobre l'existència de la BHE	45
Figura 17a	Esquema de les TJ interendotelials.....	47
Figura 17b	Esquema de les UA interendotelials.....	51
Figura 18	Esquema de la unitat neurovascular i les seves funcions.....	56
Figura 19	Marcatge de CDK4, CyE, CDK2 i E2F1 en el cos estriat de rates tractades amb 3-NPA	72
Figura 20	Marcatge doble de CDK4 amb NeuN i CyD en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	72
Figura 21	Expressió de CyD1 i E2F1 en mostres de cervells de pacients de la MH.....	73
Figura 22	Marcatge de caspasa-3 activa en neurones i astròcits de rates control i tractades amb 3-NPA.....	86
Figura 23	Marcatge de caspasa-3 activa, TUNEL i NeuN de l'àrea lesionada del cos estriat de rates tractades amb 3-NPA.....	87
Figura 24	Marcatge de NeuN, TUNEL i CDK4 d'una secció del cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	100

Figura 25	Marcatge de pRb i NeuN en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	101
Figura 26	Marcatge de Ki67 i NeuN en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	102
Figura 27	Marcatges representatius de phospho ^{Ser1981} -ATM, NeuN i GFAP a la vora de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA.....	114
Figura 28	Marcatges representatius de phospho ^{Ser15} -p53 i GFAP al centre i a la vora de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA.....	114
Figura 29	Marcatges representatius de phospho ^{Ser473} -Akt i NeuN en una porció del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA.....	115
Figura 30	Marcatges representatius de phospho ^{Ser9} -GSK3 β i NeuN en una porció del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA.....	116
Figura 31	Estudi d'extravasació de BE en una secció de l'encèfal de rates control i tractades amb 3-NPA.....	132
Figura 32	Marcatge d'EBA i laminina en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	133
Figura 33	Marcatge de ZO-1 en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	133
Figura 34	Patró d'expressió de la MMP-2 i la MMP-9 en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA.....	146
Figura 35	Estudi de l'activitat gelatinasa per zimografia <i>in situ</i> realitzat abans i després de l'immunomarcatge de MMP-9.....	147

ABREVIATURES.

3-NPA	<i>3-nitropropionic acid,</i> Àcid 3-nitropropioníc	CREB	<i>Cyclic AMP response element-binding protein</i>
ABC	Transportadors <i>ATP-binding cassette</i>	Cy	Ciclina
AF-6	Afadina	CypD	Ciclefilina D
AIF	<i>Apoptosis inducing factor,</i> Factor inductor de l'apoptosi	DED	<i>Death effector domain</i>
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropionat	DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with a low pI</i>
ANT	Adenina nucleòtid translocasa	DSB	<i>Double strand break,</i> Trencament doble de cadena
AP	Àrea postrema	EAAT	<i>Excitatory aminoacid transporter,</i> Transportador d'aminoàcids excitatoris
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>	EBA	<i>Endothelial barrier antigen,</i> Antigen endotelial de barrera
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>	EHPA	Eix hipotalàmic-pituitari-adrenal
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	EIM	Espai intermembrana de la mitocòndria
AVC	Accident vascular cerebral	ELA	Esclerosi lateral amiotròfica
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>	EM	Esclerosi múltiple
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer</i>	Endo G	Endonucleasa G
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>	FasL	<i>Fas ligand,</i> Lligand Fas
Bcl-X _L	<i>Bcl-2 related protein long isoform</i>	FOXO	<i>Forkhead box transcription factor</i>
BCSFB	<i>Blood-cerebrospinal fluid barrier</i>	GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
BE	Blau d'Evans	GLUT1	Transportador de glucosa de tipus 1
BH	Domini d'homologia Bcl-2	GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
BHE	Barrera hematoencefàlica	HIF-1	Factor induïble per hipòxia-1
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>	HSF1	<i>Heat shock factor-1</i>
Bim	<i>Bcl-2-like-11</i>	Htt	Huntingtina
BrdU	Bromdeoxiuridina	IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>	JAM	<i>Junctional adhesion molecules</i>
CCRM	Complex de la cadena respiratòria mitocondrial	LCR	Líquid cefaloraquidi
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase,</i> Quinasa dependent de ciclina	LIC	Líquid intersticial del cervell
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor,</i> Inhibidor de les quinases dependents de ciclins	MA	Malaltia d'Alzheimer
CECC	Cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
CP	<i>Choroid plexus,</i> Plexe coroide	MCP	Mort cel·lular programada
		MCT1	Transportador de monocarboxilats 1

ME	<i>Median eminence,</i> Eminència mitjana	PH	<i>Pleckstrin homology</i>
MEC	Matriu extracel·lular	PI	<i>Pineal gland, glàndula pineal</i>
MEM	Membrana externa de la mitocòndria	PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-quinase,</i> Fosfatidilinositol 3-quinasa
MH	Malaltia de Huntington	PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) P ₂
m-Htt	Huntingtina mutada	PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) P ₃
MIM	Membrana interna de la mitocòndria	PKA	Proteïna quinasa A
MMP	Metal·loproteïna de matriu	PKB	Proteïna quinasa B
MnSOD	Manganès superòxid dismutasa	PKC	Proteïna quinasa C
MP	Malaltia de Parkinson	pRb	Proteïna del retinoblastoma
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina	PTP	<i>Permeability transition pore,</i> Porus de permeabilitat transitòria
MUPP-1	Multiproteïna-PDZ-1	PUMA	<i>p53 upregulated modulator of</i> <i>apoptosis</i>
NEMG	Neurons espinoses mitjanes GABAèrgiques	ROS	<i>Reactive oxygen species,</i> espècies reactives d'oxigen
NeuN	<i>Neuronal nuclei antigen,</i> Antigen del nucli neuronal	Rtk	Receptor tirosina quinasa
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>	SCO	<i>Subcommissural organ,</i> Òrgan subcomissural
NLP	<i>Neural lobe of the pituitary gland,</i> Neurohipòfisi	SD	Sprague-Dawley
NMDA	N-metil-D-aspartat	SDH	Succinat deshidrogenasa
NMDAR	Receptor NMDA	SFO	<i>Subfornical organ,</i> Òrgan subfornical
NOS	Òxid nítric sintasa	Smac	<i>Second mitochondria-derived</i> <i>activator of caspase</i>
OCV	Òrgans circumventriculars	SNC	Sistema nerviós central
Omi/HtrA2	<i>Omi stress-regulated endoprotease</i> <i>/high temperature requirement</i> <i>protein A2</i>	tBid	Forma truncada del Bid
OVLT	<i>Organum vasculosum of lamina</i> <i>terminalis</i>	TJ	<i>Tight junctions,</i> Unions estretes
PAR-3	Proteïna de partició defectuosa-3	TNFα	<i>Tumour necrosis factor α,</i> Factor de necrosi tumoral α
PBS	<i>Phosphate buffered saline,</i> Solució amortidora de fosfats	TUNEL	<i>Terminal dUTP Nick End Labeling</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	UA	Unions adherents
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein</i> <i>kinase 1</i>	VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel,</i> Canal aniònic dependent de voltatge
P-gp	Glicoproteïna-P	ZO	<i>Zonula occludens</i>

I. INTRODUCCIÓ

La introducció ha estat dividida en tres grans apartats.

En el primer es fa referència a la malaltia de Huntington i al model experimental en rata d'aquesta malaltia basat en la intoxicació per àcid 3-nitropropioníc (3-NPA).

En el segon, s'exposen els mecanismes implicats en la mort neuronal, un dels aspectes que s'estudiaran en el present treball en el context de la intoxicació per 3-NPA.

En el tercer, es descriu la barrera hematoencefàlica en el context de la intoxicació per 3-NPA.

1. MALALTIA DE HUNTINGTON.

La malaltia de Huntington (MH), també anomenada corea de Huntington, és una malaltia neurodegenerativa hereditària autosòmica dominant que s'inicia normalment entre els 35 i 50 anys d'edat, i té una prevalença d'entre 3 i 10 casos per cada 100.000 individus a Europa Occidental i a Amèrica del Nord. La malaltia va progressant al llarg del temps, i porta inevitablement a la mort de qui la pateix entre 15 i 20 anys després de l'aparició dels primers símptomes (Gil i Rego, 2008). Originalment, la MH va ser descrita per George Huntington al segle XIX (Huntington, 2003, reproducció de l'article original), però no va ser fins el 1993 que un consorci organitzat per la *Hereditary Disease Foundation* va descobrir la mutació genètica que n'és la responsable. Aquesta mutació consisteix en una expansió inestable de la seqüència de nucleòtids CAG, que codifiquen per l'aminoàcid glutamina, d'un gen situat al cromosoma 4p16.3 que codifica una proteïna de 3136 aminoàcids amb pes molecular de 360 kDa que s'anomena huntingtina (Htt), la funció de la qual és desconeguda. En individus normals, aquesta proteïna conté una cadena d'entre 6 i 39 unitats de glutamina, mentre que en pacients afectats per la malaltia, el nombre d'unitats de la cadena oscil·la entre 36 i 180. Aquest solapament entre els dos intervals fa pensar que la patogènesi de la MH podria ser multifactorial, o bé que en determinades poblacions la seva penetrància és incompleta (Walling i col., 1998). El nombre de repeticions addicionals del triplet CAG no sembla que agreugi la severitat de la malaltia, i només quan el nombre d'unitats de glutamina és molt elevat sembla que s'avanci l'edat d'aparició de la simptomatologia (Squitieri i col., 2002).

1.1. Manifestacions clíniques.

Els primers símptomes que s'observen en els pacients de MH són subtils, i comprenen malaptesa, dificultats en la mobilitat ocular i moviments maldestres lleugerament incontrolats. Aquestes alteracions van evolucionant lentament, de manera que s'observa un augment progressiu dels moviments involuntaris de la musculatura proximal i distal (corea, discinèsia, distonia). A mida que la situació es va agreujant, els pacients perden la seva capacitat per moure's i a vegades per comunicar-se. Als estadis finals de la malaltia hi ha rigidesa i bradicinèsia, i la mort s'acostuma a produir per fallida cardíaca o per pneumònia per aspiració (Gil i Rego, 2008). Acompanyant a tota aquesta simptomatologia, la majoria dels pacients, encara que mantinguin la ingesta calòrica constant, experimenten una pèrdua de massa muscular i de pes (Kirkwood i col., 2001). Es pensa que les alteracions metabòliques a nivell sistèmic poden tenir a veure amb la MH, ja que s'ha trobat una correlació entre els nivells d'aminoàcids ramificats (valina, leucina, isoleucina), la pèrdua de

pes i la progressió de la malaltia (Mochel i col., 2007). També s'han trobat alteracions hormonals, com nivells elevats de corticosteroides o baixos de testosterona (Leblhuber i col., 1995; Markianos i col., 2005) i diabetis (Farrer, 1985). Finalment, les capacitats cognitives també es veuen severament alterades durant la progressió de la MH, fins que en estadis avançats els pacients mostren demència profunda, comportament maniacodepressiu, canvis de personalitat i en alguns casos tendència al suïcidi (Huntington, 2003).

1.2. Manifestacions neuropatològiques.

El principal signe patològic que s'observa a la MH és l'atròfia gradual de l'estructura cerebral anomenada neoestriat, que comprèn els nuclis caudat i putamen (Brouillet i col., 1999; Fan i Raymond, 2007). L'estudi del patró de degeneració d'aquesta estructura cerebral en teixit *post mortem* ha permès classificar els casos de MH en 5 graus diferents de severitat, que van del 0 al 4, i culminen, en el cas del grau 4, amb la pèrdua del 95 % de les neurones estriatals (Vonsattel i col., 1985). Paral·lelament, als graus 3 i 4 de la malaltia també es detecta degeneració d'altres estructures cerebrals com són l'escorça, el tàlem, els nuclis subtalàmics, la substància negra, la matèria blanca i el cerebel (Vonsattel i DiFiglia, 1998). Dins del neoestriat, les neurones espinoses mitjanes GABAèrgiques (NEMG), que suposen el 95 % de les neurones presents a l'estructura, són les que resulten bàsicament afectades, mentre que les interneurons mitjanes no espinoses (que contenen somatostatina, neuropèptid Y o NADPH-diaforasa), les interneurons colinèrgiques i les neurones GABAèrgiques (que contenen parvalbúmina) romanen relativament fora de perill (Glass i col., 2000). El putamen rep entrades dopaminèrgiques provinents de la substància negra i entrades glutamatèrgiques provinents de l'escorça i el tàlem, i projecta axons GABAèrgics inhibitoris cap a les parts interna i externa del globus pàl·lid i cap a la substància negra de nou. Les NEMG es poden dividir en dos tipus segons si projecten directament o indirecta cap a la part interna del globus pàl·lid i la substància negra reticulada. Les de projecció directa contenen els pèptids substància P i dinorfina i expressen el receptor de dopamina D1. Les de projecció indirecta expressen encefalina i el receptor dopaminèrgic D2, i projecten cap a la part externa del globus pàl·lid (Obeso i col., 2008). Donat que les NEMG tenen un efecte inhibitori, la seva degeneració seria la responsable de les alteracions en el funcionament del circuit motor, que es traduirien en la corea i la bradicinèsia; en el circuit associatiu, que es traduirien en moviments anormals dels ulls; i finalment en el circuit límbic, que serien les responsables de la simptomatologia afectiva (Joel, 2001).

La Htt està present de manera constitutiva a les cèl·lules neuronals i no neuronals de tot l'organisme. A nivell cerebral, la seva mutació provoca una pèrdua selectiva de neurones en determinades estructures i no en d'altres. El mecanisme que hi ha al darrere d'aquesta selectivitat roman desconegut. A les regions més afectades dels cervells dels pacients de MH, que són el neoestriat i l'escorça, s'observa una distribució intracel·lular alterada i una acumulació perinuclear de la Htt mutada (m-Htt), en forma d'inclusions intranuclears i agregats proteics en neurites distròfiques (DiFiglia i col., 1997; Sapp i col., 1999), els quals són elements comuns a altres malalties originades per les cadenes poliglutamíniques. Malgrat això, les neurones que contenen inclusions no són les més vulnerables i, de fet, s'observa que algunes de les neurones que no degeneren són les que contenen més quantitat d'agregats proteics (Kuemmerle i col., 1999).

1.3. Mecanismes implicats en la fisiopatologia de la MH.

Estudis fets mitjançant radiolligands en teixit cerebral de malalts afectats per la MH han mostrat una pèrdua desproporcionada dels receptors de N-metil-D-aspartat (NMDAR) a l'estriat de pacients amb risc de desenvolupar MH que presentaven simptomatologia primerenca o que, fins i tot, encara no mostraven símptomes. Aquest fet suggereix que les neurones amb elevada expressió de NMDAR són les que més aviat degeneren durant el curs de la malaltia, i ha donat peu a plantejar que l'excitotoxicitat, que és un procés que es relaciona amb l'activitat d'aquests receptors, pot jugar un paper important en el desenvolupament de la MH (Fan i Raymond, 2007).

Per altra banda, s'han detectat, tant en pacients afectats per la MH com en teixit cerebral *post mortem*, nombroses anormalitats a nivell de la funció mitocondrial i del metabolisme energètic que es pensa que poden actuar de manera sinèrgica amb el procés d'excitotoxicitat, contribuint així a la progressió de la malaltia (Brouillet i col., 1999; Gil i Rego, 2008; Sawa, 2001). Resulta interessant observar que, sumades a les observades al sistema nerviós central (SNC), els afectats per la MH presenten alteracions mitocondrials i del metabolisme energètic a nivell de teixits perifèrics (Fan i Raymond, 2007).

1.3.1. Excitotoxicitat.

El concepte "excitotoxicitat" s'associa a la mort cel·lular provocada per l'acció tòxica d'aminoàcids excitadors. Donat que el glutamat és el principal aminoàcid excitador del SNC

dels mamífers, es parla de mort neuronal per excitotoxicitat a la originada per l'exposició perllongada a aquest aminoàcid, fet que porta associat una entrada excessiva d'ions Na^+ i Ca^{2+} i d'aigua dins de les cèl·lules afectades. L'acumulació de Ca^{2+} resulta especialment tòxica per les neurones, ja que posa en marxa l'activació de diversos enzims com proteases, endonucleases i fosfolipases amb capacitat per degradar diferents components cel·lulars (Fan i Raymond, 2007). A la mitocòndria, l'elevada concentració de Ca^{2+} provoca una alteració de la producció d'ATP, fet que dificulta el funcionament dels mecanismes que regulen la concentració intracel·lular d'aquest ió, els quals són dependents d'energia. La disfunció mitocondrial, juntament amb l'activació dependent de Ca^{2+} d'enzims com la xantina oxidasa i l'òxid nítric sintasa (NOS) provoquen, a més a més, la generació de radicals lliures que contribueixen al dany cel·lular (Estrada Sánchez i col., 2008). L'elevació de la concentració de Ca^{2+} i de l'activitat de diferents enzims catabòlics pot activar una sèrie de processos que desemboquen en la mort neuronal per apoptosi o necrosi (Ndountse i Chan, 2009).

Els receptors postsinàptics que s'activen per la unió de glutamat poden ser de dos tipus: receptors metabotròpics acoblats a proteïnes G, els quals poden ser activadors o inhibidors, o bé receptors ionotròpics, els quals permeten l'entrada de cations a la neurona a través d'un porus que el receptor forma. A la vegada, aquests receptors ionotròpics es classifiquen en tres tipus principals en funció de quin és el seu agonista selectiu: N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionat (AMPA) i kaïnàt (Brouillet i col., 1999). L'activació dels receptors AMPA i kaïnàt indueix l'entrada de Na^+ i posterior despolarització de la membrana cel·lular. Això promou l'alliberació del canal iònic del NMDAR, per extrusió del Mg^{2+} que normalment el bloqueja, i la posterior entrada de Na^+ i Ca^{2+} quan el receptor esdevé plenament activat pel glutamat i pel co-agonista glicina (Estrada Sánchez i col., 2008). Es pensa que els NMDAR funcionals són estructures tetramèriques formades per dues subunitats NR1 i almenys dues unitats NR2. Les unitats NR2 poden ser codificades per quatre gens diferents, de manera que se'n troben de tipus A, B, C o D. En el cervell adult, a la part anterior, es troben principalment les de tipus A i B. Les diferents combinacions entre les subunitats NR1 i NR2A o NR2B porten a la formació de receptors que, tot i tenir propietats similars, presenten diferències a la seva distribució subcel·lular i resposta fisiològica (Fan i Raymond, 2007). Es creu que la resposta proapoptòtica mediada per l'activació dels NMDAR amb subunitats NR2B, en la que està implicada l'activació de caspases i la via intrínseca de l'apoptosi mitjançada per la mitocòndria (Fan i Raymond, 2007), podria ser contrarestada per mecanismes de supervivència cel·lular que es posarien en marxa a través de l'activació dels NMDAR del subtipus NR2A (Broughton i col., 2009).

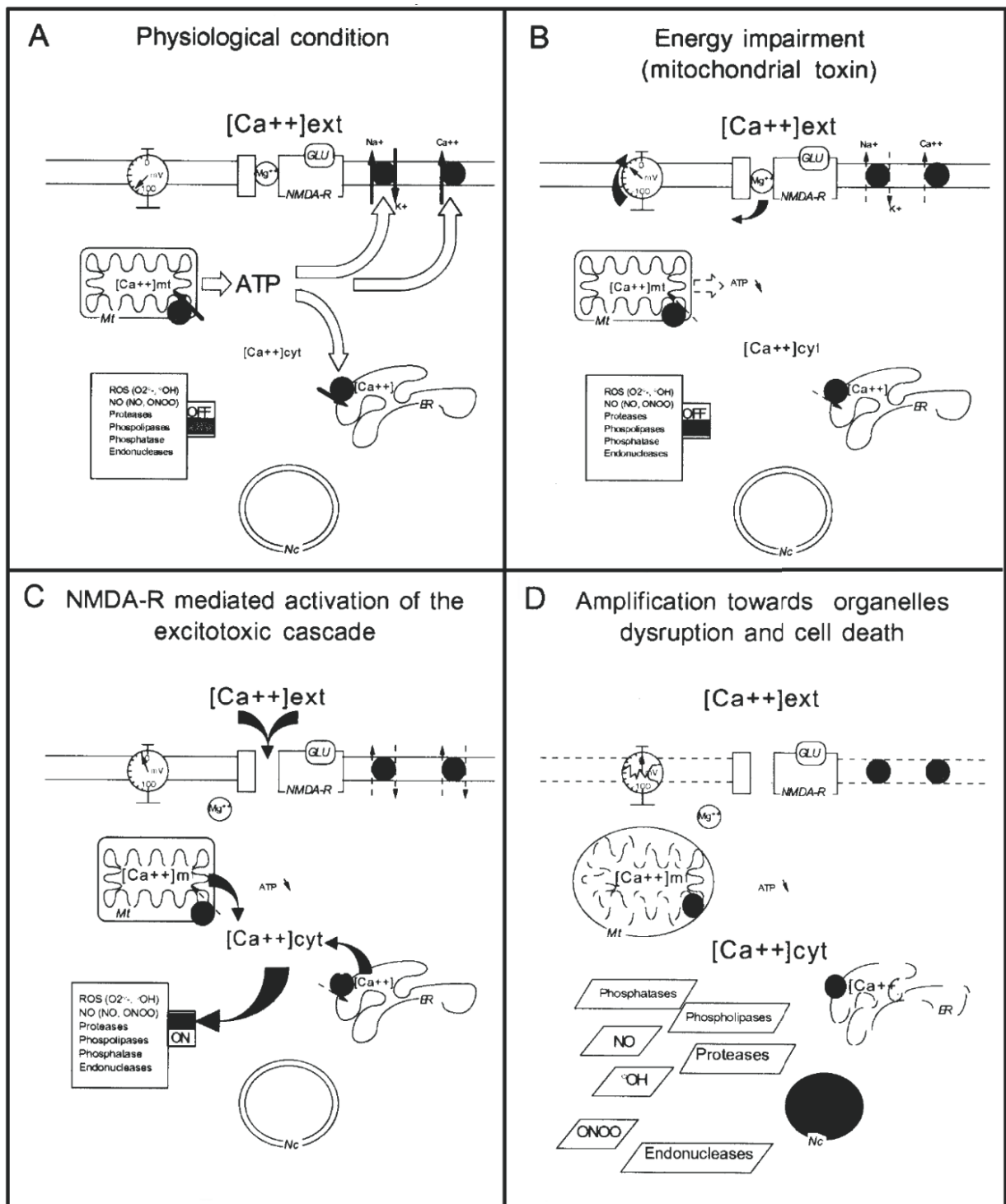


Figura 1. Mecanisme d'excitotoxicitat secundària o indirecta (Brouillet i col., 1999)

D'altra banda, s'entén per excitotoxicitat secundària o indirecta el procés de mort neuronal que es produeix quan hi ha una fallida del metabolisme energètic de la cèl·lula, situació en la qual el glutamat, a concentració fisiològica, pot activar els NMDAR (Figura 1). La producció insuficient d'ATP, lligada a deficiències de la glucòlisi o a la presència de toxines que afecten

la funció mitocondrial, fa que la membrana citoplasmàtica de la neurona perdi el seu potencial de repòs, el qual es manté per l'acció de les ATPases de Na^+/K^+ . La despolarització resultant fa que el Mg^{2+} que bloqueja el canal dels NMDAR es perdi, amb la qual cosa el glutamat ambiental els pot activar. D'aquesta manera, la resposta excitotòxica comentada anteriorment es posa en funcionament (Dong i col., 2009; Estrada Sánchez i col., 2008). En tots els casos, la mort neuronal deguda a l'excitotoxicitat secundària es pot prevenir amb antagonistes dels NMDAR com el MK801 o l'APV.

El mecanisme d'excitotoxicitat secundària s'ha estudiat àmpliament *in vivo* mitjançant l'administració directa al cos estriat de rates d'experimentació de toxines mitocondrials com l'amino-oxiacetat, la rotenona, el MPP^+ , el malonat, el Mn^{2+} o la 3-acetilpiridina (Brouillet i col., 1999). Com a resultat d'aquestes administracions, en tots els casos s'ha observat un augment de la formació de lactat, una disminució de l'ATP i la degeneració preferent de les NEMG (Parent i Hazrati, 1995). La neurodegeneració es podia evitar mitjançant l'administració prèvia d'antagonistes dels NMDAR o eliminant les aferències glutamatèrgiques. Tot i que no es podia descartar que algun altre mecanisme de mort cel·lular, per exemple l'apoptosi, estigués implicat a la neurodegeneració observada, es va concloure que la despolarització de la membrana, l'alliberació del Mg^{2+} dels NMDAR i l'augment posterior de la concentració de Ca^{2+} hi jugaven un paper determinant.

El cos estriat rep abundants aferències excitatives glutamatèrgiques provinents de l'escorça cerebral. Així, es pensa que si l'excitotoxicitat associada a glutamat juga un paper destacat a la MH, la degeneració selectiva de les neurones del cos estriat es podria explicar pel tipus de receptors que tinguin o per la quantitat d'aferències que rebin. En aquest sentit, s'ha vist que les interneurons estriatals, que resulten menys afectades per la malaltia, tenen menys entrades excitatives que les NEMG. Alhora, aquestes últimes tenen nivells molt més elevats de NMDAR de tipus NR2B amb elevada permeabilitat als ions Ca^{2+} , fet que les fa més sensibles al glutamat (Sieradzan i Mann, 2001). A més a més, estudis duts a terme en cervells obtinguts d'autòpsies de pacients de MH també semblen confirmar aquesta hipòtesi donat que, mitjançant la utilització de radiol·ligands, s'ha trobat una pèrdua elevada de NMDAR al seu cos estriat (Fan i Raymond, 2007). Altres estudis *in vitro* han mostrat que l'expressió simultània de la m-Htt i les subunitats NR1 i NR2B potencia la mort per excitotoxicitat (Zeron i col., 2001). La m-Htt també pot augmentar la sensibilització dels NMDAR (Sun i col., 2001; Song i col., 2003) i el flux d'ions específicament a través dels receptors NR1/NR2B (Chen i col., 1999).

1.3.2. Alteracions mitocondrials i del metabolisme energètic.

Pel que fa al metabolisme energètic, estudis realitzats en pacients de MH utilitzant PET i teixit *post mortem* han suggerit que la disfunció mitocondrial i les alteracions metabòliques juguen un paper destacat a la malaltia (Brouillet i col., 1999; Gil i Rego, 2008; Sawa, 2001). S'ha trobat un descens significatiu del consum de glucosa a l'escorça (lòbuls frontal i temporal) i al cos estriat (caudat i putamen) tant en pacients presimptomàtics com simptomàtics, i una reducció de l'activitat de l'aconitasa, enzim del cicle dels àcids tricarbòxílics que es pensa que és particularment sensible a la inhibició per radicals lliures com el peroxinitrit (ONOO^\cdot) i el superòxid (O_2^\cdot), fet que es podria interpretar com a indicador indirecte de la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS, *Reactive oxygen species*) associada a la disfunció mitocondrial i a l'excitotoxicitat. També s'ha detectat una disminució significativa de l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (CCRM) II i III del cos estriat, amb una reducció de l'oxidació de succinat que oscil·la entre el 39 % i el 59 %. A més a més, el CCRM IV també es veu afectat, tot i que més lleugerament, i hi ha resultats contradictoris pel que fa a l'activitat del CCRM I, tot i que en gran part dels estudis no s'ha trobat alterat. Finalment, altres troballes destacables són l'augment de la concentració de lactat a l'estriat i l'escorça, un augment de la relació lactat/piruvat al líquid cefaloraquídi (LCR), una disminució de la producció mitocondrial d'ATP i una disminució de la relació fosfocreatina/fosfat inorgànic al múscul esquelètic.

1.4. Models experimentals de la MH.

La investigació de nous mecanismes involucrats en la patogenicitat de la MH amb la finalitat de desenvolupar noves teràpies efectives passa per l'estudi de les alteracions funcionals produïdes per la mutació responsable de la malaltia. Els models transgènics es fan necessaris per determinar el mecanisme que hi ha al darrere de l'alteració funcional del CCRM II per part de la m-Htt, el qual roman desconegut, per aprofundir en el paper de la disfunció mitocondrial i per estudiar les interaccions particulars entre la m-Htt i les proteïnes del seu entorn, les quals podrien explicar la degeneració preferent del cos estriat observada a la malaltia (Oliveira, 2010). De models transgènics desenvolupats en rosegadors que expressen fragments N-terminals de Htt o Htt completa amb expansions patològiques de la cadena poliglutamínica n'hi ha diversos (Beal i Ferrante, 2004). A més a més, els models genètics han guanyat en versatilitat amb la utilització de vectors lentivírics, ja que aquests vectors permeten ampliar el rang d'espècies animals utilitzades i estudiar l'efecte de la

sobreexpressió o la manca de determinades proteïnes sobre la toxicitat de la m-Htt (deAlmeida i col., 2002).

Les alteracions fisiopatològiques i de comportament observades a la MH també es poden replicar mitjançant l'administració de diferents substàncies químiques com l'àcid quinolínic o l'àcid kaïníc (Fan i Raymond, 2007). Un altre model, basat en l'administració de la toxina àcid 3-nitropropioníc (3-NPA, *3-nitropropionic acid*), ha estat el més emprat per obtenir una reproducció a nivell fenotípic de la MH, malgrat que no comporta expressió de m-Htt. La utilització del 3-NPA permet replicar en animals d'experimentació el fenotip de determinades malalties neurodegeneratives que cursen amb degeneració dels nuclis caudat i putamen. En general, la neurodegeneració que s'observa després de la seva administració presenta uns trets similars als que s'observen a nivell clínic en patologies provocades per defectes genètics a nivell mitocondrial, alteracions del metabolisme energètic derivades de la ingesta de toxines, hipòxia perinatal i accident vascular cerebral (AVC) en adults, situacions en les quals el cos estriat es veu especialment afectat. De tota manera, el 3-NPA s'ha utilitzat bàsicament en el context de la MH ja que, tot i que no es pot considerar que tingui el seu origen en les alteracions mitocondrials, presenta un fenotip i unes alteracions moleculars que es poden reproduir en gran part amb l'administració de la toxina.

Alguns dels mecanismes implicats en la neurodegeneració estriatal induïda pel 3-NPA també juguen un paper a la toxicitat de la m-Htt. Entre aquests punts en comú hi ha l'afectació del CCRM II, que provoca la disminució del potencial de membrana mitocondrial, l'alteració de l'homeòstasi del Ca^{2+} , l'alliberació de proteïnes mitocondrials com el citocrom c al citoplasma cel·lular i l'eventual activació de caspases. En aquest sentit, s'ha vist que cèl·lules que expressen la m-Htt presenten alteracions al potencial de membrana i a l'homeòstasi del Ca^{2+} (Panov i col., 2002; Sawa i col., 1999), canvis de la immunoreactivitat del citocrom c i la caspasa-9 (Kiechle i col., 2002) i l'activació anormal d'altres caspases (Vis i col., 2005). L'alteració dels nivells de Ca^{2+} porta a l'activació d'enzims dependents d'aquesta catió com la NOS, amb el consegüent augment de la producció d'òxid nítric, i les calpaïnes, que poden degradar proteïnes implicades en vies de supervivència. Finalment, el 3-NPA també indueix un augment de les ROS. Cal destacar que tant l'augment de la producció de ROS (Tabrizi i col., 1999) com l'activació de calpaïnes (Gafni i Ellerby, 2002) s'han detectat en teixit *post mortem* d'afectats de la MH.

En definitiva, la utilització de models basats en l'administració del 3-NPA pot contribuir a assolir una millor comprensió dels processos cel·lulars que s'activen a la MH, i pot aportar noves hipòtesis de treball per als estudis que utilitzen models transgènics. Cal afegir que

aquests últims tenen un inconvenient que consisteix en el fet que, en contra del que passa a la MH, presenten una pèrdua de neurones molt limitada tot i mostrar una atròfia severa del cos estriat. En els models basats en vectors vírics s'observa una pèrdua neuronal progressiva, tot i que les lesions observades són petites i no van acompanyades de deficiències motrius (Brouillet i col., 2005). En canvi, els models basats en el 3-NPA sí que presenten una elevada pèrdua de neurones estriatals acompanyada d'alteracions motores i cognitives. La neurodegeneració observada en aquests models és relativament fàcil de caracteritzar, fet que ha de permetre desenvolupar de manera ràpida assaigs encaminats a avaluar l'eficàcia de nous agents terapèutics que puguin actuar sobre les alteracions derivades del dany mitocondrial.

1.4.1. Àcid 3-nitropropionic.

El 3-NPA és una toxina mitocondrial la ingesta de la qual provoca, en mamífers, una degeneració cerebral que afecta preferentment el cos estriat i que va acompanyada de manifestacions neurològiques severes. La toxina és un metabòlit derivat del 3-nitropropanol, substància que es troba de forma natural en plantes lleguminoses dels gèneres *Astragalus* o *Indigofera*, i en fongs del gènere *Arthrimum*. La identificació del 3-NPA com a agent tòxic es va fer a l'oest dels Estats Units, on es va veure que el bestiar que havia ingerit les lleguminoses anteriorment citades presentava diverses alteracions motores consistents en debilitat general, descoordinació de les seves extremitats posteriors i paràlisi. Més endavant, es va observar que les persones que havien ingerit canya de sucre contaminada amb l'esmentat fong desenvolupaven una encefalopatia aguda. Entre el 1970 i el 1989 es van registrar prop de 900 casos d'intoxicació per 3-NPA en humans. El 10 % dels afectats van morir, alguns es van recuperar completament i molts d'ells van patir un deteriorament neurològic persistent caracteritzat per distonia d'inici retardat, espasmes i ganyotes facials (Ludolph i col., 1991). Un estudi posterior d'intoxicació per ingesta de canya de sucre contaminada realitzat a la Xina va confirmar aquests resultats (He i col., 1995).

1.4.1.1. Neurotoxicitat del 3-NPA.

Els primers estudis controlats fets amb 3-NPA en animals (Gould i Gustine, 1982; Gould i col., 1985; Hamilton i Gould, 1987a, 1987b) van revelar la capacitat de la toxina per produir lesions cerebrals semblants a les observades en situacions d'hipòxia. Aquestes lesions eren fruit de la capacitat del 3-NPA per alterar la cadena respiratòria mitocondrial i, per tant, el

metabolisme energètic cel·lular, fet que portava a l'activació de fenòmens d'excitotoxicitat i d'estrès oxidatiu que en última instància desembocaven en la mort neuronal.

Diversos estudis *in vitro* han permès observar que el 3-NPA és un inhibidor irreversible de l'enzim del CCRM II succinat deshidrogenasa (SDH), que es troba a la membrana interna de la mitocòndria (MIM) i s'encarrega d'oxidar el succinat a fumarat. A més a més, també inhibeix el CCRM III. La SDH participa tant a la fosforilació oxidativa com al cicle dels àcids tricarbòxilics, de manera que la seva inhibició altera els dos processos i provoca, en última instància, un descens sever de la producció de fosfocreatina, ATP i GTP i un augment de la producció de lactat a partir de piruvat. El 3-NPA té una estructura química molt semblant a la de l'àcid succínic (Figura 2), el substrat de la SDH, fet que explicaria que pugui ocupar el centre catalític de l'enzim. Un cop allà, la flavina del centre catalític de la SDH oxida el carbanió de la forma dianiònica de la toxina, formant-se 3-nitroacrilat. Posteriorment, el 3-nitroacrilat forma un enllaç covalent amb un grup sulfhidril essencial per a l'activitat de l'enzim, de manera que aquest queda inhibit irreversiblement (Figura 3) (Alston i col., 1977; Coles i col., 1979).

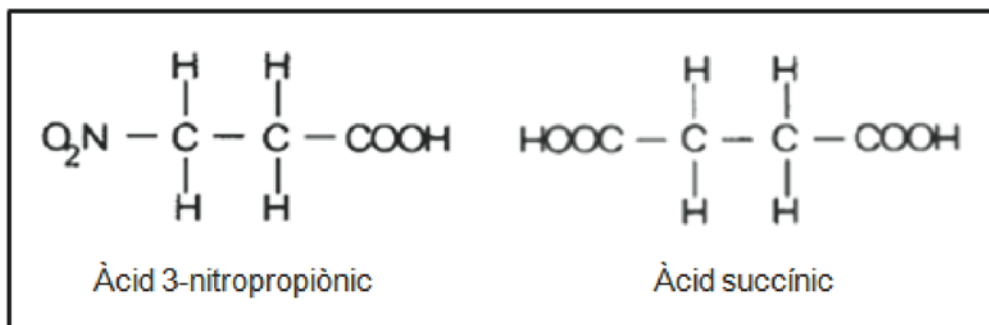


Figura 2. Fórmules químiques del 3-NPA i de l'àcid succínic.

A nivell *in vivo*, l'administració sistèmica de 3-NPA produeix una disminució marcada de l'activitat de la SDH als cervells de les rates o els ratolins tractats. La disminució de l'activitat de l'enzim es dona de manera homogènia a tot el cervell, però la mort neuronal i els efectes neurodegeneratius de la toxina es manifesten de manera preferent al cos estriat (Gould i col., 1985; Alexi i col., 1998). Es pensa que el cos estriat és inherentment sensible a les alteracions del metabolisme energètic. S'ha vist que resulta especialment afectat en presència de defectes genètics a nivell de mitocòndria, en casos d'ingesta de toxines mitocondrials i en situacions d'hipòxia perinatal o d'AVC en adults. Les NEMG contenen com a principal subtipus de NMDAR els NR1/NR2B, pel que es creu que la hipòtesi excitotòxica podria explicar l'especial sensibilitat del cos estriat pel 3-NPA (Vonsattel i DiFiglia, 1998;

Zeron i col., 2001). No obstant, el bloqueig dels NMDAR amb antagonistes selectius no evita completament la mort neuronal, fet que indica la coexistència de diversos mecanismes implicats (Pang i Geddes, 1997).

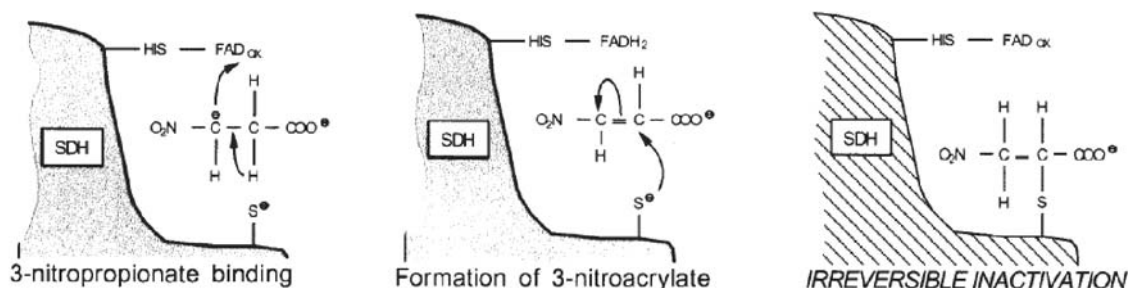


Figura 3. Mecanisme d'inhibició de la SDH per part del 3-NPA (Brouillet i col., 1999)

Diversos sistemes, tant a nivell de neurotransmissió extracel·lular com de vies de mort intracel·lular, intervenen en la neurodegeneració que l'administració de 3-NPA indueix de manera preferent al cos estriat dels animals tractats. A nivell extracel·lular, es pensa que diversos dels principals sistemes de neurotransmissió que es troben al cos estriat, és a dir, glutamat, dopamina, endocannabinoides i adenosina, hi poden estar implicats (Brouillet i col., 2005). Pel que fa al glutamat, no s'han trobat evidències que demostrin que l'administració de 3-NPA provoqui un augment de la seva alliberació. Malgrat això, la inhibició de l'alliberament de glutamat, sigui per l'eliminació de les projeccions que li arriben de l'escorça (Beal i col., 1993) o per l'administració de fàrmacs que actuen a les terminals corticoestrials, com el riluzole (Guyot i col., 1997), protegeix el cos estriat de l'acció del 3-NPA. Això fa pensar que el glutamat, a nivells fisiològics, potencia o com a mínim facilita la neurotoxicitat de la toxina *in vivo*. Aquesta toxicitat es manifesta de manera preferent a través dels NMDAR. S'ha vist que la inhibició severa de la SDH produeix una potenciació de la transmissió sinàptica a través d'aquests receptors a les NEMG (Calabresi i col., 2001) i, a més a més, s'ha comprovat que l'inhibidor MK801 protegeix de l'acció del 3-NPA *in vivo* (Kim i col., 2000). Diferents experiments realitzats en cultius cel·lulars i seccions cerebrals han posat de manifest que l'alteració de la concentració de Ca^{2+} citosòlic associada a mecanismes d'excitotoxicitat secundària jugaria un paper determinant en la neurotoxicitat induïda pel 3-NPA, ja que s'ha vist que la toxina produeix la reducció del potencial de la membrana plasmàtica, l'alliberació del Mg^{2+} dels NMDAR, la sobreactivació d'aquests receptors per part del glutamat fisiològic i l'alteració de l'aflluència de Ca^{2+} (Beal i col., 1993; Calabresi i col., 2001; Greene i col., 1998).

En un article recent s'ha estudiat, en cultius de neurones corticals sotmeses a un tractament amb 3-NPA, la relació entre la disminució de la producció d'energia, l'alteració de la dinàmica mitocondrial i la mort cel·lular (Liot i col., 2009). Inicialment, la toxina provocava una disminució immediata de la producció d'ATP que anava lligada a un augment lleuger de les ROS. Aquests fenòmens, però, no induïen la fragmentació de les mitocòndries ni la mort de les cèl·lules. Més endavant, a un temps variable que podia oscil·lar entre una i varies hores des del primer augment de les ROS, s'observava un segon augment d'aquestes que anava acompanyat d'una alteració severa de la morfologia mitocondrial. El segon augment de ROS (causat principalment per la formació del radical ONOO^- a partir del radical O_2^- i el NO produït per la NOS activada per Ca^{2+}), juntament amb la fragmentació mitocondrial i la mort neuronal final, eren en conjunt bloquejats per un antagonista dels NMDAR anomenat AP5, fet que posava de manifest el paper de l'excitotoxicitat secundària dins del mecanisme d'acció del 3-NPA. La Figura 4 recull un esquema dels processos de toxicitat activats pel 3-NPA.

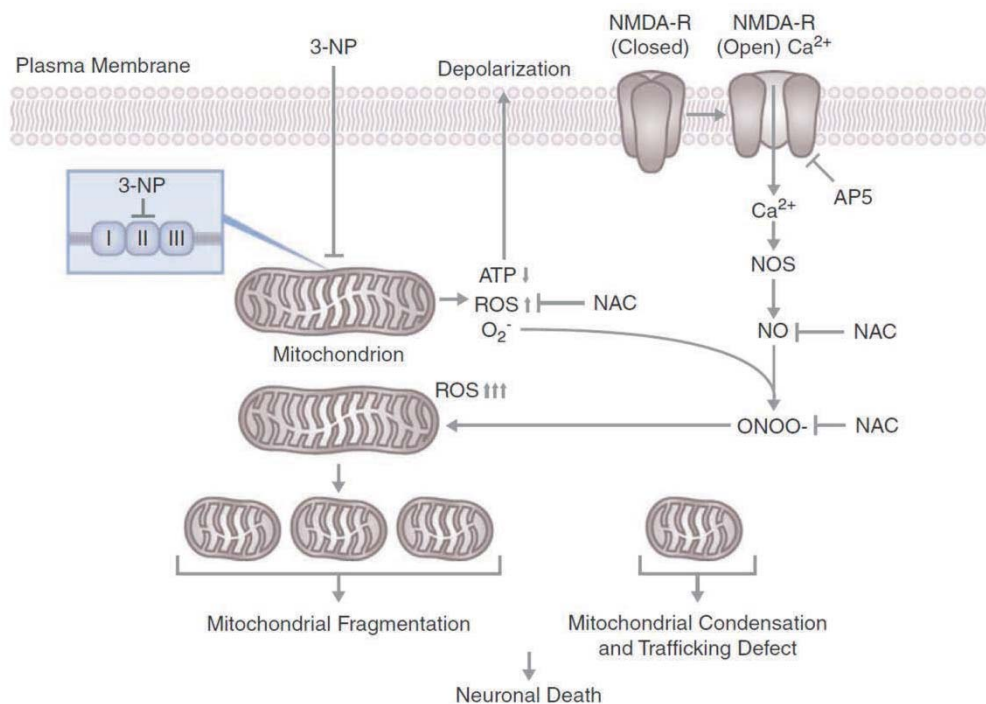


Figura 4. Mecanisme de neurotoxicitat del 3-NPA (Liot i col., 2009)

La posada en funcionament del mecanisme d'excitotoxicitat secundària activa tota una sèrie de processos que acaben desembocant en la mort de les neurones afectades. El tipus de cèl·lula, la severitat de les alteracions del metabolisme energètic i els possibles mecanismes de compensació que es posin en marxa determinaran el tipus de mort resultant, les

característiques de la qual es troben compreses dins d'un continu als extrems del qual hi ha la necrosi per una banda i l'apoptosi per l'altra (Nagley i col., 2010).

1.4.1.2. Animals i pautes d'administració.

A la bibliografia es poden trobar gran quantitat de treballs en els que s'han estudiat els efectes neurotòxics derivats de l'administració del 3-NPA. Els animals d'experimentació utilitzats en aquests treballs han estat bàsicament ratolins i rates, als quals se'ls ha administrat la toxina per diferents vies, principalment intraperitoneal, subcutània o estereotàxica, seguint pautes de dosificació diverses que s'han classificat en agudes, subagudes o cròniques. L'administració aguda o subaguda de la toxina per via intraperitoneal o subcutània provoca una elevació ràpida i transitòria de la inhibició de la cadena respiratòria mitocondrial. Donat que es pensa que les alteracions que s'observen en la MH i els models genètics relacionats es van acumulant de manera lenta i progressiva en el temps, s'ha suggerit que la infusió crònica de 3-NPA mitjançant bombes osmòtiques ofereix una aproximació més propera al que pot estar passant a la MH (Brouillet i col., 2005).

El conjunt de diferents models experimentals resultant ha posat de manifest que, a nivell *in vivo*, la toxicitat del 3-NPA varia àmpliament en funció de diversos factors que inclouen l'espècie animal, la soca, el sexe (els mascles són més sensibles) (Nishino i col., 1998), l'edat (els animals adults són més vulnerables que els joves) (Brouillet i col., 1993) i el mètode d'administració (l'administració de 3-NPA per via intraperitoneal o subcutània resulta més tòxica per a les rates que per als ratolins) (Brouillet i col., 2005). Dins de cadascuna de les espècies, també s'observen variacions segons quina sigui la soca utilitzada. En el cas de les rates, les soques més emprades han estat Fisher, Wistar, Sprague-Dawley (SD) i Lewis. La resposta de les diferents soques al 3-NPA es correlaciona amb el nivell d'activitat de l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (EHPA) i de l'alliberació de corticosteroides, mecanismes que regulen la resposta als estímuls estressants (Ouary i col., 2000). Les rates Fisher, les quals presenten una activitat elevada de l'EHPA que es tradueix en una elevada resposta a l'estrès, no resulten adequades per desenvolupar el model amb 3-NPA donat que, tot i exhibir una resposta homogènia, presenten una excessiva vulnerabilitat a la toxina, la qual cosa fa que sigui difícil controlar el dany produït pel tractament. En canvi, les rates Lewis presenten alteracions menors a l'activitat del seu EHPA, fet que fa que la seva resposta a l'estrès, i per tant la seva sensibilitat al 3-NPA, sigui més baixa. Aquest fet, sumat a la homogeneïtat de resposta que exhibeixen pel que fa a alteracions del comportament i lesions, les converteix en una soca molt adequada per a aquests estudis. Finalment, les soques SD i Wistar, les quals presenten una sensibilitat intermitja respecte a les dues

anteriors, també són adequades i àmpliament utilitzades per induir models de la MH mitjançant l'administració de 3-NPA (Brouillet i col., 2005; Ouary i col., 2000; Túnez i col., 2010).

2. MORT CEL·LULAR.

Les cèl·lules experimenten diverses formes de mort en funció de la natura i la severitat de l'agressió soferta. Un dels principals factors que marca el tipus de mort observat és la disponibilitat de reserves energètiques. Un dany cel·lular molt sever en el que la cèl·lula es queda sense ATP pot portar a la seva mort per necrosi desregulada, també anomenada accidental. En aquest cas, el seu citoplasma s'infla ràpidament degut a una entrada massiva d'aigua i ions i acaba experimentant un procés de lisi que pot produir una resposta inflamatòria per la qual morin cèl·lules veïnes, amb el que apareixeran lesions tissulars. Quan la severitat de l'insult és menor i la cèl·lula disposa d'un mínim remanent d'ATP, es posa en marxa un procés controlat que no dona lloc a resposta inflamatòria i que s'anomena mort cel·lular programada (MCP).

2.1. Mort cel·lular programada.

Fisiològicament, la MCP és un procés vital per als organismes pluricel·lulars, ja que és fonamental per al seu desenvolupament, la morfogènesi dels seus òrgans, l'homeòstasi dels seus teixits i l'eliminació de cèl·lules danyades o infectades per patògens. La MCP també s'activa en condicions patològiques en resposta a diferents senyals que acostumen a portar associades alteracions de la funció mitocondrial. Dins de la MCP s'han definit fins al moment tres vies de mort que es distingeixen a partir dels marcadors que expressen les cèl·lules que les pateixen (Figura 5). La MCP de tipus I, que correspon a l'apoptosi clàssica, és la primera que es va descriure i es caracteritza per l'activació de caspases a la seva etapa final. La MCP de tipus II o autofàgia es caracteritza per la formació de vesícules amb membrana doble que segresten diferents orgànuls o molècules i les transporten cap als lisosomes, on són degradats. Finalment, la MCP de tipus III o necrosi programada comparteix similituds amb la necrosi accidental, però es diferencia d'aquesta en el fet que es tracta d'un procés controlat que pot ser aturat. Sembla que aquestes vies de MCP poden progressar simultàniament i interactuar entre elles de manera complexa. S'ha vist que la progressió d'una via pot influenciar positivament o negativament la progressió de les altres. Això pot comportar que una població homogènia de neurones en cultiu desenvolupi un ventall heterogeni de respostes davant del mateix tractament. Així, la forma final de mort cel·lular que experimentin les neurones dependrà del grau d'activació de cadascuna de les vies de MCP, de manera que quedarà englobada dins de l'espectre de fenotips possibles a l'extrem del qual se situen l'apoptosi i la necrosi pures (Nagley i col., 2010).

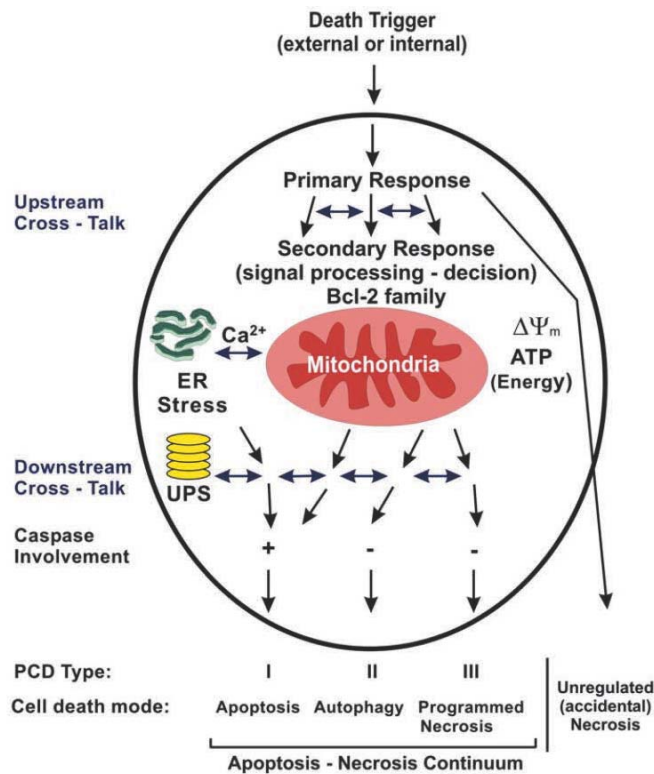


Figura 5. Formes de mort que pot experimentar una cèl·lula (Nagley i col., 2010)

2.1.1. Apoptosi clàssica (MCP tipus I).

L'apoptosi és un tipus de mort cel·lular que els organismes pluricel·lulars utilitzen per desfer-se de les cèl·lules no desitjades. Les cèl·lules que l'experimenten són desmantellades des de l'interior mitjançant un procés controlat que minimitza el dany de les cèl·lules veïnes, ja que les seves restes són finalment fagocitades per macròfags. A nivell morfològic, les cèl·lules apoptòtiques presenten una contracció respecte a les cèl·lules del seu voltant i una retracció respecte a la matriu extracel·lular (MEC) per degradació dels seus mecanismes d'adhesió, de manera similar al que passa durant la mitosi. Paral·lelament o immediatament després, la membrana plasmàtica experimenta un procés de formació de petits vacúols que s'anomenen cossos apoptòtics. Aquests cossos apoptòtics preserven la integritat de la membrana, de manera que el seu contingut no s'allibera a l'espai extracel·lular, i són digerits pels macròfags a l'estadi final del procés. Des del punt de vista intracel·lular, el més destacable que s'observa és la condensació del nucli i la seva fragmentació en petits trossos. Aquest esdeveniment només s'observa durant l'apoptosi, i es fa servir com a criteri d'identificació. Un altre tret característic és que l'ADN nuclear s'hidrolitza en nombrosos fragments de 200 parells de bases o de múltiples d'aquesta quantitat. Altres estructures citoplasmàtiques com el reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi

i la xarxa de mitocondries també pateixen fragmentació. Gran part dels canvis morfològics involucrats en el procés apoptòtic són conseqüència de l'activació d'uns enzims amb activitat proteasa anomenats caspases (*Cysteinyll aspartate-specific proteases*) (Kerr i col., 1972; Taylor i col., 2008).

En els mamífers s'han establert tres vies per les quals les caspases es poden activar, l'extrínseca, la intrínseca i la del granzim B (Figura 6). El resultat final de totes elles és l'activació de les principals caspases efectores, la 3, la 6 i la 7, les quals duen a terme gran part de la proteòlisi que s'observa a la fase final de l'apoptosi.

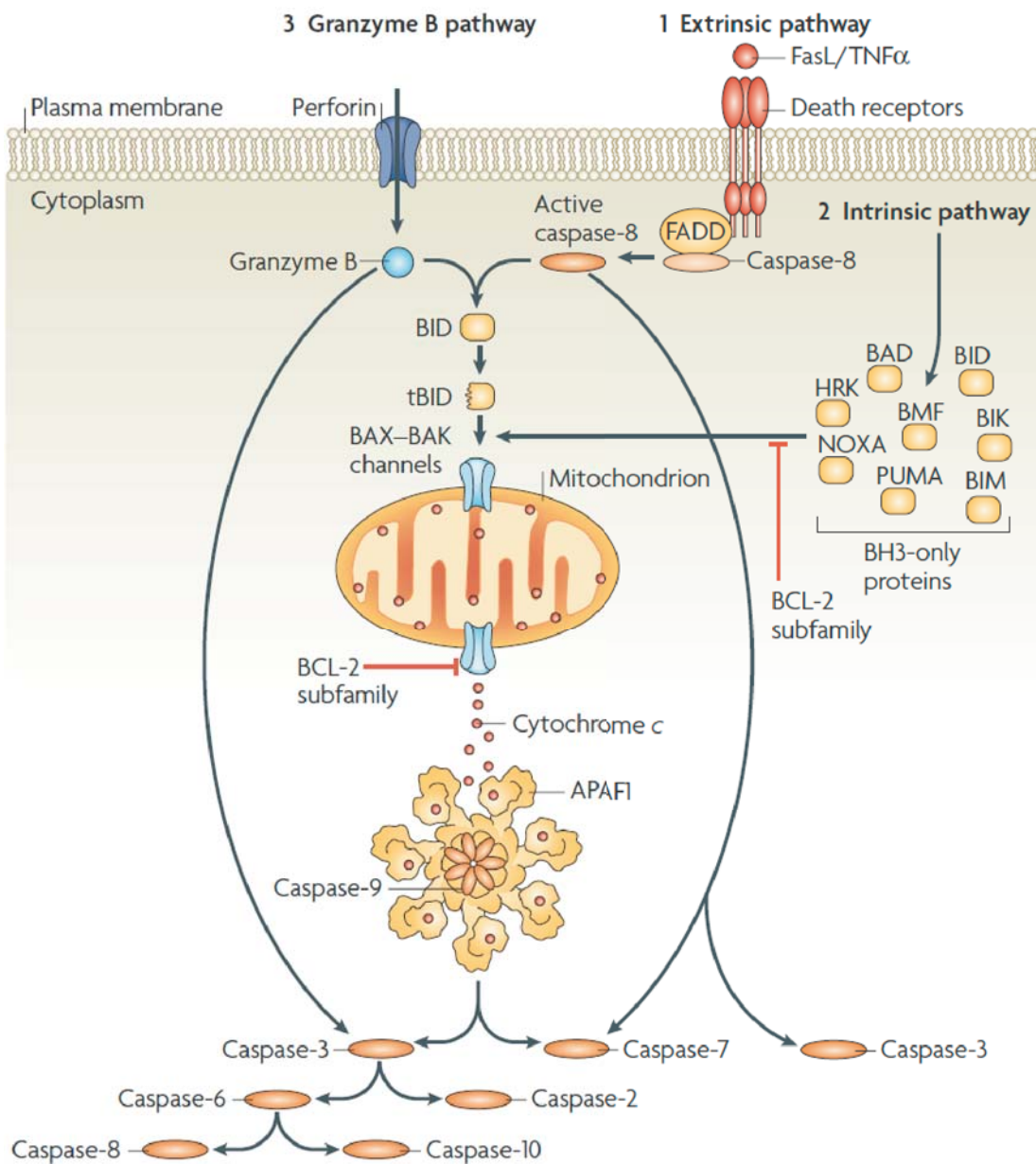


Figura 6. Vies d'activació de l'apoptosi en mamífers (Taylor i col., 2008)

2.1.1.1. Via extrínseca.

La via extrínseca s'activa per la unió de lligands extracel·lulars com el Lligand Fas (FasL, *Fas Ligand*) o el Factor de necrosi tumoral α ($\text{TNF}\alpha$, *Tumour necrosis factor α*), als receptors transmembrana de mort (*Death receptors*). Això provoca el reclutament de proteïnes adaptadores com la FADD (*Fas-associated death domain protein*) que promouen l'agregació de diverses molècules de caspasa-8 que seguidament s'autoactiven. A continuació, la caspasa-8 activa, mitjançant proteòlisi, activa les caspases 3 i 7, que promouen l'activació de noves caspases i s'encarreguen d'executar l'etapa final de l'apoptosi. En alguns casos, la via extrínseca pot induir l'activació de la intrínseca a través de la proteòlisi del Bid (*BH3-interacting domain death agonist*). La forma truncada del Bid (tBid) resultant pot promoure l'alliberació del citocrom *c* i la formació de l'apoptosoma, que inclou unes 7 unitats d'APAF-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*) i el mateix nombre d'homodímers de caspasa-9 i d'ATP/dATP. L'apoptosoma permet l'activació de la caspasa-9, la qual posa en marxa l'activació de noves caspases que en última instància culminaran el procés d'apoptosi (Taylor i col., 2008).

2.1.1.2. Via intrínseca.

La família de proteïnes Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*), que es caracteritzen per tenir d'un a quatre dominis d'homologia Bcl-2 (BH), juguen un paper determinant a la regulació de la via intrínseca. La família inclou proteïnes antiapoptòtiques amb dominis BH1234 com Bcl-2 o Bcl-X_L (*Bcl-2 related protein long isoform*), proapoptòtiques amb dominis BH123 com Bax (*Bcl-2-associated X protein*) o Bak (*Bcl-2 antagonist killer*) o proapoptòtiques amb únicament el domini BH3 com Bid o Bad (*Bcl-2 antagonist of cell death*) (Figura 7). En aquest cas, en una primera etapa hi ha una activació de les proteïnes amb un únic domini BH3 en resposta a diferents estímuls que produeixen estrès o dany cel·lular. Quan l'activació supera un determinat llindar, contraresta l'efecte inhibitor de l'apoptosi de les proteïnes antiapoptòtiques BH1234 i promou la formació de porus a la membrana externa de la mitocòndria (MEM) constituïts per oligòmers de Bax i Bak. Aquests porus permeten la sortida al citosol de la cèl·lula de diverses proteïnes entre les que hi ha el citocrom *c*, el qual promou la formació de l'apoptosoma i la consegüent activació de les caspases efectores (Taylor i col, 2008).

2.1.1.3. Via del granzim B.

El granzim B és una proteasa que és transportada cap a la cèl·lula diana mitjançant grànuls especialitzats que són alliberats pels limfòcits T citotòxics o les cèl·lules assassines naturals o *Natural Killer*. Aquests grànuls contenen, a més a més, una altra proteïna anomenada perforina, que forma un porus a la paret cel·lular que permet l'entrada del granzim B. Un cop al citoplasma, el granzim pot processar el Bid, la caspasa-3 i la 7 i iniciar així el procés apoptòtic (Taylor i col., 2008).

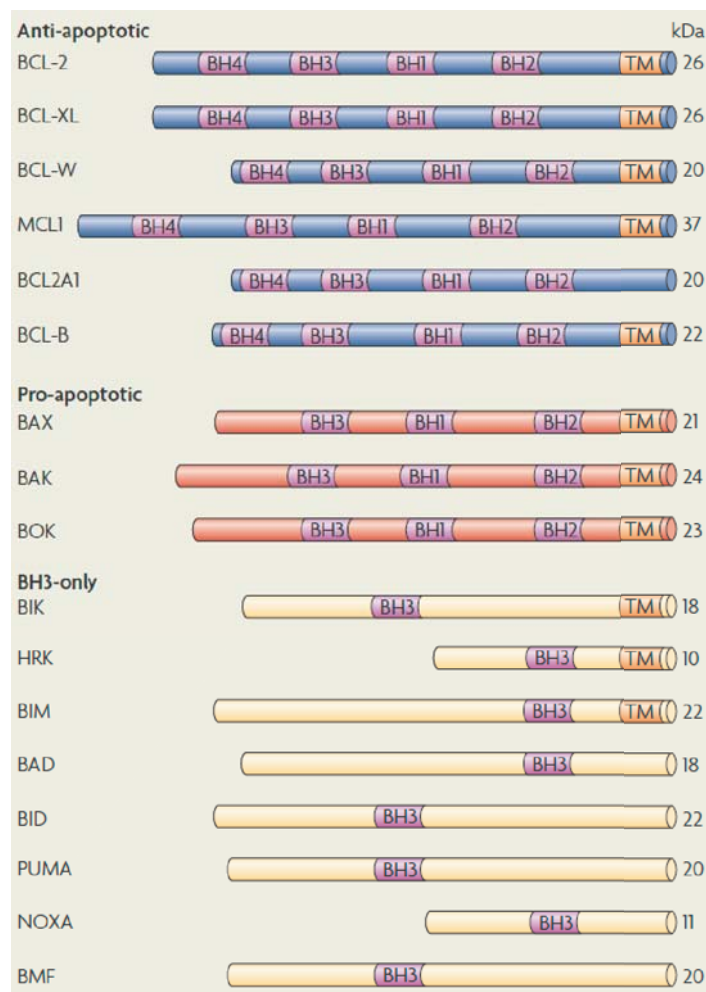


Figura 7. Família de proteïnes Bcl-2 (Taylor i col., 2008)

2.1.2. Autofàgia (MCP tipus II).

L'autofàgia és un procés que contribueix a mantenir l'homeòstasi cel·lular, ja que permet degradar components citoplasmàtics que ja no són útils. L'autofagosoma és una vesícula de doble membrana que segresta i engloba molècules i orgànuls citoplasmàtics prescindibles i

els transporta cap als lisosomes, on finalment són degradats. Tot i que s'ha vist que és un procés que augmenta en determinats casos de mort cel·lular, no es pot afirmar que sigui, per ella mateixa, un mecanisme de MCP, ja que encara no s'ha pogut demostrar que la inhibició de les proteïnes que intervenen a la regulació de l'autofàgia, com Beclin-1, Atg5 o Atg7, sigui capaç d'aturar la mort de la cèl·lula. Sí que s'ha vist que hi ha algunes proteïnes involucrades a l'apoptosi, com algunes de les Bcl-2, que poden activar l'autofàgia (Nagley i col.,2010).

2.1.3. Necrosi programada (MCP tipus III).

Com ja s'ha esmentat, la necrosi programada comparteix similituds amb la necrosi desregulada, i es diferencia d'aquesta en que es tracta d'un procés regulat que es pot aturar. Tot i que les alteracions de la permeabilitat de la membrana mitocondrial hi juguen un paper destacat, en aquest cas el procés és independent de l'acció de les caspases. En canvi, hi estan implicades la redistribució de l'endonucleasa G (Endo G) i del factor inductor de l'apoptosi (AIF, *Apoptosis inducing factor*) (Boujrad i col., 2007; Higgins i col., 2009). L'activació dependent de Ca^{2+} de calpaïnes també es troba sovint associada a la progressió de la necrosi programada (Golstein i Kroemer, 2007).

2.1.4. Molècules efectores de la MCP.

2.1.4.1. Caspases.

Les caspases són proteases altament específiques que tallen els seus substrats després de seqüències concretes de quatre aminoàcids que contenen àcid aspàrtic. La família es divideix en caspases iniciadores, les quals es poden autoactivar i activar posteriorment altres caspases, i executores, les quals són activades per les iniciadores i són les responsables de la degradació dels substrats al final de l'apoptosi. Totes aquestes proteases estan formades per una subunitat gran i una de petita, i algunes d'elles presenten propèptids (Figura 8). S'han identificat dos propèptids estructuralment relacionats, el CARD (*Caspase recruitment domain*) i el DED (*Death effector domain*), que tenen la funció de facilitar la interacció amb d'altres proteïnes. Les caspases se sintetitzen en forma de zimògens, i la seva activació es produeix per processament proteolític entre la subunitat gran i la petita, de manera que es forma un heterodímer amb el centre catalític actiu. La unió de dos heterodímers dona la forma final activa de la proteasa, que disposa, per tant, de dos centres catalítics actius. No

totes les caspases participen a l'apoptosi, sinó que algunes d'elles, com les 1, 4, 5 i 12, són activades durant les respostes immunitàries i estan involucrades en la regulació del processament de citoquines inflamatòries (Danial i Korsmeyer, 2004; Taylor i col., 2008).

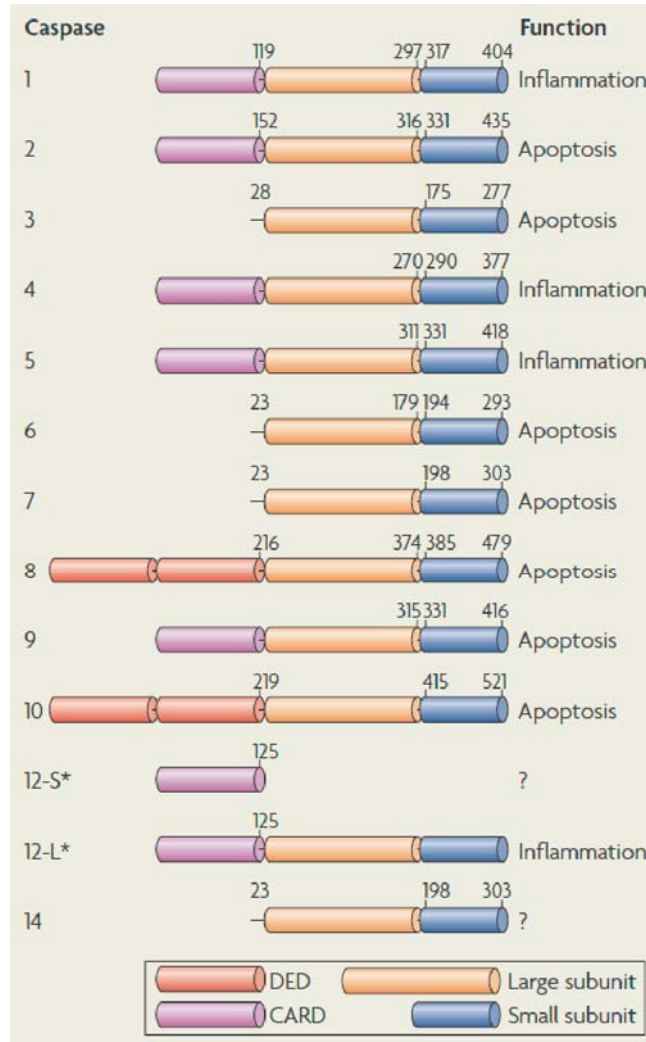


Figura 8. Família de les caspases (Taylor i col., 2008)

2.1.4.2. AIF i Endo G.

L'AIF és un enzim mitocondrial de 62 kDa amb capacitat per oxidar NAD(P)H *in vitro* i induir l'apoptosi. En condicions fisiològiques es troba a l'espai intermembrana de la mitocòndria (EIM), on pot estar en forma de monòmer soluble o ancorat a la MIM, i participa a l'eliminació de ROS i al manteniment del CCRM I (Loeffler i col., 2001). En cultius neuronals, estímuls apoptòtics com l'estrès oxidatiu, el dany de l'ADN o l'increment de Ca^{2+} intracel·lular provoquen la sortida de l'AIF de la mitocòndria i la seva translocació al nucli, on indueix la condensació de la cromatina i la fragmentació de l'ADN en fragments superiors als

50 kpb, ostensiblement més grans que els observats a l'apoptosi clàssica (Susin i col., 1999). La sortida de l'AIF de la mitocòndria requereix de la permeabilització de la MEM i de la maduració proteolítica de l'enzim, de manera que es pugui alliberar del seu ancoratge a la MIM. El procés d'alliberació de l'AIF de la MIM pot estar mediat per calpaïnes i catepsines (Modjtahedi i col., 2006). Alguns treballs han mostrat que l'alliberació de l'AIF de la mitocòndria és un procés que no requereix de l'activació de caspases (Yu i col., 2002), mentre que en d'altres s'ha vist que l'alliberació és posterior a la sortida del citocrom c i a l'activació de caspases (Arnoult i col., 2003). Així es pensa que, en certs paradigmes, l'AIF pot actuar com a resposta addicional per facilitar l'apoptosi dependent de caspases, mentre que en d'altres la pot provocar independentment d'aquestes (Cregan i col., 2004).

Tot i participar en la fragmentació de l'ADN, l'AIF no pot trencar-lo per ell mateix, sinó que el procés requereix de la participació d'alguna endonucleasa (Susin i col., 1999). Una possible candidata és l'Endo G, la qual es troba a la mitocòndria en condicions fisiològiques i passa al nucli durant l'apoptosi, on fragmenta l'ADN de manera independent de caspases. En estudis d'interacció s'ha determinat que aquestes dues proteïnes interactuen en *Caenorhabditis elegans*, però no en mamífers, de manera que cal pensar que en el procés de fragmentació de l'ADN induït per l'AIF hi intervé alguna altra nucleasa. Així doncs, tant l'AIF com l'Endo G poden promoure la fragmentació de l'ADN de manera independent entre elles i a la vegada independentment de les caspases (Li i col., 2001).

2.1.4.3. Smac/DIABLO i Omi/HtrA2.

La proteïna Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*), similar al seu homòleg murí DIABLO (*Direct IAP binding protein with a low pI*), és una proteïna que es troba a l'EIM i té capacitat per neutralitzar els inhibidors endògens de l'apoptosi anomenats IAP (*Inhibitor of apoptosis protein*). La funció de la proteïna a la mitocòndria és desconeguda, ja que s'ha vist que els ratolins DIABLO *KO* no presenten alteracions fenotípiques i que les seves cèl·lules responen normalment als estímuls apoptòtics. Per altra banda, l'Omi/HtrA2 (*Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2*) és una proteasa que es troba a l'EIM que, un cop alliberada al citosol, té capacitat per promoure l'apoptosi antagonitzant els IAP o a través de la seva activitat proteolítica. El *KO* d'Omi/HtrA2 tampoc sembla que presenti un augment de la resistència cel·lular a la mort per apoptosi, pel que actualment no hi ha evidència que les dues proteïnes hi contribueixin *in vivo* (Kroemer i col., 2007).

2.1.4.4. Catepsines.

Les catepsines són enzims amb baixa especificitat de substrat que en condicions normals estan als lisosomes, però que en resposta a diferents senyals es poden alliberar al citosol on poden participar als processos de mort cel·lular. Aquests enzims se sintetitzen com a zimògens que són dirigits cap als lisosomes, on es processen i activen. Existeixen tres tipus de catepsines segons el seu residu catalític sigui de cisteïna (catepsines B, C, H i L entre d'altres), de serina (catepsines A i G) o d'aspartat (catepsines D i E) (Chwieralski i col., 2006). Durant molt temps s'ha pensat que els lisosomes participaven principalment a l'autofàgia i a la necrosi, i que el seu paper a l'apoptosi es reduïa a la digestió dels cossos apoptòtics. Actualment es pensa que també intervien de diverses maneres a les vies de senyalització que regulen l'apoptosi, essent una de les seves possibles accions l'activació de proteïnes proapoptòtiques de la família Bcl-2, com la Bax (Guicciardi i col., 2004). A més a més, es pensa que el grau de permeabilització de la membrana dels lisosomes, que determina la quantitat de catepsines que arribaran al citosol, és el factor que determina el predomini de l'apoptosi o la necrosi com a forma de mort cel·lular (Li i col., 2000b). S'han descrit diferents mecanismes que condueixen a la permeabilització controlada i selectiva dels lisosomes. Un d'ells relaciona l'alliberació del contingut lisosomal amb la producció de ROS, procés que s'aniria retroalimentant perquè s'ha vist que els enzims lisosomals promouen la generació de noves ROS mitocondrials (Zhao i col., 2003). La translocació de membres proapoptòtics de la família de les Bcl-2 a la membrana lisosomal i la consegüent formació de porus pot ser un dels altres mecanismes implicats a la permeabilització dels lisosomes (Zhao i col., 2001).

2.1.4.5. Calpaïnes.

Les calpaïnes són unes proteases de cisteïna que es troben al citoplasma cel·lular en forma de proenzims inactius que s'activen per Ca^{2+} . En els mamífers, les dues isoformes predominants d'aquests enzims són la μ -calpaïna i la m-calpaïna, que actuen sobre els mateixos substrats i es diferencien en la concentració de Ca^{2+} a la que s'activen, baixa (μM) o alta (mM), respectivament. Les dues isoformes són heterodímers que consten d'una subunitat de 80 kDa i una de 29 kDa. La forma activa d'aquests heterodímers s'obté per autocatàlisi dels proenzims i consta d'una subunitat gran de 78 kDa, que és la que té l'activitat proteasa i uneix el Ca^{2+} , i una petita de 18 kDa amb capacitat per interaccionar amb les membranes (Wang, 2000).

En un principi es pensava que les calpaïnes només intervenien a la necrosi, però posteriorment s'ha comprovat que també participen a l'apoptosi. La participació de les calpaïnes en aquesta última es va descobrir arran d'estudiar l'expressió de l' α -espectrina, que és una proteïna del citoesquelet que és substrat tant de caspases com de calpaïnes, amb la particularitat que dóna fragments diferents en funció de la proteasa que la hidrolitza. Això va permetre veure que durant l'apoptosi s'activaven les dues proteases a la vegada. Més endavant s'ha vist que caspases i calpaïnes comparteixen altres substrats (Wang, 2000). A més a més, les calpaïnes poden induir l'alliberament de catèpsines (Yamashima i col., 1998) i la mort cel·lular independent de caspases (Mathiasen i col., 2002).

2.1.5. Desencadenants de la MCP en neurones.

Hi ha diversos senyals que poden iniciar la MCP en neurones. Un dels més ben estudiats és la manca de factors tròfics, que pot desencadenar la MCP durant el desenvolupament del sistema nerviós i possiblement durant els trastorns neurodegeneratius (Double i col., 2010). A més a més, tant el fenomen d'excitotoxicitat deguda a la sobreactivació dels receptors de glutamat, els quals estan presents a la majoria de neurones del SNC, com el d'excitotoxicitat secundària lligada a alteracions del metabolisme energètic provoquen, en última instància, la producció de ROS, les quals poden induir el dany de diferents components neuronals com els lípids, les proteïnes i els àcids nucleics cel·lulars i, en últim terme, l'activació de la MCP. L'estrès metabòlic resultant de la reducció significativa dels nivells de glucosa, oxigen i d'altres molècules implicades en el metabolisme energètic, i que s'observa, per exemple, després de l'apoplexia o durant l'envelliment, també pot iniciar la MCP (Beal, 1995). Finalment, es pensa que l'activació de la MCP pot estar lligada a determinats factors genètics i ambientals (Nagley i col., 2010).

2.2. Mitocòndria i MCP.

La mitocòndria és un orgànul citoplasmàtic que controla diferents funcions bàsiques per a la supervivència de la cèl·lula, com són la producció d'energia en forma d'ATP i la regulació dels nivells de Ca^{2+} i de ROS (Mattson i col., 2008). A més a més, està ben establert que aquest orgànul juga un paper crucial en el control de la MCP, donat que és un punt on convergeixen diferents vies intracel·lulars de senyalització de mort. A les cèl·lules sanes, la MIM, que separa l'EIM de la matriu mitocondrial, és pràcticament impermeable als ions. Això permet als CCRM I-IV construir un gradient de protons necessari per la producció d'ATP al

CCRM V. D'aquesta manera, el manteniment del potencial de transmembrana de la MIM associat al gradient de protons resulta de vital importància per a la bioenergètica cel·lular, i la seva dissipació es relaciona amb la mort cel·lular. La permeabilitat de la MEM també està altament regulada per diferents proteïnes i canals aniònics dependents de voltatge, i s'ha vist que en la MCP sovint està augmentada. L'augment de la permeabilitat de la MEM és un fenomen regulat que facilita l'alliberament de proteïnes amb capacitat per induir la MCP que normalment estan retingudes a l'EIM, entre les que hi ha el citocrom *c*, Smac/DIABLO, AIF i Endo G, anteriorment citades (Kroemer i col., 2007).

2.2.1. Mecanismes de permeabilització de la MEM.

Un mecanisme involucrat a la permeabilització de la MEM està relacionat amb les proteïnes de la família Bcl-2. A les cèl·lules sanes, la Bak es troba associada a la MEM, mentre que la Bax es troba al citosol. Quan s'indueix l'apoptosi, la Bax s'insereix a la MEM, i allí pot originar, o bé per ella mateixa o bé associant-se a la Bak o a la tBid, obertures supramoleculares en forma de porus o desestabilitzacions de la membrana per les quals poden sortir al citosol les proteïnes proapoptòtiques presents a l'EIM, com el citocrom *c*. Les proteïnes proapoptòtiques amb domini BH3 poden actuar com a facilitadores del procés inhibint l'acció de les BH1234, en el cas de la Bad, o com activadores directes de les BH123, en el cas de la tBid (Kroemer i col., 2007).

Un altre mecanisme de permeabilització de la MEM té a veure amb el canal aniònic dependent de voltatge (VDAC, *Voltage-dependent anion channel*). Aquesta proteïna és la més abundant de les presents a la MEM, on funciona com a sedàs molecular, ja que deixa passar de manera regulada molècules de fins a 5 kDa aproximadament. Hi ha dos models que intenten explicar el paper de VDAC en les alteracions de la permeabilitat mitocondrial. Per una banda, sembla que en condicions apoptòtiques Bak i Bax acceleren l'obertura de VDAC de manera que es perd el potencial transmembrana i s'allibera el citocrom *c* (Shimizu i col., 1999; Tsujimoto i Shimizu, 2000). D'altra banda, s'ha suggerit que la inducció de l'apoptosi pot tancar els VDAC, fet que provoca una hiperpolarització transitòria de la mitocòndria i un trencament de la MEM per xoc osmòtic (Vander Heiden i col., 1999).

2.2.2. Mecanismes de permeabilització de la MIM.

Diverses observacions posen de manifest el paper que juga l'augment de la permeabilitat de la MIM en situacions d'apoptosi. Mitjançant estudis cinètics s'ha vist que la permeabilització de la MIM pot ser prèvia a l'activació de les Bax, Bak i Bid. També s'ha vist que algunes proteïnes antiapoptòtiques produeixen els seus efectes interaccionant amb proteïnes de la MIM i que alguns senyals de mort cel·lular requereixen la seva participació. S'ha comprovat també que alguns inhibidors de proteïnes de la MIM poden inhibir la mort cel·lular en alguns casos (Kroemer i col., 2007). Actualment, el principal mecanisme responsable de la permeabilització de la MIM que es coneix és la formació del porus de permeabilitat transitòria (PTP, *Permeability transition pore*). L'obertura d'aquest canal d'alta conductància i dependent de voltatge es produeix a les zones de contacte de la MIM i la MEM i provoca un augment sobtat de la permeabilitat a soluts de fins a 1,5 kDa. Es creu que el PTP és un complex format per diferents proteïnes, essent la VDAC, l'adenina nucleòtid translocasa (ANT) i la ciclofilina D (CypD) les que formen la seva estructura bàsica (Figura 9). L'obertura del PTP pot ser desencadenada per diferents estímuls com el Ca^{2+} , les ROS, la disminució de la concentració d'adenina, els fosfats inorgànics o els canvis de pH. Com a resultat d'això, hi ha una dissipació del potencial de transmembrana i un inflament de la matriu mitocondrial degut a la pressió osmòtica que provoca la disrupció de la MEM. L'obertura del PTP pot ser regulada pels membres de la família Bcl-2: per una banda, les proteïnes antiapoptòtiques la prevenen, i per l'altra, les apoptòtiques com la Bax la poden provocar (Crompton, 1999; Brenner i Grimm, 2006).

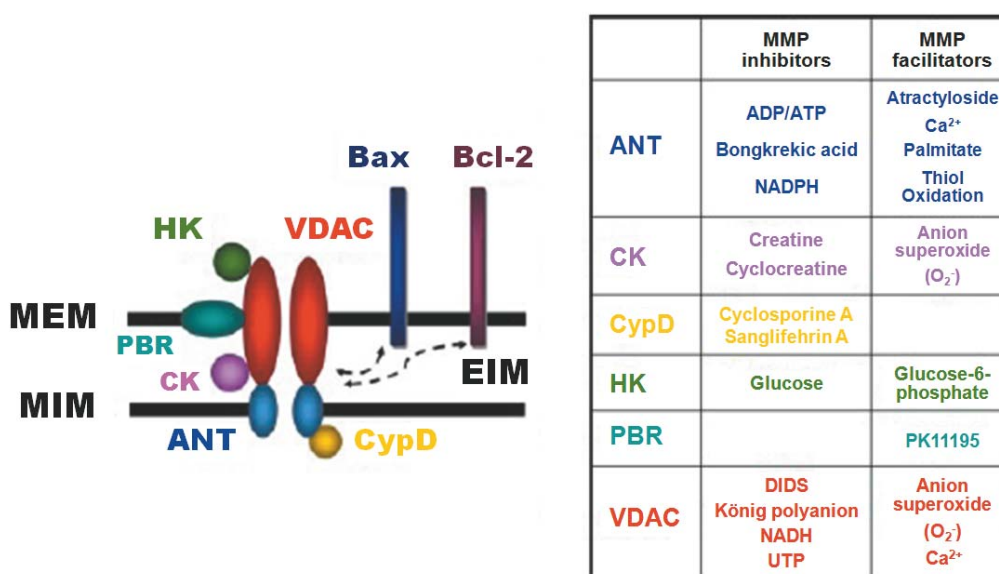


Figura 9. Estructura d'un PTP mitocondrial (Modificat de Kroemer i col., 2007)

2.2.3. Paper de la mitocòndria en l'homeòstasi del Ca^{2+} .

La mitocòndria juga un paper important a la regulació de la concentració citoplasmàtica de Ca^{2+} gràcies a la capacitat que té per acumular-lo a la seva matriu, i participa a diverses vies de senyalització que depenen d'aquest ió, entre elles les vies apoptòtiques. La MEM és relativament permeable al Ca^{2+} , mentre que la MIM conté proteïnes determinants per a la seva regulació com són un uniportador que transfereix Ca^{2+} a l'interior de la matriu mitocondrial i dos antiportadors $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ i $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ que expulsen Ca^{2+} fora de la mitocòndria. Així, els gradients dels tres ions influeixen sobre el flux de Ca^{2+} a través de les membranes mitocondrials (Giacomello i col, 2007). La Figura 10 recull un esquema de les proteïnes mitocondrials involucrades a la regulació del Ca^{2+} .

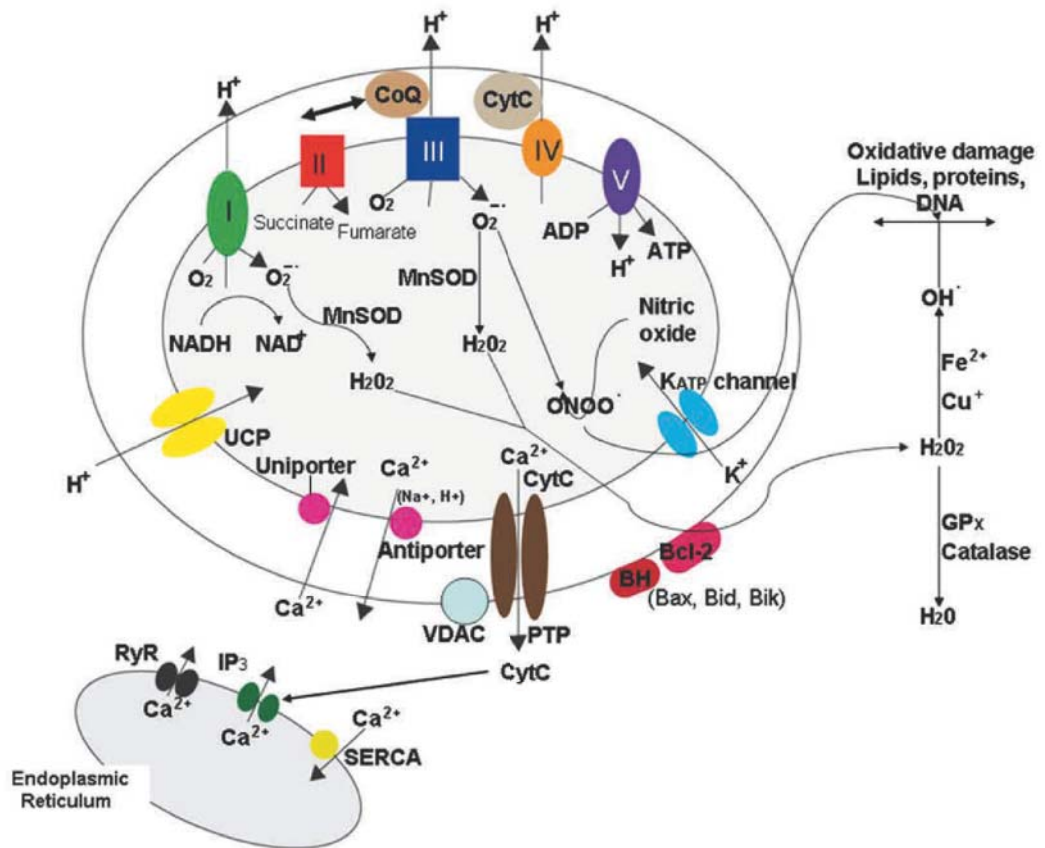


Figura 10. Regulació de la concentració de Ca^{2+} , de la producció d'energia i de l'estrès oxidatiu a la mitocòndria (Mattson i col., 2008)

2.2.4. Producció d'energia i generació d'estrès oxidatiu a la mitocondria.

Dins de la cèl·lula, la funció principal de la mitocondria és la de produir energia en forma d'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa. La maquinària molecular per a la producció d'energia, la cadena de transport d'electrons, es troba a la MIM i consta de cinc CCRM (Figura 10). Els CCRM I, III i IV bombegen protons cap a l'espai intermembrana per tal de generar el gradient necessari perquè el CCRM V pugui sintetitzar l'ATP. Durant aquest procés, l'O₂ es converteix en aigua i es generen ROS com el O₂⁻, principalment per part dels CCRM I i III. Gran part d'aquest O₂⁻ és convertit en peròxid d'hidrogen per part de la manganès superòxid dismutasa (MnSOD), que posteriorment és convertit en aigua per la glutatió peroxidasa o la catalasa. De tota manera, l'O₂⁻ que no hagi estat degradat pot generar radicals hidroxil molt reactius que poden oxidar lípids, proteïnes i ADN. L'O₂⁻ també pot reaccionar amb l'òxid nítric per produir ONOO⁻, molècula que pot reaccionar amb els residus de tirosina de les proteïnes alterant la seva funció. Les ROS també són produïdes per les monoamino-oxidases mitocondrials, que estan involucrades en el metabolisme de la serotonina, la norepinefrina i la dopamina. Per protegir-se de les ROS, la mitocondria disposa de diferents molècules antioxidants entre les que hi ha el coenzim Q₁₀ o ubiquinona, la creatina o la nicotinamida (Mattson i col., 2008). Apart de la seva capacitat per alterar els components cel·lulars, l'O₂⁻ i el peròxid d'hidrogen desenvolupen importants funcions com a senyalitzadors en processos fisiològics com la plasticitat sinàptica, l'aprenentatge i la memòria (Kishida i Kwaan, 2007).

Les neurones són cèl·lules amb una alta demanda d'energia, i per tant estan més exposades a l'acció de les ROS. S'ha proposat que l'acumulació de macromolècules oxidades pot alterar les funcions de la cèl·lula i desencadenar la seva mort. Aquesta podria ser una de les bases etiològiques implicades en el desenvolupament de les malalties neurodegeneratives, ja que podria ser la responsable de provocar una reducció crítica en el nombre de neurones funcionals en determinades àrees cerebrals (Mattson i Magnus, 2006).

2.3. Reactivació del cicle cel·lular com a inductora de la mort neuronal.

El cicle cel·lular és un procés altament conservat a través del qual les cèl·lules eucariotes proliferen. Curiosament, l'apoptosi i el cicle cel·lular comparteixen algunes proteïnes com la proteïna del retinoblastoma (pRb), el p53 i la família de factors de transcripció E2F, i exhibeixen similituds a nivell morfològic com l'arrodoniment de les cèl·lules que experimenten ambdós processos i la condensació de la cromatina. Això fa pensar que són

processos que poden compartir algun dels seus mecanismes de regulació (Becker i Bonni, 2004). En els mamífers adults, les neurones del cervell resten en un estat terminal de diferenciació durant tota la seva vida. Durant molt de temps s'ha pensat que, un cop han assolit aquest estat, les neurones ja no experimenten cap dels processos involucrats a la progressió del cicle cel·lular. Contràriament a aquesta noció, actualment està ben establert que les neurones conserven la capacitat de reactivar el seu cicle cel·lular. Aquesta reactivació del cicle, però, no condueix cap a la seva proliferació, sinó que acaba amb la mort de la neurona per apoptosi (Wartiovaara i col., 2002). La mort cel·lular mediada per mecanismes relacionats amb la reactivació de cicle s'ha observat en nombroses situacions de dany neuronal que inclouen la privació de factors tròfics (Park i col., 1997), la privació de potassi (Padmanabhan i col. 1999), el dany de l'ADN (Park i col., 1998), l'exposició a A β (Giovanni i col., 1999) i l'excitotoxicitat (Verdaguer i col., 2002). A més a més, l'activació aberrant del cicle cel·lular també s'ha relacionat amb la progressió de malalties neurodegeneratives en humans i rosegadors (Husseman i col., 2000; Nagy i col., 1997). Cal destacar, però, que recentment també s'ha suggerit la possibilitat que la reactivació del cicle cel·lular estigui relacionada amb la reparació de l'ADN, ja que la supressió de les quinases dependents de ciclins (CDK, *Cyclin-dependent kinase*) 4 i 6 atenua la reparació de l'ADN en neurones corticals diferenciades sotmeses a concentracions subtòxiques de peròxid d'hidrogen (Schwartz i col., 2007). Per tant, sembla que les proteïnes reguladores de la fase G1 podrien tenir un paper destacat en la supervivència de les neurones com a reguladores de la reparació del seu ADN.

2.3.1. Regulació del cicle cel·lular.

En estat de repòs, les cèl·lules eucariotes es troben a la fase G0, i són induïdes a activar el cicle cel·lular en resposta als estímuls mitogènics. El cicle cel·lular es divideix en quatre fases: G1, S, G2 i M (Figura 11). La fase G1 és un punt important de control de la regulació del cicle, donat que determina, en funció de les condicions intracel·lulars i extracel·lulars, si aquest progressarà vers la fase S o quedarà aturat en aquesta fase (Liu i Greene, 2001a). A la fase S es dona la replicació de l'ADN, i al final de la fase G2/M es dona la divisió de la cèl·lula en dues cèl·lules noves. Tot aquest procés està regulat per un conjunt de proteïnes que inclouen les ciclins (Cy), les CDK i els inhibidors de les quinases dependents de ciclins (CDKI, *Cyclin-dependent kinase inhibitor*), que s'activen i inactiven de forma periòdica i ordenada per garantir el seu correcte desenvolupament (Han i col., 2005).

La progressió a través de la fase G1 és controlada en primera instància per les CyD, que activen CDK4 i CDK6, i posteriorment pel complex CyE-CDK2, que regula el pas a la fase S. El complex actiu CyD-CDK4/6 fosforila la proteïna pRb, de manera que el factor E2F deixa d'estar unit a la pRb i s'indueix l'expressió de gens necessaris per a la progressió del cicle. La fosforilació de la pRb marca un punt de no retorn, a partir del qual la cèl·lula es veu abocada a continuar amb el procés de divisió. Un cop s'entra a la fase S, hi ha una degradació de la CyE per silenciar l'activitat dels complexos CyE-CDK2 i evitar que hi hagi més d'una replicació de l'ADN, i seguidament la CDK2 passa a interaccionar amb la CyA. Els complexos CyA-CDK2 fosforilen diverses proteïnes que es pensa que son necessàries perquè la cèl·lula completi correctament la fase S i en pugui sortir. A la fase G2, la CyA és degradada i se sintetitzen les CyB, que passen a interaccionar amb la CDK1, que també s'anomena cdc2. Els complexos actius CyB-cdc2 participen en la condensació dels cromosomes i en el trencament de la membrana nuclear. A partir d'aquí, aquests complexos van perdent activitat, la qual cosa permet la finalització del procés de divisió cel·lular (Rashidian i col., 2007; Wang i col., 2009).

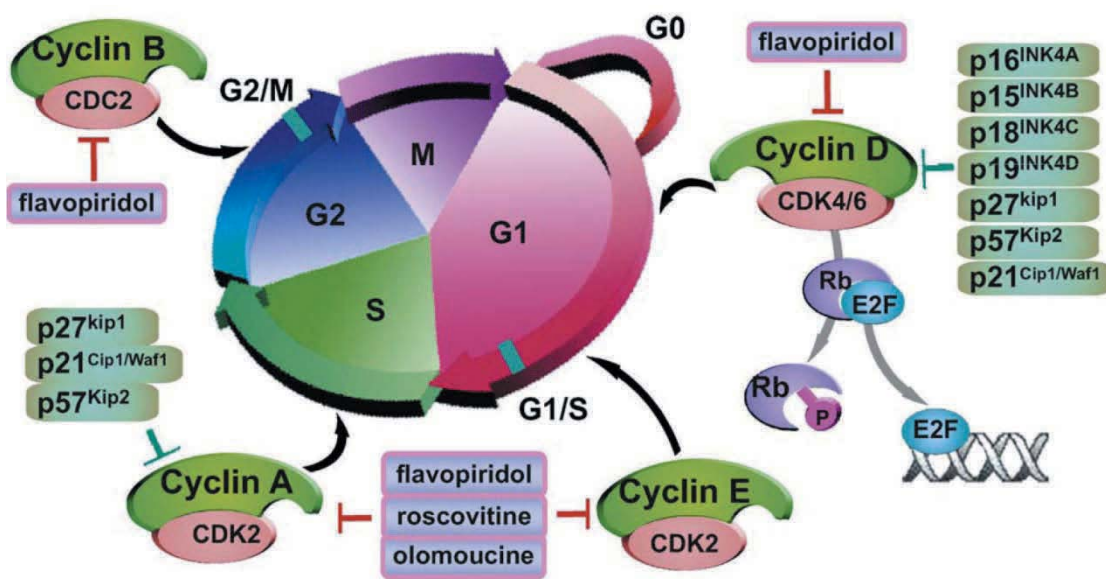


Figura 11. Esquema de la regulació del cicle cel·lular (Wang i col., 2009)

2.3.2. Punts de control del cicle cel·lular i apoptosi neuronal.

2.3.2.1. Punt de control G1/S.

Aquest punt és important en situacions de dany agut del SNC originat, per exemple, per traumatismes o AVC, ja que l'apoptosi neuronal que s'observa en el dany agut està

relacionada sovint amb la progressió del cicle cel·lular fins a l'activació de la via CyD/CDK4-pRb-E2F (Wang i col., 2009). Entre les ciclins de la fase G1, la CyD és la que més s'ha estudiat en relació a l'apoptosi de les neurones diferenciades. Inicialment, es van trobar nivells elevats de la CyD en neurones sotmeses a privació de factors tròfics (Freeman i col., 1994) i posteriorment s'han detectat en nombrosos models de mort neuronal (Becker i Bonni, 2004). En la mort neuronal mediada per agents tòxics, la CyD i en alguns casos la CyE també juguen un paper destacat; per exemple, ambdues ciclins s'han trobat elevades en resposta a tractaments amb àcid kaïníc *in vitro* (Verdaguer i col., 2002). *In vivo*, l'administració sistèmica d'àcid kaïníc indueix l'expressió de CyD i CDK4 (Ino i Chiba, 2001; Park i col., 2000b). En aquest cas, l'administració d'oligonucleòtids antisentit contra CyD i CDK4 va suprimir l'apoptosi induïda per la toxina. El tractament amb A β indueix l'expressió de CyD, E i A *in vitro* (Copani i col., 1999), i els oligonucleòtids antisentit contra la CyD evitaven de nou l'apoptosi induïda per l'agent tòxic. Aquests resultats permeten confirmar el paper dels reguladors de la fase G1 en la progressió de l'apoptosi.

De manera similar a allò descrit per les ciclins de la fase G1, els estímuls apoptòtics també indueixen l'expressió de les CDK de la fase G1 a les neurones afectades. La utilització d'inhibidors de CDK i de formes negatives dominants d'aquestes proteïnes confirmen aquest fet (Padmanabhan i col., 1999; Park i col., 1997). Les CDK4 i CDK6, les primeres quinases que s'expressen a la fase G1, sembla que són les que juguen un paper més determinant a l'apoptosi neuronal (Becker i Bonni, 2004). Els principals substrats coneguts d'aquestes quinases són la pRb i la p107. La pRb i la p107, juntament amb la p130, formen la família de proteïnes del retinoblastoma, també anomenades proteïnes *Pocket*. Aquestes proteïnes es troben al nucli de les cèl·lules i es pensa que tenen com a funció principal la de regular la progressió del cicle cel·lular (Macaluso i col., 2006), tot i que sembla que també intervenen en processos de diferenciació i supervivència (Goodrich, 2006). En el seu estat inactiu, la pRb roman no fosforilada, i es creu que inhibeix la progressió del cicle cel·lular mitjançant la repressió dels factors de transcripció E2F. Quan hi ha algun estímul mitogènic, la proteïna és fosforilada pels complexos CyD/CDK4/6 actius, amb el que s'allibera d'E2F i es produeix l'activació dels gens diana necessaris per a la progressió del cicle vers la fase S (Liu i Greene, 2001b). S'ha vist que, en situacions de dany de l'ADN, l'E2F també participa en la regulació de gens proapoptòtics com els que codifiquen l'APAF-1 i diverses caspases (DeGregori, 2002). La fosforilació de la pRb s'ha detectat en cultius neuronals exposats a diferents estímuls letals com la privació de potassi (Padmanabhan i col., 1999), el dany de l'ADN (Park i col., 1998), l'exposició a A β (Copani i col., 1999) i l'excitotoxicitat (Park i col., 2000b). A més a més, s'ha vist que una forma mutant de la pRb resistent a la fosforilació protegeix parcialment a les neurones de l'apoptosi induïda pel dany de l'ADN (Park i col.,

2000a). Pel que fa a l'E2F, s'ha vist que la seva expressió augmenta en neurones sotmeses a excitotoxicitat (Verdaguer i col., 2002) i que formes negatives dominants de la proteïna prevenen la mort cel·lular en models de privació de potassi (Konishi i Bonni, 2003), dany de l'ADN (Park i col., 2000a) i exposició a A β (Giovanni i col., 1999).

2.3.2.2. Fase S.

Tot i que l'activació aberrant del cicle cel·lular en neurones sovint s'atura al punt de control G1/S, principalment en casos de dany agut del SNC, s'ha vist que, en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer (MA) o de Parkinson (MP), el cicle pot evolucionar fins a la fase S, on es produeix la corresponent replicació de l'ADN, i arribar fins al punt de control G2/M (Wang i col., 2009). Normalment s'utilitzen dos marcadors per detectar el progrés cap a aquesta fase que són, per una banda, una subunitat de l'ADN polimerasa anomenada PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), la qual augmenta de concentració a la fase S i es manté elevada durant la G2, i per l'altra, la incorporació a l'ADN replicat de bromdeoxiuridina (BrdU). L'entrada a la fase S s'ha demostrat en diversos paradigmes de mort cel·lular mediada per estímuls neurotòxics, mentre que sembla que quan l'apoptosi és natural no s'hi arriba. Això fa pensar que l'activació del cicle cel·lular en neurones depèn de la natura de l'estímul apoptòtic i del seu estat de maduració (Becker i Bonni, 2004).

2.3.2.3. Punt de control G2/M.

L'estudi de les proteïnes reguladores de la fase G2 ha permès trobar el primer lligam directe entre aquestes i la maquinària responsable de la mort cel·lular. En un model de supressió de l'activitat, s'ha vist que l'apoptosi de les neurones granulars del cerebel és mediada per la fosforilació de la Bad en 128 per part de la cdc2, fet que promou l'activitat apoptòtica de la primera (Konishi i col., 2002). Així, tot i que sembla demostrat que les neurones poden progressar al llarg de les fases S i G2, en cap moment s'ha vist que puguin entrar a la fase M. Per això es pensa que l'activació de la cdc2 seria l'última etapa prèvia a l'apoptosi neuronal.

2.3.3. Reactivació del cicle cel·lular en malalties neurològiques.

L'evidència de que l'activació aberrant del cicle cel·lular participa en la progressió de les malalties neurològiques prové de la detecció de marcadors del cicle en mostres de cervells

de pacients afectats per diverses d'aquestes patologies. En aquestes mostres de diferents processos neurodegeneratius s'ha detectat la progressió a través de la fase G1, la síntesi d'ADN i l'aparició de marcadors de la fase G2. Per tant, sembla que la reactivació del cicle cel·lular no és un procés específic d'una determinada malaltia neurodegenerativa o d'una determinada població neuronal, sinó que es tracta d'una via de senyalització comuna relacionada amb l'apoptosi.

En relació a l'AVC, la principal causa de mort i de discapacitat, actualment es pensa que les lesions degudes a aquesta patologia consten d'un nucli on bàsicament es produeix la necrosi accidental i una zona de penombra al voltant d'aquesta on s'esdevé l'apoptosi (Friedlander, 2003). El paper de la reactivació del cicle cel·lular en aquesta patologia s'ha pogut estudiar en models de rosegadors, on s'ha detectat l'expressió sobretot de reguladors de la fase G1. D'aquesta manera, es pensa que la via CyD-CDK4/pRb té un paper destacat en la mort neuronal associada a aquesta patologia (Wang i col., 2009). Pel que fa a humans, hi ha poca informació al respecte, però sí que hi ha algun estudi en el que s'ha detectat nivells elevats de CyD i CDK2, i menys de CDK4, en seccions cerebrals de pacients que havien sofert una aturada cardíaca o un infart cerebral localitzat (Love, 2003).

La MA és la principal causa de demència senil a la tercera edat. Hi ha gran quantitat d'estudis que mostren la presència de marcadors de les fases G1, S i G2 als cervells dels pacients afectats d'aquesta malaltia (Becker i Bonni, 2004; Wang i col., 2009). S'ha vist que l'expressió d'aquests marcadors no es produeix de la manera coordinada en la que s'observa en cèl·lules que proliferen de manera normal, sinó que se'n poden trobar simultàniament de diferents fases, i que en alguns casos presenten una localització no habitual, com passa per exemple amb PCNA i CyB, que en la MA es poden trobar al citoplasma (Stoica i col., 2009; Yang i col., 2001). Els primers marcadors que es van trobar van ser cdc2 i la seva ciclina activadora CyB, i es va suggerir que aquesta quinasa contribuïa a la fosforilació de tau i a la posterior formació dels cabdells neurofibril·lars (Vincent i col., 1997). Posteriorment s'ha detectat l'aparició de la CyD, la CDK4, la CDK6, la Ki67, que és una proteïna que es va acumulant al llarg de la progressió del cicle fins a la fase M, on la seva quantitat és màxima, la CDK2 i la CyE (Nagy i col., 1997, 1998). Confirmant el paper del cicle en la malaltia, s'ha vist que una fracció considerable de les neurones de les zones afectades per MA són tetraploides, ja que completen la fase S però queden aturades abans d'entrar en mitosi (Yang i col., 2001). Aquesta reactivació del cicle cel·lular sembla que és un procés previ al desenvolupament de la MA (Wang i col., 2009).

La reactivació del cicle cel·lular també s'ha trobat en d'altres patologies com la MP, l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), la malaltia de Pick, la síndrome de Down i d'altres. Així, sembla que es tracta d'un procés comú associat a la mort neuronal en nombroses malalties neurodegeneratives. Es desconeixen fins al moment els factors que posen en marxa el cicle cel·lular a les neurones, però es pensa que la combinació de la resposta d'aquestes juntament amb la dels astròcits i la micròglia davant de la hipòxia, les neurotoxines, les ROS, els agents inflamatoris i d'altres hi pot tenir a veure. Tampoc està clar el paper que juguen les proteïnes reguladores del cicle en la integritat i la neuroplasticitat neuronals, ja que les neurones en el seu estat normal n'expressen algunes (Schmetsdorf i col., 2007).

2.3.4. Vies de senyalització relacionades amb el cicle cel·lular.

2.3.4.1. ATM/p53.

La proteïna ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) és el producte del gen l'alteració del qual dóna lloc a la malaltia genètica humana anomenada atàxia telangiectàsica. L'ATM pertany a una família conservada de proteïnes que tenen activitat serina/treonina quinasa i contenen un domini amb motius típics de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *Phosphatidylinositol 3-kinase*) en el que es troba el seu centre catalític (Shiloh, 2003). L'ATM es troba de forma predominant al nucli de les cèl·lules, i respon als trencaments dobles de la cadena (DSB, *Double-strand break*) d'ADN fosforilant diversos substrats. En condicions normals, l'ATM roman inactivada i formant agregats de dues o més unitats. En resposta al dany de l'ADN, les molècules d'ATM es fosforilen entre elles a la serina 1981 de manera que esdevenen monòmers plenament actius (Bakkenist i Kastan, 2003). Un cop activada, l'ATM fosforila diversos substrats implicats a la reparació dels DSB. A més a més, si el dany és excessiu, contribueix a l'activació de l'apoptosi (Kruman i col., 2004).

L'ATM juga un paper determinant en la regulació dels punts de control, i concretament, a l'aturada del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de diverses proteïnes (Figura 12). A nivell del punt de control G1/S, l'ATM activa i estabilitza el p53 per fosforilació directa de la seva serina 15 i fosforilació d'altres proteïnes involucrades a la seva regulació com CHK2 i MDM2. Com a resultat, el p53 activa la transcripció de p21, també conegut com a WAF1, que és un inhibidor del complex CyE-CDK2, de manera que el cicle queda aturat en aquest punt de control. CHK1 i CHK2, quan són activades per fosforilació per l'ATM, fosforilen les CDC25A i CDC25C i estimulen la seva degradació. Aquestes dues últimes proteïnes són dues fosfatases que mantenen l'activitat de CDK2 i CDK1, de manera que la seva degradació contribueix a que s'aturi la progressió del cicle. A més a més d'aquestes, l'ATM

fosforila d'altres proteïnes com la BRCA1, la NBS1, la FANCD2, la SMC1, la RAD17 que, igual que en els casos anteriors, contribueixen a aturar la progressió del cicle (Shiloh, 2003).

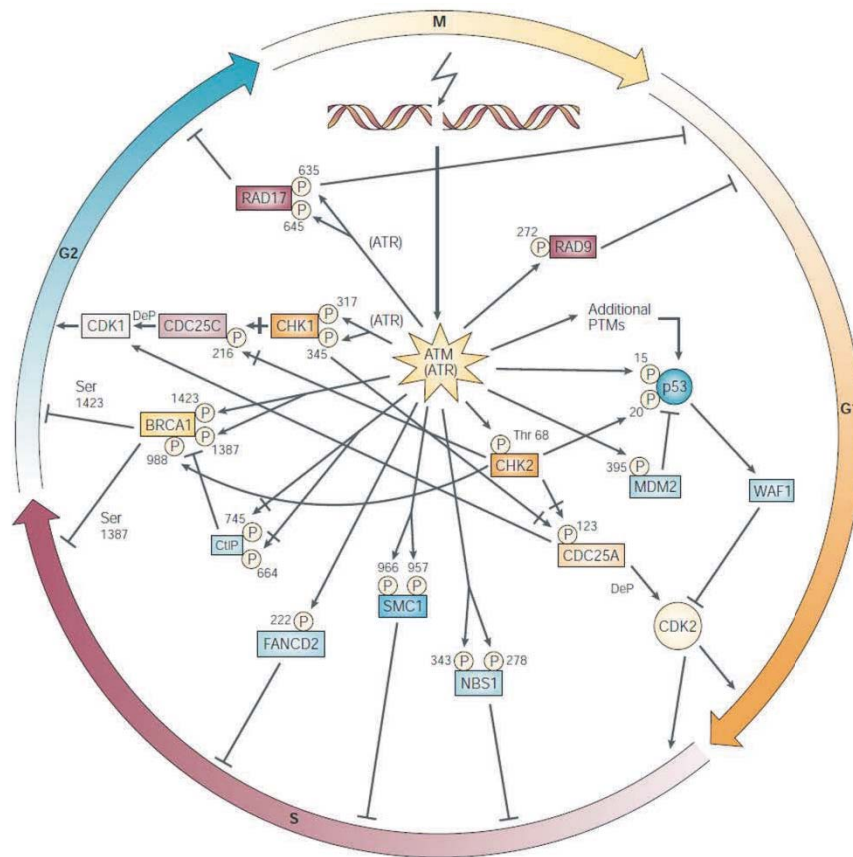


Figura 12. Activació dels punts de control del cicle cel·lular per part de l'ATM (Shiloh, 2003)

El p53 és un factor de transcripció que s'activa en resposta a pràcticament tots els senyals d'estress associats a càncer incloent el dany de l'ADN i l'activació d'oncogenes, i actua com a supressor tumoral. En resposta al dany de l'ADN, el p53 inhibeix la progressió del cicle cel·lular a la fase G1 a través de p21 i col·labora així en la reparació de l'ADN. Es creu que quan hi ha poca quantitat de DSB només s'activa la quantitat necessària de p53 per transcriure el gen que codifica p21, de manera que el cicle cel·lular s'atura. Quan el nombre de DSB augmenta, el p53 s'acumula per sobre d'un llindar a partir del qual activa els gens apoptòtics que codifiquen proteïnes com la Bax, la PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) i l'APAF-1 (Roos i Kaina, 2006). La regulació de p53 es duu a terme per la via ARF - MDM2. L'ARF, que s'anomena p19 en ratolins, és un inhibidor del cicle cel·lular que a la vegada pot activar el p53 per inhibició de la MDM2. La MDM2 inhibeix el p53 per unió directa i promovent la seva degradació per ubiquitinació. El p53 presenta, a més a més, una

elevada quantitat de modificacions posttraduccional que afecten als seus nivells, localització subcel·lular, unió a l'ADN i al grup de gens activats (Polager i Ginsberg, 2009).

2.3.4.2. PI3K/Akt.

La via de senyalització PI3K/Akt s'activa per diferents estímuls, essent els més importants els mediats per factors tròfics, neurotròfics i citoquines, i intervé en un gran nombre de processos fisiològics relacionats principalment amb la supervivència de la cèl·lula. La PI3K està formada per una subunitat reguladora, que s'anomena p85, associada a una subunitat catalítica anomenada p110. La unió dels factors neurotròfics als receptors tirosina quinasa (Rtk) estimula la seva transfosforilació i el posterior reclutament de diferents proteïnes, entre les que hi ha la PI3K, que s'acoblen a aquests receptors. Algunes d'aquestes proteïnes, com la Ras i la família de proteïnes adaptadores Gab-1/IRS-1/IRS-2, col·laboren llavors amb els Rtk en l'activació de la PI3K, que es produeix per un canvi de conformació que allibera a la p110 de l'efecte inhibitor de la p85. Els receptors acoblats a proteïna G també poden intervenir en l'activació de la PI3K (Kaplan i Miller, 2000; Martelli i col., 2010). Un cop activa, la PI3K fosforila principalment el fosfatidilinositol (4,5) P₂ (PIP₂) a fosfatidilinositol (3,4,5) P₃ (PIP₃), que es pot unir llavors a les proteïnes de membrana plasmàtica que contenen dominis d'homologia PH (*Pleckstrin homology*) com l'Akt i la PDK1 (*Phosphoinositide-dependent protein kinase 1*).

L'Akt és una quinasa de 57 kDa que també es coneix amb el nom de proteïna quinasa B (PKB). L'enzim té tres isoformes altament conservades que, en el cas de la 1 i 2, es troben distribuïdes per tot el cos, mentre que la 3 és més específica del sistema nerviós. Les tres isoformes tenen un domini PH, un lloc d'unió per ATP i dos llocs de fosforilació, i tenen diferents funcions. S'ha vist que els ratolins KO per Akt1 pateixen un retard en el creixement, els KO per Akt2 desenvolupen resistència a l'insulina i diabetis i els KO per Akt 3 tenen un cervell més petit (Chin i Toker, 2009). El reclutament de l'Akt cap a la membrana plasmàtica mitjançant PIP₂ i PIP₃ li produeix un canvi conformacional que fa que pugui ser fosforilada a la posició Thr308 per part de la PDK1 i a Ser473 pel complex mTORC2 (Figura 13), de manera que queda plenament activada i pot migrar cap al citoplasma, les mitocòndries i el nucli. Fins al moment s'han detectat més de 100 substrats susceptibles de ser fosforilats per l'Akt com la Bad, la caspasa-9 i d'altres, els quals estan involucrats en la regulació de la proliferació, la diferenciació i la supervivència cel·lulars (Figura 14).

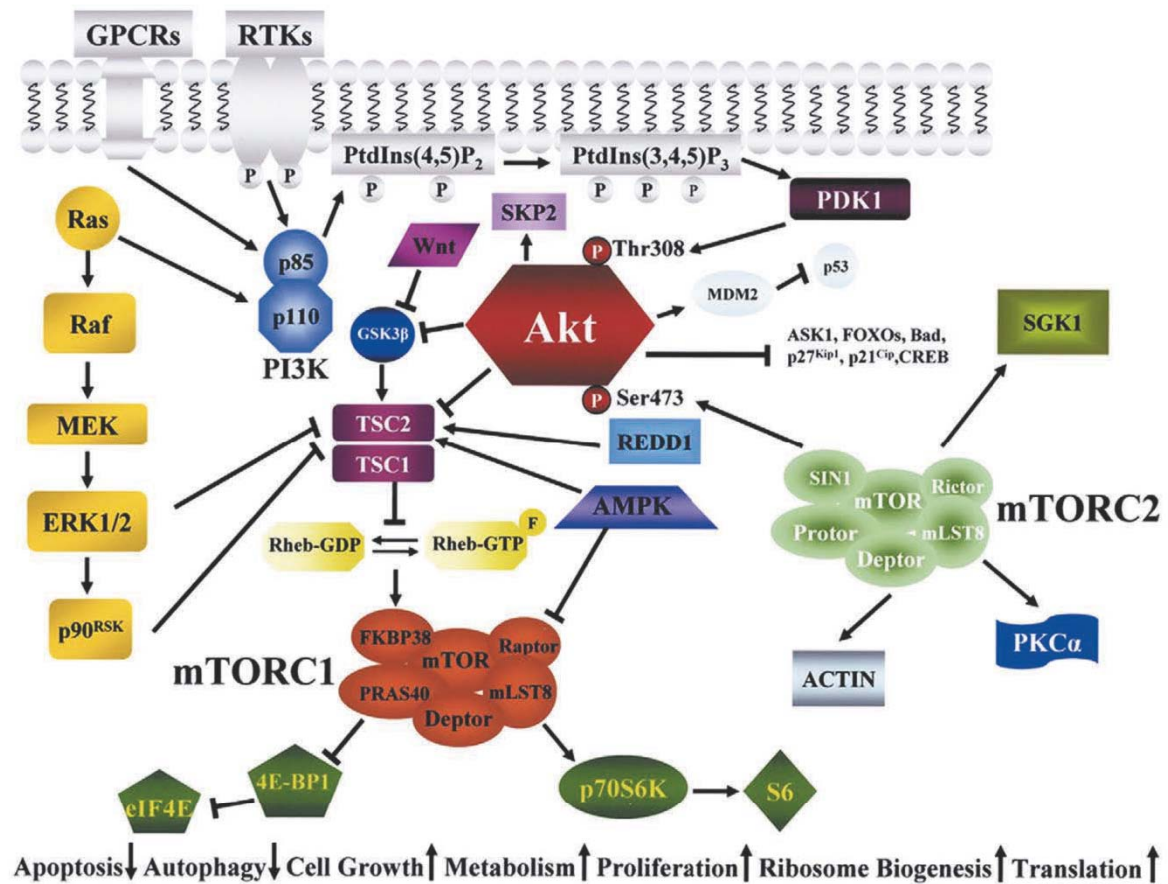


Figura 13. Via de senyalització responsable de l'activació de l'Akt (Martelli i col., 2010)

L'Akt promou la supervivència de la cèl·lula mitjançant el bloqueig de proteïnes i processos proapoptòtics (Figura 14). Per exemple, l'Akt fosforila la proteïna Bad, la qual cosa la fa accessible a les proteïnes 14-3-3, les quals promouen la inhibició de les seves funcions (Datta i col., 2000). També pot bloquejar la funció d'algunes proteïnes proapoptòtiques a través dels factors de transcripció FOXO (*Forkhead box transcription factor*) i el p53. L'Akt pot fosforilar els diferents factors FOXO a nivell nuclear, fet que permet que les proteïnes 14-3-3 s'hi puguin unir i promoguin la seva sortida del nucli. Així, els factors FOXO deixen d'actuar sobre els seus gens diana, entre els que es troben els gens que codifiquen la Bim (*Bcl-2-like-11*) i el FasL, de manera que s'atura la seva transcripció (Manning i Cantley, 2007). D'altra banda, l'Akt fosforila la MDM2, promovent així la seva translocació al nucli, on inhibeix la funció del p53 (Mayo i Donner, 2001). Un altre substrat de l'Akt són les formes α i β de la GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), les quals inactiva per fosforilació a Ser21 i Ser9 respectivament. Finalment, s'ha vist que l'Akt pot fosforilar directament la proforma de la caspasa-9 en humans, la qual cosa s'ha vist que baixa l'activitat de la proteasa *in vitro*. En aquest cas, però, la seqüència que envolta el punt de fosforilació no es correspon a la que

habitualment tenen els substrats de l'Akt, i sembla que aquest procés només seria destacable en primats (Manning i Cantley, 2007).

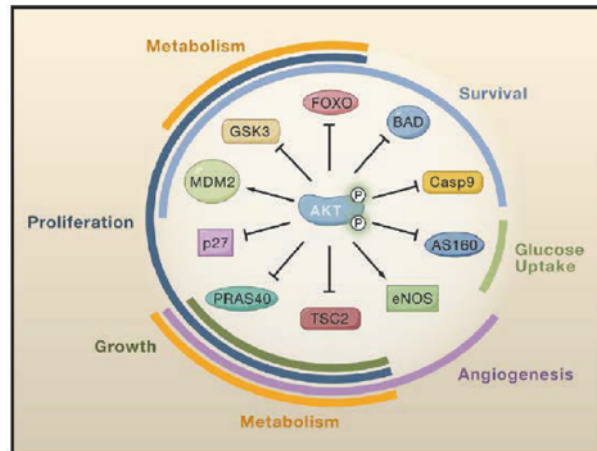


Figura 14. Alguns dels substrats de l'Akt i les seves funcions (Manning i Cantley, 2007)

Cal destacar que l'Akt també juga, a través de la fosforilació de la GSK3, un paper destacat a la regulació del cicle cel·lular, ja que pot facilitar la seva progressió a nivell de les fases G1 i G2. La forma activa de la GSK3 β fosforila la CyD, promovent el seu pas cap al citoplasma, on és degradada per proteòlisi associada a ubiquitinació (Takahashi-Yanaga i Sasaguri, 2008). Així, la inhibició de la GSK3 β per fosforilació mediada per l'Akt estabilitza la CyD i estimula, de forma indirecta, la progressió del cicle. L'Akt pot fosforilar també la p27 i la p21, ambdues inhibidores de la progressió del cicle, fet que promou la seva degradació a nivell del citoplasma (Liang i Slingerlang, 2003).

2.3.4.3. GSK3.

La GSK3 és una quinasa de serina i treonina ubiqua. Inicialment es va identificar com a un enzim capaç d'inhibir la glicogen sintasa per fosforilació (Embi i col., 1980), però posteriorment s'ha vist que pot fosforilar uns 50 substrats. D'aquesta manera, intervé a la modulació de diversos processos cel·lulars com són el metabolisme del glicogen, el manteniment de l'estructura cel·lular, l'expressió gènica i l'apoptosi (Jope i Johnson, 2004). Existeixen dues isoformes de l'enzim, GSK3 α i GSK3 β , de 51 kDa i 47 kDa respectivament, que tot i tenir una estructura similar, desenvolupen funcions diferents ja que, per exemple, sembla que només la forma β juga un paper destacat a l'apoptosi (Doble i Woodgett, 2003).

Les dues isoformes de la GSK3 presenten diversos mecanismes de regulació. El més conegut és el que es dona mitjançant la fosforilació de la serina 21 de la forma α o la serina 9 de la forma β , que té com a resultat, en ambdós casos, la inhibició de l'activitat de l'enzim. La principal quinasa involucrada en aquest procés és l'Akt, tot i que hi ha d'altres proteïnes que també poden fosforilar GSK3, com alguns integrants de la família de les MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), la proteïna quinasa A (PKA) i la proteïna quinasa C (PKC) (Figura 15) (Cohen i Frame, 2001; Jope i Johnson, 2004). D'altra banda, la fosforilació de la forma α a la Tyr279 i de la forma β a la Tyr216 produeixen una activació de l'enzim, tot i que es desconeix quines proteïnes en poden ser les responsables. L'activitat de la GSK3 també està regulada pel grau de fosforilació dels seus substrats, ja que molts d'aquests cal que estiguin prèviament fosforilats en diferents residus per tal que l'enzim els pugui fosforilar en d'altres (Doble i Woodgett, 2003). La localització intracel·lular és un altre mecanisme que intervé a la regulació de GSK3. Tradicionalment s'ha considerat que la GSK3 és un enzim citoplasmàtic però, tot i que en menys quantitat, també es troba a la mitocòndria i al nucli, on regula nombrosos factors de transcripció. Al nucli, els nivells de GSK3 no són constants i, per exemple, fluctuen al llarg del cicle cel·lular. Aquests nivells esdevenen màxims a la fase S del cicle, fet que facilita la fosforilació, la translocació al citoplasma i la posterior degradació proteosomal de la CyD (Takahashi-Yanaga i Sasaguri, 2008). Els nivells nuclears de GSK3 també poden augmentar ràpidament en el procés d'apoptosi, fet que li permet regular l'expressió de diversos dels gens implicats (Bijur i Jope, 2001). Finalment, la unió a d'altres proteïnes per formar complexos, com per exemple passa en el cas del p53, que al nucli es pot unir a la GSK3 i activar-la, o a la via canònica de la Wnt, on diverses proteïnes s'uneixen a la GSK3 i controlen el seu accés a la β -catenina, és també un altre mecanisme de regulació de l'enzim (Jope i Johnson, 2004).

La GSK3 juga un paper destacat a la regulació de l'apoptosi. S'ha vist que l'activació de l'enzim promou l'apoptosi en una gran diversitat de condicions com la supressió de factors tròfics, la inhibició de les PI3K i la toxicitat induïda pel pèptid $A\beta$ i per les toxines mitocondrials (Grimes i Jope, 2001). També està involucrada a l'apoptosi induïda per p53 després del dany de l'ADN (Watcharasit i col., 2002), per la hipòxia (Loberg i col., 2002) i per la toxicitat de la cadena poliglutamínica associada a la MH (Carmichael i col., 2002). De fet, la sobreexpressió de la GSK3 indueix per ella mateixa l'apoptosi sense la necessitat de cap altre estímul apoptòtic (Pap i Cooper, 1998). Cal destacar, però, que el nivell d'activitat de GSK3 que indueix l'apoptosi és molt superior al que donen els nivells fisiològics de la quinasa i que, a més a més, s'ha vist que ratolins *KI* amb modificació de les dues isoformes de l'enzim de manera que no poden ser fosforilades, i per tant inhibides, són viables

(McManus i col., 2005). Això fa pensar que, a nivell fisiològic, la GSK3 és un modulador del llinar a partir del qual es pot desencadenar l'apoptosi, i que per ella sola no pot induir-la (Beurel i Jope, 2006).

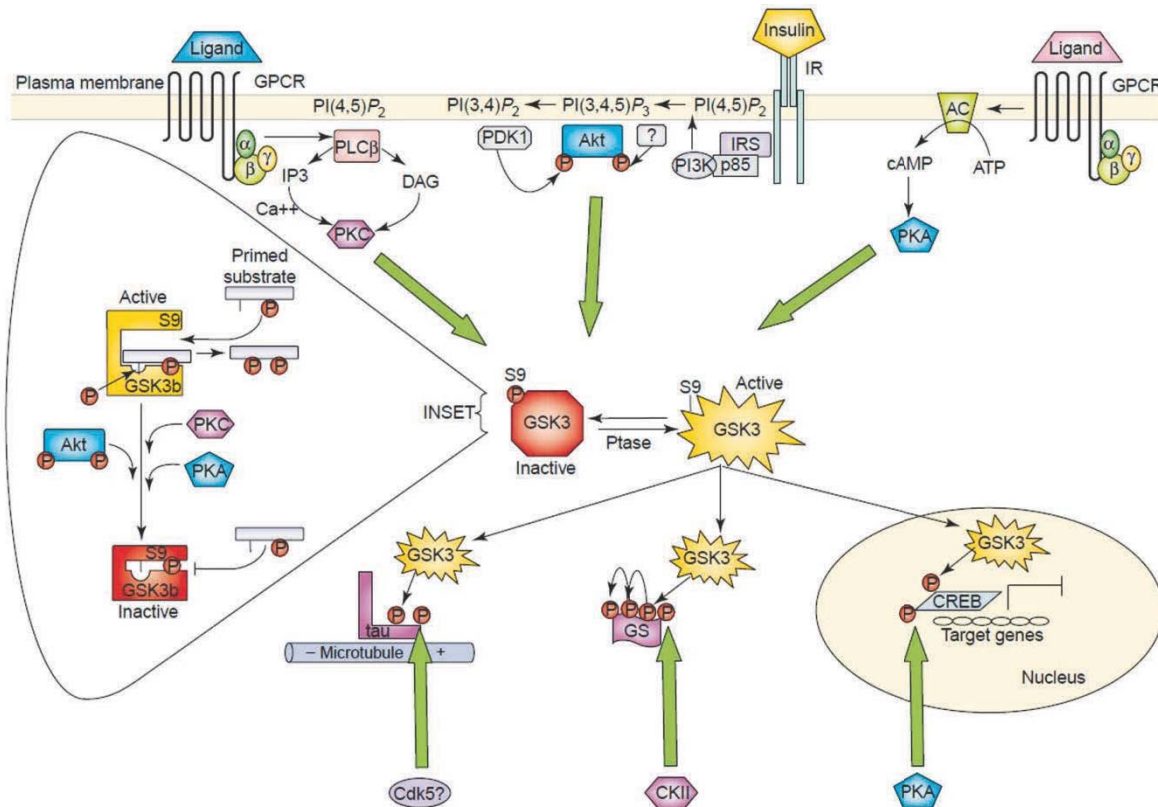


Figura 15. Regulació de l'activitat de la GSK3 per fosforilació (Jope i Johnson, 2004)

La GSK3 regula diferents proteïnes relacionades amb la via intrínseca de l'apoptosi. L'enzim participa de la disrupció mitocondrial activant la proteïna Bax per fosforilació de la seva Ser163, promovent la degradació de la proteïna antiapoptòtica Mcl1 i fosforilant la proteïna VDAC, fet que facilita la seva interacció amb proteïnes proapoptòtiques (Beurel i Jope, 2006). A la vegada, la GSK3 també regula l'activitat de diferents factors de transcripció. Tal com s'ha vist abans, un d'aquests factors de transcripció és el p53, el qual regula unint-se directament a ell, per fosforilació de les Ser33, Ser315 i Ser376 i per fosforilació de la MDM2. La complexitat d'aquests processos de regulació fa que encara hi hagi controvèrsia sobre els efectes resultants que poden produir (Beurel i Jope, 2006). La GSK3 també fosforila la β -catenina, fet que promou la seva degradació i evita les seves accions relacionades amb la supervivència cel·lular. Altres factors de transcripció sobre els que pot actuar promovent l'apoptosi són el HSF1 (*Heat shock factor-1*), el CREB (*Cyclic AMP response element-binding protein*), el factor Myc i el NF- κ B (*Nuclear factor-kB*) (Beurel i Jope, 2006).

Mentre que, per una banda, la GSK3 promou la progressió de la via intrínseca de l'apoptosi, per l'altre banda, sorprenentment, atura la progressió de la via extrínseca mediada per l'activació dels receptors de mort cel·lular impedit l'activació de la caspasa-8, que és la iniciadora de la via. Aquest efecte es va fer patent en veure que el liti, que posteriorment es va comprovar que és un inhibidor de la GSK3 (Klein i Melton, 1996), produïa una potenciació de la citotoxicitat mediada pel $TNF\alpha$ (Beyaert i col., 1989), i que els ratolins *KO* per la $GSK3\beta$ morien a nivell embrionari per una hipersensibilitat hepàtica al $TNF\alpha$ (Hoeflich i col., 2000). Les dianes sobre les que actua la GSK3 a cadascuna de les dues vies fan possible que l'enzim exerceixi accions oposades sobre cadascuna d'elles sense conflicte ni solapament. Així, la diana de la GSK3 a la via extrínseca es troba per sobre de l'etapa en la que hi ha l'activació de la caspasa-8, de manera que s'evita que el senyal arribi, mitjançant l'acció de la proteïna Bid (veure la Figura 6), a la mitocòndria, on la GSK3 té l'acció oposada de promoure l'apoptosi. A més a més, la caspasa-8 normalment no està involucrada en la via intrínseca de l'apoptosi, de manera que la inhibició de la seva activació no influeix sobre l'efecte facilitador que la GSK3 té sobre la via intrínseca. Per tant, s'observa que hi ha una segregació clara de les accions de la GSK3 sobre les dues vies, fet que li permet regular-les en direccions oposades de manera efectiva.

Un altre aspecte destacable de la GSK3 consisteix en la seva capacitat per fosforilar proteïnes que intervenen en la regulació de l'estructura i la motilitat cel·lulars. Diferents proteïnes associades als microtúbuls poden ser-ne substrats. Un exemple és la proteïna Tau, que en ser fosforilada per la GSK3 es dissocia dels microtúbuls. Això provoca una desestabilització de l'estructura cel·lular que explica alguns dels canvis de morfologia que es veuen durant l'apoptosi. La proteïna Tau hiperfosforilada forma agregats i contribueix a la formació de cabdells neurofibril·lars, estructures totes elles que poden resultar tòxiques per a la cèl·lula (Beurel i Jope, 2006).

La diversitat de processos crítics per a la funció cel·lular com l'estructura, l'expressió genètica, la motilitat i l'apoptosi en els que intervé la GSK3 fan que aquest enzim estigui implicat en un gran nombre de patologies com la hipertròfia muscular, el càncer, el trastorn bipolar, l'esquizofrènia, la diabetis de tipus 2 per resistència a la insulina o la MA (Jope i col., 2007). Respecte a la MA, es pensa que la GSK3 pot contribuir als dos principals signes neuropatològics que s'observen a la malaltia, que són els cabdells neurofibril·lars (agregats intraneuronals filamentosos composts principalment per proteïna Tau hiperfosforilada) i les plaques amiloidees (dipòsits extracel·lulars formats per pèptid $A\beta$ principalment). Com s'ha vist abans, la GSK3 pot fosforilar directament la Tau, fet que pot constituir el pas previ a la

formació dels cabdells. A més a més, també contribueix a la producció del pèptid A β , ja que s'ha vist que la inhibició de la GSK3 en disminueix la producció. Sembla que en aquest procés hi està implicada la isoforma α de l'enzim. Finalment, la GSK3 també pot fosforilar l'APP (*Amyloid precursor protein*), tot i que no està clar com això influeix a la producció d'A β (Jope i Johnson, 2004).

3. BARRERA HEMATOENCEFÀLICA.

La idea d'una barrera hematoencefàlica (BHE) va sorgir d'experiments realitzats a finals del segle XIX i principis del XX a Alemanya per Paul Ehrlich, qui va demostrar la manca de permeabilitat dels vasos cerebrals als colorants units a l'albumina. Això el va portar a suggerir la presència d'una barrera que evitava l'entrada de les proteïnes al cervell (Ehrlich, 1885). Posteriorment, l'observació de que certs compostos no presentaven activitat farmacològica a nivell cerebral quan s'injectaven intravenosament a animals d'experimentació, encara que podien produir símptomes dràstics quan eren injectats directament a diferents zones del LCR, suggeria de nou la idea de l'existència d'una barrera entre la sang i el cervell (Biedl i Kraus, 1898; Lewandowsky, 1900). Aquesta hipòtesi va guanyar importància amb els experiments de Goldman (1909, 1913), qui va demostrar que el colorant blau tripà injectat al torrent sanguini tenia tots els teixits excepte el cervell i la medul·la espinal, que quedaven blancs, i el LCR, que restava incolor (Figura 16A), mentre que, quan aquest colorant era injectat directament al LCR, les zones adjacents del teixit nerviós es tenyien ràpidament de color blau (Figura 16B). Així, es va concloure que hi havia una barrera a nivell dels vasos sanguinis cerebrals, fet que no passava entre el LCR i el cervell (Figura 16C).

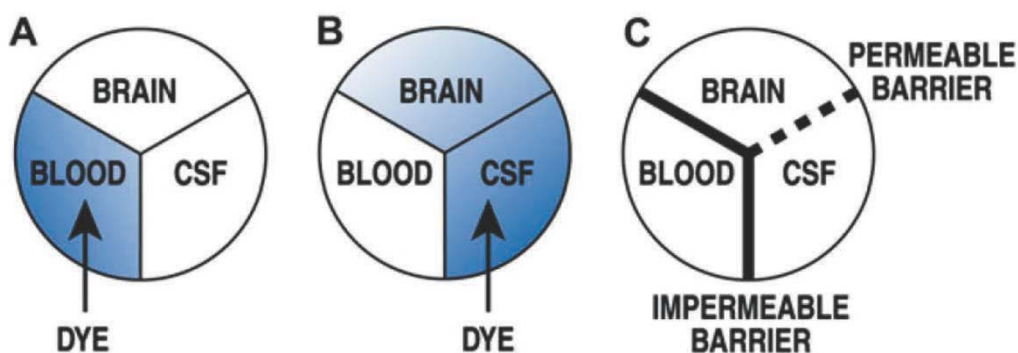


Figura 16. Experiments de Goldman sobre l'existència de la BHE (Zlokovic, 2008)

Actualment, es considera que la BHE és una estructura endotelial altament especialitzada que limita el pas de substàncies entre la sang i el SNC.

3.1. Estructura i funció de la BHE.

Des d'un punt de vista funcional, la regulació de l'intercanvi de substàncies entre el SNC i la sang que permet la BHE és important per al manteniment de l'homeòstasi del medi en el que les neurones desenvolupen la seva funció, la qual cosa assegura el funcionament correcte dels circuits neuronals, la transmissió sinàptica, la remodelació sinàptica, l'angiogènesi i la neurogènesi. Així mateix, la BHE assegura el subministrament de nutrients i substàncies necessàries per al funcionament del SNC, evita l'entrada de substàncies tòxiques i permet eliminar substàncies de rebuig del SNC cap al torrent circulatori.

Des d'un punt de vista estructural, el component principal de la BHE són les cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals (CECC). Aquestes cèl·lules, a diferència del que passa en els capil·lars dels altres teixits, estan fortament unides entre elles mitjançant les unions estretes (TJ, *Tight junctions*), les quals limiten el flux de substàncies per via paracel·lular, i per les unions adherents (UA). A més a més, les CECC no presenten fenestracions, presenten poca pinocitosi, i exerceixen un fort control sobre el pas de substàncies per via transcel·lular. Només les molècules amb característiques molt concretes poden creuar les CECC. Aquestes molècules han de ser liposolubles per poder difondre a través de la membrana cel·lular, han de tenir un pes molecular inferior a 400 Da, no ser substrats dels transportadors de transport actiu de reflux i no ser metabolitzades per les pròpies CECC (Zlokovic, 2008).

3.1.1. Les unions estretes.

En els vasos sanguinis cerebrals, les TJ són les principals estructures que limiten el pas de substàncies via paracel·lular a través de la paret dels capil·lars. Les TJ es troben entre les CECC i les encerclen formant un cinturó continu (Bernacki i col., 2008). Degut a això, la via paracel·lular queda pràcticament segellada (Grieb i col., 1985; Mitic i Anderson, 1998). El nombre de punts de fusió entre les TJ pot variar segons la regió cerebral, fet que genera un nivell de hermeticitat no homogeni en les diferents zones del cervell. Així, a mesura que els capil·lars es transformen en vècules postcapil·lars s'observa un segellat menor (Simionescu i col., 1976). Moltes de les característiques i propietats especials de les TJ es coneixen gràcies a estudis fets amb cèl·lules epitelials en cultiu (Sandoval i Witt, 2008). Les TJ determinen una alta resistència elèctrica de la capa endotelial (1500-2000 Ωcm^2), i la seva integritat depèn d'una adequada concentració extracel·lular d'ions Ca^{2+} . A més a més, un

augment de la concentració d'ATP intracel·lular genera nous punts de fusió que enforteixen les TJ (Bernacki i col., 2008).

Diverses proteïnes de la membrana plasmàtica han estat identificades com a constituents de les TJ (Figura 17a). Entre aquestes es troben la claudina, l'occludina i les *Junctional adhesion molecules* (JAM). A més a més, les proteïnes ZO (*Zonula occludens*) 1, 2 i 3 juntament amb la cingulina, han estat identificades com a proteïnes citoplasmàtiques que uneixen les proteïnes de les TJ amb l'actina, que és una proteïna del citoesquelet de les cèl·lules que té un paper determinant en el manteniment de la integritat estructural i funcional de l'endoteli (Ballabh i col., 2004).

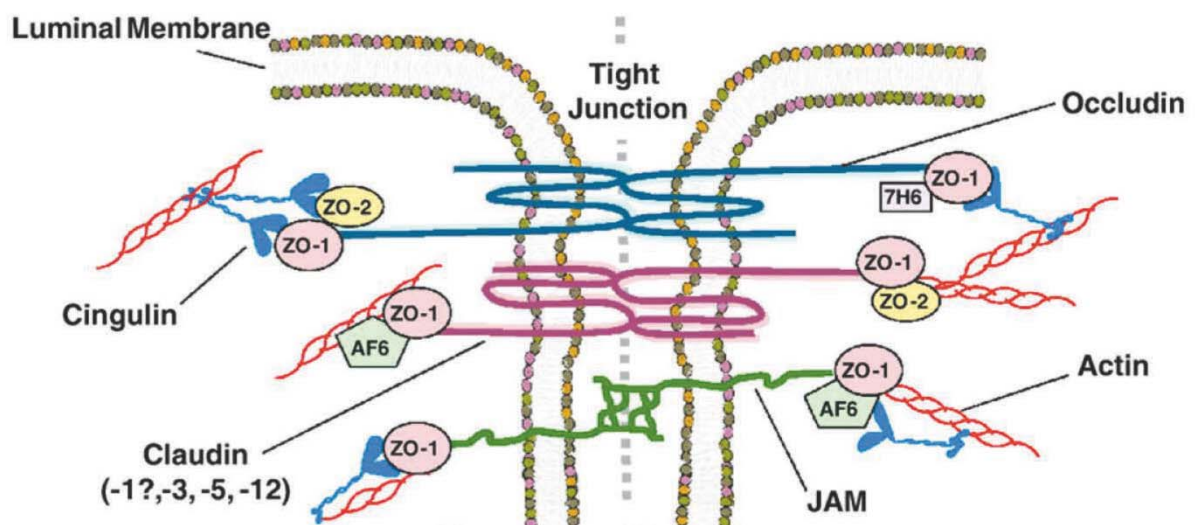


Figura 17a. Esquema de les TJ interendotelials (Modificat de Sandoval i Witt, 2008)

3.1.1.1. Ocludina.

L'occludina és una fosfoproteïna de 60-65 kDa amb 4 dominis transmembrana que es troba a concentracions altes a les TJ (Figura 17a) i s'expressa en una àmplia varietat de teixits, als que sembla que confereix propietats de barrera. La proteïna forma dos bucles extracel·lulars separats per un bucle petit citosòlic, i els seus extrems amino i carboxílic estan situats ambdós al citosol. A les TJ, les molècules d'occludina formen dímers que interaccionen homofilicament (Feldman i col., 2005). La regió carboxiterminal de l'occludina, que codifica per un domini putatiu en espiral-espiral, es pot enllaçar amb diverses proteïnes que influeixen en les seves accions reguladores com per exemple la PKC, la c-Yes, la connexina-26 i la p85 (Nusrat i col., 2000). Aquest extrem carboxiterminal és el que s'uneix a les proteïnes ZO-1, ZO-2 i ZO-3, que a la vegada s'uneixen al citoesquelet d'actina

(Sandoval i Witt, 2008). Estudis fets amb ratolins als que se'ls va eliminar l'occludina van mostrar que els animals presentaven un retard del creixement acompanyat d'un fenotip complex (Saitou i col., 2000). Sorprenentment, les TJ no es veien afectades per la seva absència, i les mesures de resistència elèctrica transepitelial van donar valors normals. De tota manera, els animals presentaven hiperplàsia de l'epiteli gàstric, calcificacions al cervell i atròfia dels testicles, la qual cosa fa pensar que l'occludina desenvolupa funcions importants a nivell fisiològic més enllà de formar part de les TJ.

S'ha proposat que l'estat de fosforilació de l'occludina és un factor determinant en la regulació de la funció de les TJ (Feldman i col., 2005). La forma altament fosforilada de la proteïna es concentra a la membrana cel·lular i les TJ de les que forma part s'identifiquen com a intactes, mentre que la forma menys fosforilada es troba bàsicament a la fracció citoplasmàtica i es pensa que podria servir com a reservori de la proteïna (Sakakibara i col., 1997; Wong, 1997). L'occludina que es troba a la membrana cel·lular té les serines i treonines fosforilades (Andreeva i col., 2001), mentre que la fosforilació de les seves tirosines s'ha identificat amb la seva desvinculació de les proteïnes intracel·lulars (ZO-1, ZO-2 i ZO-3) i amb l'augment de la permeabilitat de les TJ (Kago i col., 2006; Kale i col., 2003). No obstant això, existeix certa discrepància en els papers que pot tenir la fosforilació de l'occludina a cada tipus concret de cèl·lula i davant de diferents estímuls (Sandoval i Witt, 2008).

3.1.1.2. Claudines.

Les claudines són una família de proteïnes que contribueixen a la formació de les TJ i inclouen, com a mínim, 24 membres. Les claudines tenen dos bucles extracel·lulars que s'uneixen amb els de les claudines de les CECC adjacents, formant d'aquesta manera la junta principal de les TJ (Piontek i col., 2008). Són més petites que les ocludines (20 - 24 kDa), i no presenten seqüències homòlogues amb aquestes. Les claudines s'uneixen a les proteïnes ZO mitjançant els seu extrem carboxiterminal (Itoh i col., 1999). D'entre tots els membres de la família, les claudines 3, 5 i 12 s'han detectat a les CECC de la BHE, mentre que hi ha controvèrsia respecte a la presència de la 1 (Zlokovic, 2008) (Figura 17a). Diversos estudis indiquen que la claudina-5 està especialment implicada en la regulació de la permeabilitat a molècules petites de la BHE. S'ha vist que els fàrmacs que augmenten l'expressió de claudina-5 incrementen la resistència transendotelial, disminuint per tant la permeabilitat de la BHE (Honda i col., 2006). A més a més, els ratolins sense el gen que codifica la claudina-5 tenen la integritat de la BHE compromesa, ja que s'ha observat que hi ha un augment al cervell de la captació de molècules menors de 800 Da (Nitta i col., 2003). Sembla que l'activitat de les claudines està regulada per fosforilació, donat que la fosforilació

del seu residu Thr207 mediada per la PKA o la Rho quinasa activa indueix un augment de la permeabilitat de les TJ (Sandoval i Witt, 2008).

3.1.1.3. JAM.

Les JAM són una família de proteïnes de 40 kDa que s'inclouen dins de la superfamília de les immunoglobulines. Les JAM es localitzen a les TJ, i també s'expressen en leucòcits i plaquetes (Bernacki i col., 2008). Les JAM participen en l'acoblament i el manteniment de les TJ, en la senyalització de proteïnes associades al citoesquelet i en la diapedesi dels leucòcits (Weber i col., 2007). S'han identificat varies JAM: JAM-A (també coneguda com JAM, JAM-1, F11R), JAM-B (també coneguda com JAM-2, JAM-2 humana, JAM-3 de ratolí, VE-JAM), JAM-C (també coneguda com JAM-3, JAM-3 humana, JAM-2 de ratolí), i més recentment JAM-4 i JAML (JAM-like o AMICA1) (Sandoval i Witt, 2008). Les JAM tenen un únic domini transmembrana i el seu segment extracel·lular té dos bucles de tipus immunoglobulina formats per ponts disulfur. A nivell d'interaccions intercel·lulars, es pensa que les JAM les poden establir tan homofíliques com heterofíliques (Weber i col., 2007). Al citoplasma, les JAM s'uneixen principalment a les proteïnes intracel·lulars ZO-1, afadina (AF-6), la proteïna de partició defectuosa-3 (PAR-3) i la multiproteïna-PDZ-1 (MUPP-1) (Ebnet i col., 2003). A les CECC s'ha detectat l'expressió de JAM-A, B, i C, essent la JAM-A la més altament expressada en la vasculatura cerebral. A més a més, també s'ha demostrat que les interaccions homofíliques de JAM-A estableixen les TJ i disminueixen la permeabilitat intestinal (Liu i col., 2000; Mandell i col., 2004). Coincidint amb aquestes observacions, s'ha trobat que la pèrdua de la integritat de la BHE deguda a una alteració de les TJ es correlaciona amb una disminució de l'expressió de JAM-A (Yeung i col., 2008).

3.1.1.4. Proteïnes citoplasmàtiques accessòries.

Diverses proteïnes citoplasmàtiques participen en la formació i la regulació de les TJ. Aquestes són la ZO-1, la ZO-2, la cingulina, la 7H6, i l'AF-6 (Hawkins i Davis, 2005), encara que probablement n'hi pugui haver d'altres. La ZO-1 (220 kDa) i la ZO-2 (160 kDa) són fosfoproteïnes de la família de proteïnes *guanilil-quinase-like* associades a membrana i que tenen la capacitat de formar complexos heterodimèrics l'una amb l'altra. Les ZO contenen tres dominis PDZ (PDZ1, PDZ2 i PDZ3), un domini SH3 i un domini *guanilil-quinase-like*. Aquests dominis actuen com regions d'unió a molècules, facilitant així l'organització de les proteïnes a la membrana plasmàtica (Sandoval i Witt, 2008). La ZO-1 interacciona amb la ZO-2 i la ZO-3 a través dels dominis PDZ (Wittchen i col., 1999), tot i que la presència de ZO-3 a les CECC de la BHE no s'ha verificat encara. S'ha descrit que la ZO-2 podria tenir

una funció redundant a la de la ZO-1, substituint-la i contribuint a la formació de TJ més competents i estables (Umeda i col., 2004). El fragment carboxiterminal ric en prolina de les ZO es creu que serveix d'enllaç entre les TJ i el citoesquelet d'actina de les CECC (Fanning i col., 1998). D'aquesta manera, les proteïnes ZO funcionen com a proteïnes de reconeixement que faciliten la ubicació i la unió de les proteïnes transmembrana de les TJ al citoesquelet d'actina de les CECC (Sandoval i Witt, 2008).

S'han identificat altres proteïnes accessòries de les TJ, tot i que encara queden per aclarir alguns aspectes de les seves funcions estructurals i reguladores. La cingulina és una fosfoproteïna de 140-160 kDa localitzada a la superfície citoplasmàtica de les TJ que s'uneix a les proteïnes ZO, la miosina, la JAM-A, i l'AF-6 (Cordenonsi i col., 1999; Bazzoni i col., 2000), de manera que té una funció destacada com a proteïna d'ancoratge. També s'ha suggerit que la cingulina transmet la força mecànica generada per la contracció de l'actina i la miosina del citoesquelet, regulant així la permeabilitat de les TJ (Cordenonsi i col., 1999). La fosfoproteïna 7H6 (155 kDa) es dissocia de forma reversible de les TJ quan hi ha nivells baixos d'ATP, fet que va associat a un augment de la permeabilitat paracel·lular (Zhong i col., 1994; Satoh i col., 1996). Finalment, l'AF-6, de 180 kDa, s'ha vist que interacciona amb la ZO-1 a les TJ (Yamamoto i col., 1999).

3.1.1.5. Actina.

Tot i que l'actina (42 kDa) no és pròpiament una proteïna de les TJ, té un paper actiu en la seva regulació i estabilització (Lai i col., 2005). La forma lliure de la proteïna, que té una estructura globular, polimeritza en una forma filamentosa que s'anomena F-actina, en un procés que requereix ATP. Aquests filaments de F-actina proporcionen la infraestructura necessària per al manteniment de la morfologia i la funció de la cèl·lula. A més a més, a les CECC es detecta una banda prominent de F-actina a la part apical de la cèl·lula que serveix per fixar la disposició espacial de les proteïnes que formen les TJ. La importància del citoesquelet per a l'establiment i el manteniment de la BHE es va fer evident a partir d'estudis en ratolins MDX, als quals els manca la distrofina, que és una proteïna que s'uneix a l'actina. Aquests ratolins presenten un augment de la permeabilitat vascular cerebral deguda a la desorganització del citoesquelet de les CECC i dels astròcits, així com una alteració de la localització subcel·lular de les proteïnes de les TJ de les CECC i del canal d'aigua aquaporina-4 dels processos pediculars dels astròcits (Nico i col., 2003). Aquestes observacions demostren que l'organització dels filaments d'actina i la seva unió a les proteïnes de les TJ són un factor crític per a la correcta funció de la BHE.

3.1.2. Unions adherents.

Les UA tenen una localització més basal que les TJ i constitueixen un segon nivell d'ajust de la unió entre les CECC (Figura 17b). Les UA s'uneixen entre elles mitjançant interaccions homofílques que s'estableixen entre unes proteïnes transmembrana anomenades cadherines (Takeichi, 1995); tanmateix, encara avui es creu que el domini d'unió extracel·lular de les cadherines és insuficient per ell mateix per formar les unions. El domini citoplasmàtic de les cadherines s'uneix a les β , γ i p120-catenines, les quals s'uneixen a l' α -catenina que, al seu torn, s'uneix amb el citoesquelet d'actina, de manera anàloga a com ho fan les ZO en les TJ (Nieset i col., 1997).

Les UA no formen part de les TJ, però sembla que juguen un paper clau en la seva localització i estabilització (Dejana i col., 2008). Tot i que el paper que juguen les UA en les alteracions de la permeabilitat de la BHE en diferents situacions patològiques no es coneix amb detall, s'ha demostrat que les UA interactuen amb el receptor del factor de creixement de l'endoteli vascular 2, fet que les relaciona amb el desenvolupament de processos angiogènics (Lampugnani i col., 2006). Altres estudis han mostrat que l'increment d'expressió de la claudina-5 pot necessitar de la participació de la cadherina de l'endoteli vascular, fet que suggereix que les UA tenen una relació directa amb la integritat de la BHE (Taddei i col., 2008).

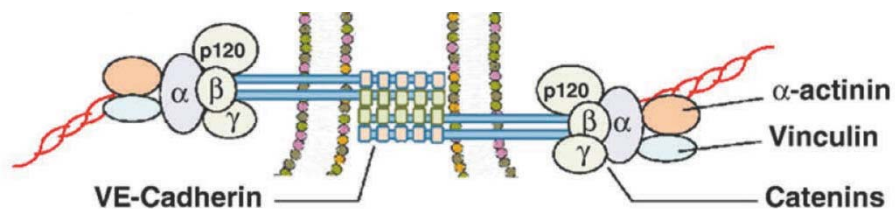


Figura 17b. Esquema de les UA interendotelials (Modificat de Sandoval i Witt, 2008)

3.1.3. Mecanismes de transport.

La BHE mostra una permeabilitat passiva baixa als nutrients hidrosolubles essencials per al SNC. Per això, la BHE conté diversos sistemes específics de transport que en garanteixen un subministrament adequat. Els sistemes de transport específics de les membranes luminal i abluminal de les CECC regulen el trànsit transcel·lular de petites molècules hidrofíliques, de manera que aquestes cèl·lules es comporten com una barrera de transport selectiu que

facilita l'entrada dels nutrients requerits i exclou compostos potencialment nocius per al SNC (Abbott i col., 2010). A la BHE hi ha cinc sistemes bàsics de transport, que són: transport específic, transport d'ions, transport de reflux actiu, transport mitjançant receptor i transport mitjançant caveoles (Zlokovic, 2008).

3.1.3.1. Sistemes de transport específic.

Els sistemes de transport específic permeten incorporar al SNC nutrients com diferents hexoses (glucosa, galactosa), diversos aminoàcids, àcids monocarboxílics (lactat, piruvat, cossos cetònics), nucleòsids (adenosina, guanosina, uridina), purines (adenina, guanina), amines (colina) i vitamines (Hawkins i col., 2006; Simpson i col., 2007; Ohtsuki i Terasaki, 2007; Deeken i Löscher, 2007; Spector i Johanson, 2007). El gradient de concentració dels nutrients és favorable per a l'entrada d'aquests des de la sang cap al cervell, i estan regulats per les necessitats metabòliques cerebrals i la concentració sanguínia dels nutrients.

3.1.3.1.1. Transportador de glucosa de tipus 1.

El transportador de glucosa de tipus 1 (GLUT1) és d'especial importància ja que la glucosa és la font principal d'energia per al cervell (Siesjö, 1978). El GLUT1 (55 kDa) forma part de la família dels transportadors de glucosa independents de sodi, s'expressa exclusivament a la BHE i s'encarrega de transportar glucosa així com d'altres hexoses a través de la BHE (Zlokovic, 2008). La densitat dels transportadors GLUT1 a la membrana abluminal és més gran que a la luminal. Aquesta distribució asimètrica proporciona a la BHE un control homeostàtic dels nivells de glucosa cerebrals i permet evitar una acumulació de glucosa que sobrepassi els nivells plasmàtics (Simpson i col., 2007). L'expressió de GLUT1 és controlada pel factor induïble per hipòxia-1 (HIF-1). Després d'una isquèmia global transitòria, s'ha vist com l'HIF-1 α s'acumula a l'escorça cerebral, generant increments en l'expressió de GLUT1 (Chávez i LaManna, 2002). A més a més, s'ha vist que en condicions prolongades d'hipòxia moderada, el cervell adult s'adapta augmentant la vascularització i incrementant la densitat de GLUT1 a la BHE (Harik i col., 1996).

Les mutacions espontànies al gen que codifica el GLUT1 causen haploinsuficiència del transportador d'hexoses i provoquen la síndrome de GLUT1 en humans. Aquesta síndrome es caracteritza per epilèpsia infantil que, en general, no respon a anticonvulsionants, retard del creixement, microcefàlia, espasticitat, hipotonia i alteracions motores. A més a més, aquests símptomes poden ser variables i agreujar-se en dejú (Klepper i Leiendecker, 2007). De la mateixa manera, els ratolins GLUT1 \pm mostren descàrregues epileptiformes a

l'electroencefalograma, deteriorament de l'activitat motora, manca de coordinació, microcefàlia, disminució de la captació de glucosa al cervell i una forta disminució de l'expressió de GLUT1 als capil·lars cerebrals (Wang i col., 2006). Tant la forma humana com el model de ratolí són bons exemples de trastorns cerebrals provocats per alteracions dels transportadors específics de la BHE.

3.1.3.1.2. MCT1.

El transportador de monocarboxilats 1 (MCT1) s'expressa a la membrana luminal i abluminal de les CECC de la BHE i s'encarrega de transportar lactat i altres monocarboxilats com els cossos cetònics dins i fora del cervell. En un estudi recent en rates amb cetosi induïda per la dieta, es va veure com els nivells d'MCT1 i GLUT1 van augmentar a la BHE, i també es va observar com van incrementar els nivells de cossos cetònics cerebrals sense aparèixer canvis en el flux sanguini cerebral (Puchowicz i col., 2007). Això suggereix que l'increment de transportadors a la BHE, com per exemple el MCT1 i el GLUT1, i no un augment del flux sanguini, és essencial per a que el metabolisme cerebral s'adapti als nivells de metabòlits disponibles en plasma (Zlokovic, 2008).

3.1.3.1.3 Transportadors d'aminoàcids.

Existeixen dos mecanismes de transport facilitat per aminoàcids, que s'anomenen L1 i y+, els quals es troben a les membranes luminal i abluminal de la BHE i garanteixen l'accés de tots els aminoàcids essencials al cervell. El transportador L1 independent de sodi s'encarrega de transportar grans aminoàcids neutres, com per exemple la leucina, la isoleucina, la valina, el triptòfan, la tirosina, la fenilalanina, la treonina i la metionina. El sistema y+ transporta aminoàcids catiónics, com la lisina, l'arginina i l'ornitina (Hawkins i col., 2006). A més a més, existeixen cinc transportadors d'aminoàcids dependents de sodi a la membrana abluminal. Aquests sistemes tenen la capacitat de transferir activament aminoàcids presents al líquid intersticial del cervell (LIC) a les CECC, i des d'allà a la circulació sanguínia. D'aquesta manera, es genera un mecanisme pel qual les concentracions d'aminoàcids al LIC es mantenen aproximadament en un 10% de les concentracions plasmàtiques.

Els transportadors d'aminoàcids excitadors (EAAT, *Excitatory aminoacid transporters*) dependents de sodi EAAT1, EAAT2 i EAAT3 permeten l'eliminació d'aminoàcids potencialment neurotòxics pel cervell, com el glutamat i l'aspartat. Aquests transportadors poden determinar els nivells de glutamat extracel·lular i són essencials per prevenir l'excitotoxicitat (Lipton, 2005). És per això que, actualment, s'està estudiant la possibilitat

d'utilitzar els EAAT com a dianes terapèutiques per reduir els nivells de glutamat en malalties neurodegeneratives agudes i cròniques (Zlokovic, 2008). En aquest sentit, s'ha demostrat que la disminució dels nivells de glutamat en sang mitjançant agents segrestadors o quelants en rates que havien patit un dany cerebral incrementava l'efluència de glutamat del cervell, fet que proporcionava neuroprotecció als animals (Zlotnik i col., 2007).

3.1.3.1.4. Transportadors de vitamines.

Les vitamines com, per exemple, la B1, la B3, la B5, o la E, són transportades en la majoria dels casos per transportadors específics individuals a través de la BHE o del plexe coroide. L'excepció és el transportador de multivitamines dependent de sodi, que és capaç de transportar la biotina, l'àcid pantotènic i l'àcid lipoic (Spector i Johanson, 2007).

3.1.3.2. Sistemes de transport d'ions.

La BHE té una gran densitat de mitocondries, que reflecteix les altes demandes d'energia dels transportadors dependents d'ATP, com la bomba de Na^+/K^+ , que es troba a la cara abluminal de la BHE i regula l'entrada de Na^+ cap al LIC a canvi de K^+ , contribuint a mantenir un gradient elevat de Na^+ a la BHE que permet la funció dels transportadors que depenen d'aquest ió (Vorbrot, 1988; Zlokovic, 2008). D'altra banda, el cotransportador de Na^+ , K^+ i 2Cl^- es localitza bàsicament a la membrana luminal de la BHE (O'Donnell i col., 2006), i s'encarrega de transportar aquests ions des de la sang a l'interior de les CECC. A més a més, també trobem l'intercanviador de Na^+/H^+ a la membrana luminal i l'intercanviador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a les dues membranes, els quals tenen un paper clau en la regulació del pH intracel·lular de les CECC (Taylor i col., 2006). D'altra banda, l'intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ també està present a la BHE on, en condicions normals, s'encarrega de regular la sortida de Ca^{2+} de les CECC, tot i que en situacions patològiques o d'alteració dels gradients de Na^+ pot tenir la funció contrària (Zlokovic, 2008).

3.1.3.3. Sistemes de transport de reflux actiu.

Hi ha una gran quantitat de molècules que tenen una taxa d'entrada al SNC molt més baixa de la que es podria esperar d'acord amb el seu caràcter lipòfil (Abbott i col., 2010). Aquestes substàncies, i molts dels seus metabòlits, són activament eliminats del cervell pels transportadors *ATP-binding cassette* (ABC) (Begley, 2004). En humans, els ABC són una superfamília de proteïnes que conté 48 membres, els quals s'agrupen en 7 subfamílies segons la seva homologia estructural (Dean i col., 2001). Dins dels ABC, el transportador de

resistència a multidrogues glicoproteïna-P (P-gp) és una bomba dependent d'ATP que pot eliminar ràpidament diversos metabòlits lipòfils tòxics, així com diversos medicaments amfipàtics catiònics (Löscher i Potschka, 2005; Hermann i Bassetti, 2007). Estudis recents d'immunocitoquímica en rata i teixit cerebral humà han revelat que la P-gp s'expressa tant a la membrana luminal com a l'abluminal de la BHE, així com als perícits i als astròcits (Bendayan i col., 2006). A l'interior de les cèl·lules, la P-gp es distribueix al llarg de l'embolcall nuclear, en vesícules citoplasmàtiques, en el complex de Golgi i en el reticle endoplasmàtic rugós (Abbott i col., 2010). Altres transportadors amb funcions similars a les de la P-gp són les proteïnes associades a resistència a multidrogues ABCC1, 2, 4, 5 i, possiblement, 3 i 6, i la proteïna de resistència al càncer de mama ABCG2 (Begley, 2004; Kamiie i col., 2008). Tots aquests transportadors tenen la possibilitat de treballar conjuntament per reduir la penetració de diversos fàrmacs al cervell així com per augmentar la seva efluència. El possible paper dels transportadors ABC en la patogènesi i tractament de diferents trastorns cerebrals és cada vegada més reconegut i suscita un interès creixent (Zlokovic, 2008).

3.1.4. Barrera metabòlica.

Les CECC, juntament amb els astròcits i els perícits, confereixen propietats de barrera metabòlica a la BHE, ja que expressen una sèrie d'enzims que modifiquen molècules endògenes i exògenes que d'altra manera podrien creuar la barrera física i afectar negativament la funció neuronal (Pardridge, 2005). Alguns d'aquests enzims, com les aminopeptidases i les endopeptidases, poden metabolitzar diferents pèptids, mentre que les nucleosidases poden metabolitzar l'ATP. Altres enzims intracel·lulars com la monoamino-oxidasa i el citocrom p450 poden desactivar diversos compostos neuroactius tòxics (el-Bacha i Minn, 1999).

3.2. Unitat neurovascular.

Les CECC i les TJ, el lloc anatòmic de la BHE, conjuntament amb la membrana basal endotelial, els perícits, els astròcits, la micròglia i les neurones formen una unitat funcional, sovint anomenada com a "unitat neurovascular", que es considera com la unitat bàsica i funcional de la BHE (Figura 18A) (Abbott i col., 2006; Zlokovic, 2008). La proximitat de les CECC amb els diferents tipus de cèl·lules gials i amb les neurones permet una regulació paracrina eficaç que és crítica per al bon funcionament del SNC (Zlokovic, 2008). Una

alteració d'aquesta coordinació pot ser clau en diverses malalties (Abbott i col., 2010). Les principals funcions que són regulades conjuntament per les diverses cèl·lules que integren la unitat neurovascular són l'acoblament hemodinàmic neurovascular, la permeabilitat microvascular, les interaccions amb la MEC, la inactivació de neurotransmissors, els acoblaments neurotròfics i la coordinació angiogènica i neurogènica (Figura 18B).

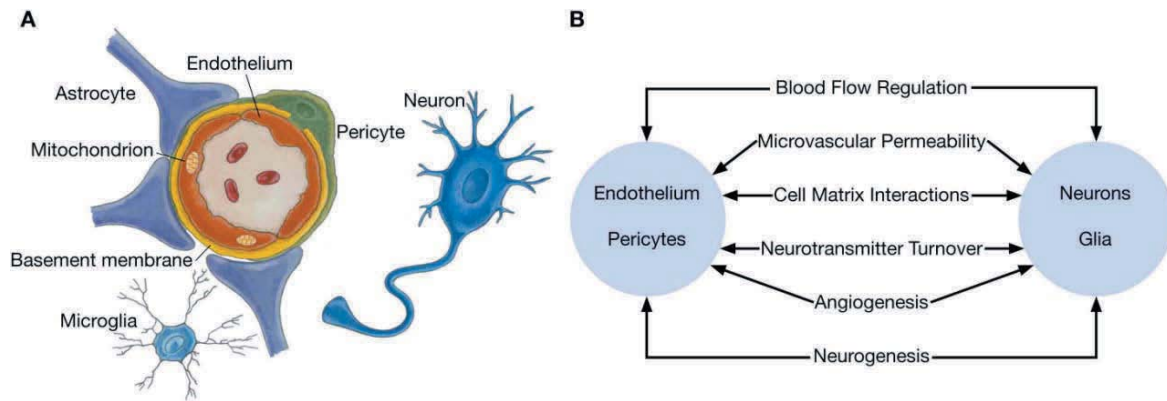


Figura 18. Esquema de la unitat neurovascular i les seves funcions (Zlokovic, 2008)

3.2.1. Perícits.

Els perícits són cèl·lules perivasculars que pertanyen al llinatge de les cèl·lules del múscul llis vascular. Estan separats de les CECC per la membrana basal i tenen nombrosos processos citoplasmàtics que envolten gran part de la paret dels capil·lars, en concret entre el 30 % i el 70 % de la seva superfície. Al cervell hi ha gran quantitat de perícits respecte les CECC (proporció 1:3, respectivament) en comparació, per exemple, al múscul estriat, on la proporció és d'un pericit per cada 100 CECC (Zlokovic, 2008). Els perícits, mitjançant els seus processos, estableixen punts de contacte focal amb les CECC mitjançant unions especialitzades, fet que fa pensar que influeixen de diverses maneres en la microcirculació cerebral (von Tell i col., 2006). Algunes de les funcions dels perícits són proporcionar estabilitat mecànica (von Tell i col., 2006); l'alliberament de factors que promouen la diferenciació i quiescència de les CECC (Armulik i col., 2005); l'alliberament de factors de creixement i angiogènics que regulen la permeabilitat, la remodelació i l'angiogènesi dels capil·lars (Dore-Duffy i LaManna, 2007); i la regulació del flux sanguini dels capil·lars per contracció i relaxació (Peppiatt i col., 2006). També s'especula que poden participar en el desenvolupament d'alteracions neurològiques en situacions d'hipertensió, diabetis, formació de tumors al SNC, a l'esclerosi múltiple (EM) i a la MA (Zlokovic, 2008).

3.2.2. Astròcits.

Els astròcits són les cèl·lules més abundants del cervell. Les seves funcions no es limiten a proporcionar suport tròfic, metabòlic i estructural a les neurones, sinó que, a més a més d'establir una comunicació complexa amb aquestes, participen activament en la senyalització sinàptica, la regulació del flux sanguini i la modulació dels precursors neuronals al SNC adult (Blackburn i col., 2009). En situacions de dany agut o crònic del SNC, els astròcits adquireixen un estat reactiu (astrogliosi reactiva) en el que aquestes cèl·lules mostren hipertrofia i un augment de diverses molècules com la proteïna GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) i la NOS. S'ha vist que, en situacions patològiques, l'astrogliosi reactiva té una funció protectora, ja que la seva manca provoca un augment de la mort de neurones i oligodendròcits i de la infiltració inflamatòria, una menor recuperació de la BHE i un agreujament dels dèficits funcionals (Faulkner i col., 2004). D'altra banda, els astròcits reactius formen una cicatriu que a la llarga suprimeix la regeneració axonal. Així, sembla que l'astrogliosi pot tenir una funció protectora en situacions de dany agut, però que acaba esdevenint perjudicial en processos relacionats amb l'edat com les malalties neurodegeneratives (Blackburn i col., 2009).

Els astròcits es comuniquen mitjançant les seves digitacions amb la resta de cèl·lules que componen la unitat neurovascular. Els astròcits regulen algunes de les funcions especialitzades de les CECC com la formació de TJ, la localització de transportadors i la producció d'enzims antioxidants. A més a més, poden secretar molècules angiogèniques que regulen la funció dels capil·lars (Abbott i col., 2006). A la vegada, les CECC poden produir factors que indueixen la diferenciació dels astròcits (Mi i col., 2001). Les projeccions dels astròcits contenen diverses proteïnes com el canal d'aigua anomenat aquaporina 4, el transportador de glucosa GLUT1 i el canal de potassi Kir4.1 que participen en l'homeòstasi de l'aigua cerebral, de la glucosa i de ions (Ke i col., 2001). Els astròcits també contribueixen a l'acoblament neurovascular, el qual permet sincronitzar les demandes metabòliques de les neurones amb la regulació del flux sanguini dels capil·lars (Zlokovic, 2008), i poden col·laborar a la vasodilatació induïda per l'alliberament neuronal de glutamat mitjançant la producció de prostanoides (Takano i col., 2006).

3.2.3. Micròglia.

La micròglia és un tipus de cèl·lules glials que té un paper crític a les respostes immunitàries innates i adaptatives del SNC. Aquestes cèl·lules s'originen a partir de cèl·lules

mesenquimals leptomeníngees que entren al cervell i es transformen en micròglia (Bechmann i col., 2007). També s'ha vist que, en casos de degeneració axonal aguda, els monòcits circulants que s'infiltra a l'interior del cervell es poden transformar en micròglia (Bechmann i col., 2005). En absència de patologia, la micròglia es troba en estat de repòs en forma de cèl·lules petites amb processos llargs i prims. Quan s'activa, perd aquesta forma ramificada, i passa tenir una forma ameboide que evoluciona cap a una forma final fagocítica. Paral·lelament, experimenta canvis en l'expressió d'antígens de superfície i en l'alliberació de citoquines.

3.2.4. Membrana basal.

Tot i no formar part de manera explícita de la BHE, la membrana basal dóna suport a la vasculatura cerebral i separa les CECC de les cèl·lules veïnes, és a dir, perícits i astròcits. La membrana basal es compon de diferents proteïnes estructurals de la MEC com ara el col·lagen, la fibronectina, l'heparan-sulfat, la laminina i diversos proteoglicans condroitina sulfat. Les CECC, els perícits i els astròcits cooperen per generar i mantenir la membrana basal i les propietats de la BHE. Les CECC, juntament amb les neurones i les cèl·lules glials de suport (micròglia, oligodendròglia i astròcits), expressen receptors d'adhesió de matriu, entre els que hi ha la família de receptors d'integrina i de distroglicans. Les funcions d'aquests receptors s'estan començant a estudiar, i s'ha vist que les integrines tenen un paper clau en la senyalització endotelial, la migració cel·lular i la formació dels tubs de capil·lars durant l'angiogènesi (del Zoppo i col., 2006; Zlokovic, 2008). Els receptors d'adhesió de matriu, juntament amb alguns dels seus lligands i la pròpia MEC, poden experimentar alteracions en alguns processos patològics com la isquèmia cerebral focal, l'EM, l'ELA i certs tumors del SNC, així com durant malformacions arteriovenoses (Rascher i col., 2002; Jian Liu i Rosenberg, 2005).

3.3. Òrgans circumventriculars i plexe coroide.

Els òrgans circumventriculars (OCV) són estructures especialitzades del cervell que estan localitzades al voltant del tercer i quart ventricles. Els OCV, a diferència de la resta del parènquima cerebral, tenen una vascularització elevada i no presenten BHE, de manera que són accessibles a traçadors administrats per via intravenosa (Broadwell i col., 1983). Els capil·lars dels OCV són fenestrats i permeten la difusió lliure de macromolècules i soluts polars entre la sang i l'espai perivascular, de manera que les neurones es poden exposar a

senyals perifèrics (Schulz i Engelhardt, 2005). Actualment es considera que hi ha vuit OCV: tres de sensorials, quatre de secretors i un que resta sense classificar. Els OCV sensorials inclouen l'òrgan subformical (SFO, *Subfornical organ*), l' *organum vasculosum of lamina terminalis* (OVLT) i l'àrea postrema (AP). Les neurones d'aquests OCV actuen com a sensors neuroquímics, ja que poden generar respostes a partir de la detecció de substàncies transportades per la sang. A més a més, l'OVLT també pot actuar com a secretor. L'SFO està involucrat en la sensació de set en resposta a un augment de l'osmolaritat; l'OVLT està relacionat amb el control de l'homeòstasi; i l'AP estimula el vòmit quan detecta substàncies tòxiques. Per altra banda, els OCV secretors inclouen la neurohipòfisi (NLP, *Neural lobe of the pituitary gland*), l'eminència mitjana (ME, *Median eminence*), la glàndula pineal (PI, *Pineal gland*) i l'òrgan subcomissural (SCO, *Subcommissural organ*). Aquest últim a vegades no es considera un OCV, donat que no té capil·lars fenestrats (Sisó i col., 2010). La NLP allibera hormona antidiürètica i oxitocina que actuen a nivell del ronyó i de la musculatura uterina respectivament; la ME allibera hormones que actuen sobre la part anterior de la glàndula pituïtària; la PI regula els ritmes circadianis mitjançant la síntesi de melatonina; i l'SCO secreta diverses proteïnes al LCR (Johanson i col., 2011).

El plexe coroide (CP, *Choroid plexus*) és una estructura vellosa que es troba ancorada als ventricles tercer, quart i lateral. EL CP es considera a vegades un OCV, tot i que, a diferència d'aquests, no presenta teixit nerviós (Sisó i col., 2010). La seva funció principal és la secreció del LCR. Està format per una àmplia xarxa de capil·lars fenestrats englobats a l'interior d'una capa en forma de bossa formada per un epitel·li cúbic. Aquest epitel·li conté TJ, de manera que restringeix la difusió cap a dins dels ventricles de les substàncies que arriben pels capil·lars. És per això que el CP constitueix una barrera entre la sang i el LCR (BCSFB, *Blood-cerebrospinal fluid barrier*). La majoria dels soluts creuen la BCSFB mitjançant transport transcel·lular actiu, mentre que només una petita part ho fa per difusió passiva per via paracel·lular. Algunes de les funcions de les cèl·lules epitel·lials del CP són: mantenir la concentració iònica als ventricles, eliminar productes de desfeita del SNC com anions i pèptids, metabolitzar substàncies per impedir la seva entrada al LCR, regular la capacitat immunitària del LCR, transportar de forma activa substàncies com l'àcid fòlic i la vitamina C per mantenir-ne una concentració més elevada al LCR respecte del plasma sanguini i participar en la regulació neuroendocrina (Johanson i col., 2011).

3.4. Alteracions de la BHE en les malalties neurodegeneratives.

Les alteracions de la BHE estan pràcticament involucrades a totes les malalties neurodegeneratives. La pregunta que sorgeix és si aquestes alteracions són les responsables de la patologia, participen a la seva progressió, o bé només en són conseqüència, ja que la seva resposta pot tenir implicacions significatives. En models d'AVC, per exemple, s'ha vist que les alteracions de la BHE estan a l'inici de la pèrdua neuronal (Gasche i col., 2006). Altres estudis també proposen, en el que es coneix com la hipòtesi neurovascular de la malaltia, que la disfunció de la BHE acaba desencadenant la MA. En aquest cas, la fallida del mecanisme d'eliminació del pèptid A β provocaria la seva acumulació al cervell, de manera que la disfunció vascular seria prèvia a la neurodegeneració. Així, segons aquesta hipòtesi, la disfunció de la BHE actuaria com a causa en la progressió de la MA (Carvey i col., 2009). De fet, recentment s'han documentat, en pacients de la MA, diverses alteracions de l'anatomia vascular com l'atròfia dels capil·lars i arterioles cerebrals, el trencament de la membrana basal, l'augment de vesícules pinocítiques a les CECC i la reducció de la densitat de la microvasculatura (Bell i Zlokovic, 2009). Finalment, també s'ha proposat que la disfunció de la BHE jugaria un paper destacat a la progressió de la EM i que estaria present als estadis més inicials de la MP (Carvey i col., 2009).

En els exemples comentats anteriorment, la disfunció de la BHE afecta a la seva capacitat per eliminar toxines i evitar els processos inflamatoris, i permet l'entrada d'elements de la circulació sanguínia perifèrica com components del sistema del complement, toxines, monòcits, metalls i altres substàncies. Aquests elements normalment no estan presents al cervell ja que la BHE evita que hi puguin accedir, i poden contribuir a la progressió de les malalties neurodegeneratives. La disfunció de la BHE també pot alterar el balanç iònic entre el cervell i la sang, el funcionament dels seus sistemes de transport i l'activitat de les proteïnes involucrades a la barrera metabòlica. A la vegada, facilita la pèrdua de quimiocines, metabòlits i neurotransmissors necessaris per la funció neuronal. Per tant, es posa de manifest que l'alteració de la BHE és un element crític i que cal considerar a l'hora d'entendre la progressió de les malalties neurodegeneratives.

3.5. La BHE en el model del 3-NPA.

Alguns estudis d'extravasació realitzats en rosegadors indiquen que la intoxicació amb 3-NPA pot provocar alteracions de la BHE. En aquests estudis, les substàncies utilitzades com a traçadores han estat molècules presents de forma natural a la sang, com l'albumina (Hamilton i Gould, 1987a) i l'IgG i els factors del complement (Nishino i col., 1995, 1997), o colorants fluorescents injectats a la circulació sanguínia abans del sacrifici dels animals com el blau d'Evans (BE) (Kim i col., 2003) o el blau tripà (Reynolds i Morton, 1998). Hamilton i Gould (1987a) van administrar a rates SD una única dosi de 3-NPA de 30 mg/kg per via subcutània i, un cop aquestes mostraven somnolència i immobilitat, les van dividir en dos grups que van sacrificar entre 0,5 i 1 hora o entre 2,5 i 3,5 hores després. En ambdós casos van detectar extravasació d'albumina, tot i que en el grup sacrificat més tard l'extravasació va ser molt més evident. Nishino i col. van fer servir pautes diferents en els seus treballs. Al 1995 van administrar a rates Wistar una dosi de 15 mg/kg tres cops per setmana, i van sacrificar els animals a 1, 2 i 4 setmanes de tractament. Seguint aquesta pauta d'administració, van detectar extravasació d'IgG i factors del complement només en els animals que van rebre 4 setmanes de tractament. Al 1997 van injectar a rates Wistar una dosi de 20 mg/kg diària per via subcutània durant dos o tres dies, i van sacrificar els animals tan bon punt mostraven signes d'intoxicació. En aquest cas, van detectar extravasació d'IgG a partir de les 2 hores després de la segona administració. Kim i col. (2003) van injectar estereotàxicament al cos estriat dret de ratolins CD-1 300 nmols de 3-NPA dissolts en 0,5 µl de solució salina, i van sacrificar els animals 4, 8 o 24 hores després. A les 4 hores ja es va detectar extravasació de BE, la qual va augmentar a les 8 hores i es va mantenir a les 24 hores. Finalment, Reynolds i Morton (1998) van administrar a rates SD una dosi inicial de 12 mg/kg per via subcutània que van augmentar en 3 mg/kg cada quatre dies de tractament. Aquesta pauta va ser administrada fins que els animals van mostrar alteracions motores, moment en el que es va suposar que ja s'havia produït la lesió estriatal. Llavors el tractament amb 3-NPA es va aturar i les rates es van deixar recuperar durant 4 setmanes, moment en el que es van sacrificar. Els investigadors van descriure que l'extravasació de blau tripà ja era visible a les dues hores després de l'inici de la simptomatologia, i que es mantenia fins a les quatre setmanes després de la formació de la lesió. En tots els estudis comentats, la detecció de les substàncies estudiades a l'àrea lesionada del cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA es va associar a alteracions de la BHE que implicaven un augment de la seva permeabilitat.

Aquests canvis de permeabilitat podrien estar relacionats amb alteracions en l'activitat de les metal·loproteïnases de matriu (MMP). Les MMP pertanyen a una família d'endopeptidases dependents de Zn^{2+} en la que hi ha incloses gelatinases i colagenases entre d'altres. Aquestes proteïnes se sintetitzen com a zimògens que s'activen per proteòlisi, i la seva funció principal és la d'hidrolitzar proteïnes de la MEC (Rivera i col., 2002). La MMP-9, que també s'anomena gelatinasa B, és produïda per les neurones del cervell en condicions normals, i intervé en la regulació de la seva plasticitat. Per altra banda, la MMP-9 pot sobreactivar-se en situacions patològiques com l'AVC o en casos de traumatisme, de manera que esdevé perjudicial per al teixit cerebral (Michaluk i Kaczmarek, 2007). Juntament amb la MMP-2, que també s'anomena gelatinasa A, la MMP-9 es pot activar en situacions d'estrès oxidatiu (Rajagopalan i col., 1996) i degradar la làmina basal i les proteïnes de les TJ com les claudines, l'occludina i les ZO (Yang i col., 2007; Yu i col., 2008). Ambdues estan involucrades, a més a més, en la disfunció de la BHE associada a l'estrès oxidatiu que s'observa en condicions d'isquèmia cerebral (Gasche i col., 2001; Pustovrh i col., 2005).

Pel que fa al model experimental del 3-NPA, el paper de la MMP-2 i la MMP-9 en la lesió estriatal induïda per la toxina ha estat estudiat per Kim i col. (2003). En aquest treball, es va observar que el 3-NPA va induir l'expressió i l'activació de MMP-9 a l'estriat lesionat, mentre que no es va detectar l'activació de la MMP-2. A partir de les quatre hores després de l'administració del 3-NPA, l'augment de l'activació de la MMP-9 va anar acompanyat d'un augment de la permeabilitat de la BHE, i també es va establir una relació espacial entre l'aparició de les ROS i l'expressió de la MMP-9. D'aquesta manera, es va concloure que l'expressió i activació de la MMP-9 mediada per les ROS podia estar relacionada amb la disfunció de la BHE i la progressió de la lesió estriatal induïda per l'administració del 3-NPA.

II. OBJECTIUS

L'administració de 3-NPA a rosegadors com rates o ratolins constitueix un model experimental que replica el fenotip de diverses malalties neurodegeneratives que es caracteritzen per la degeneració dels nuclis caudat i putamen del cervell dels pacients afectats. Aquest model experimental s'ha utilitzat bàsicament per a l'estudi de la MH, malaltia que, tot i tenir el seu origen en un defecte genètic, presenta unes manifestacions clíniques similars a les que produeix el 3-NPA i comparteix amb la toxina alguns dels mecanismes responsables de la neurodegeneració que s'observa a la malaltia. A nivell neuronal, la inhibició del CCRM II per part del 3-NPA produeix una disminució de la seva producció d'energia. Aquest fet posa en marxa mecanismes d'excitotoxicitat secundària i producció de ROS que es manifesten principalment a les neurones del cos estriat dels animals tractats i provoquen la seva mort a través de diferents mecanismes efectors, com l'activació de caspases per la via de l'apoptosi relacionada amb la possible reactivació del cicle cel·lular. D'altra banda, l'administració de la toxina pot provocar alteracions a nivell dels vasos sanguinis i de la permeabilitat de la BHE en les regions estriatals lesionades.

Aquest treball inclou dos grans objectius, els quals es poden desglossar en diferents objectius concrets.

El primer objectiu consisteix en estudiar la reactivació del cicle cel·lular com a possible mecanisme involucrat en la degeneració neuronal associada a l'administració de 3-NPA. Per a desenvolupar aquest objectiu, s'han plantejat els següents objectius concrets:

- Estudiar la possible reactivació del cicle cel·lular a la lesió estriatal derivada de l'administració de 3-NPA mitjançant la detecció de les proteïnes reguladores de la seva fase G1 com la CyD, la CDK4, la CyE, la CDK2 i del factor de transcripció E2F1.
- Determinar l'expressió i la distribució a la lesió estriatal de la forma activa de la caspasa-3 i el marcador TUNEL, indicador de fragmentació irreversible de l'ADN, ambdós utilitzats com a marcadors de mort neuronal.
- Estudiar l'expressió conjunta de marcadors de cicle i mort cel·lulars a les neurones de la lesió estriatal.
- Avaluat la implicació de les proteïnes ATM, p53, Akt i GSK3 β en la reactivació del cicle cel·lular i en la degeneració neuronal.

El segon objectiu consisteix en estudiar la disfunció de la BHE a les àrees lesionades del cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA. Per a desenvolupar aquest objectiu, s'han plantejat els següents objectius concrets:

- Determinar les àrees del cos estriat en les que hi ha un augment de la permeabilitat dels vasos sanguinis mitjançant estudis d'extravasació.
- Estudiar la integritat de la BHE mitjançant el marcatge immunohistoquímic de les cèl·lules endotelials, la làmina basal i les proteïnes de les TJ.
- Estudiar la possible implicació de l'activitat gelatinasa de la MMP-2 i la MMP-9 en les alteracions de la BHE que es produeixen en les regions lesionades del cos estriat.

En l'apartat de resultats es presenten en primer lloc els referents al primer gran objectiu i posteriorment els referents al segon gran objectiu, malgrat que el desenvolupament de la part experimental s'ha realitzat en paral·lel.

III. RESULTATS

ARTICLE 1

**CELL CYCLE ACTIVATION IN STRIATAL NEURONS FROM HUNTINGTON'S
DISEASE PATIENTS AND RATS TREATED WITH 3-NITROPROPIONIC ACID**

Carme Pelegrí, Joaquim Duran-Vilaregut, Jaume del Valle, Natàlia Crespo-Biel,
Isidre Ferrer, Mercè Pallàs, Antoni Camins i Jordi Vilaplana

International Journal of Developmental Neuroscience 2008; 26: 665-671

RESUM

Objectius: Determinar l'expressió de proteïnes del cicle cel·lular de la fase G1 com els complexos CyD-CDK4 i CyE-CDK2 i del factor de transcripció E2F1 al cos estriat de rates tractades amb 3-NPA, toxina que s'ha utilitzat àmpliament per desenvolupar models experimentals de la MH. A més a més, analitzar l'expressió d'E2F1 i de CyD en mostres humanes de la MH.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates SD de 220-250 g de pes. El model experimental es va induir administrant a les rates una dosi de 3-NPA de 20 mg/kg per via intraperitoneal durant 3 dies (dia 0, 1 i 2). Al mateix temps, un grup control va rebre únicament solució salina. El dia 6, es van anestessiar els animals, es van perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció del seu encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a -80 °C. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos dirigits contra la CDK2, la CDK4, l'E2F1, la CyD1, la CyE i l'antigen del nucli neuronal (NeuN, *neuronal nuclei antigen*), per visualitzar les neurones. Les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal. Les mostres cerebrals humanes, fixades en formol al 4% en les autòpsies, es van homogenitzar i preparar per a Western-blot, on es van utilitzar anticossos dirigits contra l'E2F1 i la CyD1.

Resultats: Els animals tractats amb 3-NPA van presentar una pèrdua important de pes respecte dels animals control, que es correlacionava positivament amb la seva afectació motora, i el seu cervell va mostrar una lesió important a la zona dorsal del cos estriat. Els animals control i les zones estriatals no afectades per la toxina dels animals tractats van mostrar un marcatge molt lleu o absent de les diferents proteïnes estudiades. En canvi, a la zona estriatal lesionada de les rates tractades es va detectar marcatge positiu corresponent a la CDK2, la CDK4, la CyE i també al factor E2F1 (Figura 19). El marcatge corresponent a la CDK4 va ser el que es va detectar amb més intensitat. Seguidament, el marcatge de la CDK4 es va combinar amb el del NeuN, i es va veure que totes les cèl·lules que expressaven la CDK4 també eren positives per a NeuN. Finalment, es va comprovar que totes les cèl·lules positives per a la CDK4, que eren neurones, ho eren també per a la CyD1, la seva ciclina activadora (Figura 20).

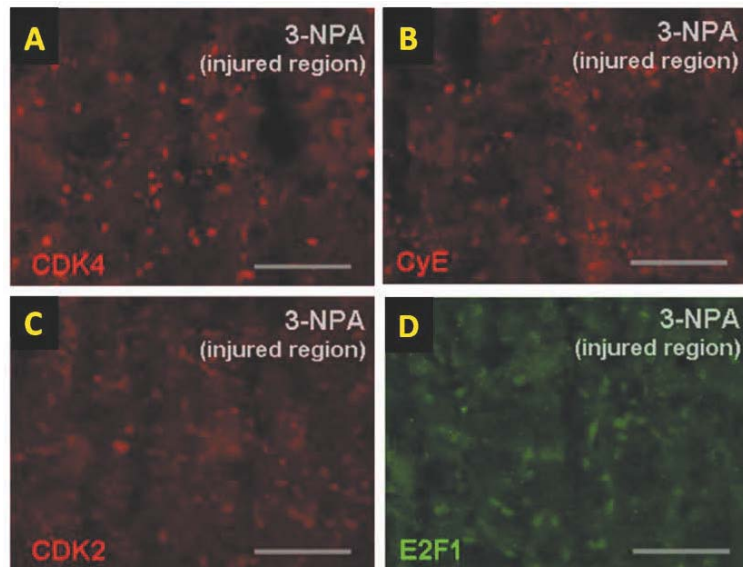


Figura 19. Marcatge de CDK4, CyE, CDK2 i E2F1 en el cos estriat de rates tractades amb 3-NPA. Imatges representatives del cos estriat de rates tractades amb 3-NPA (A, B, C, D) després de realitzar un marcatge immunohistoquímic de CDK4 (A), CyE (B), CDK2 (C) i E2F1 (D). Les imatges corresponen a la zona lesionada del cos estriat dels animals tractats. Barra d'escala: 100 μm.

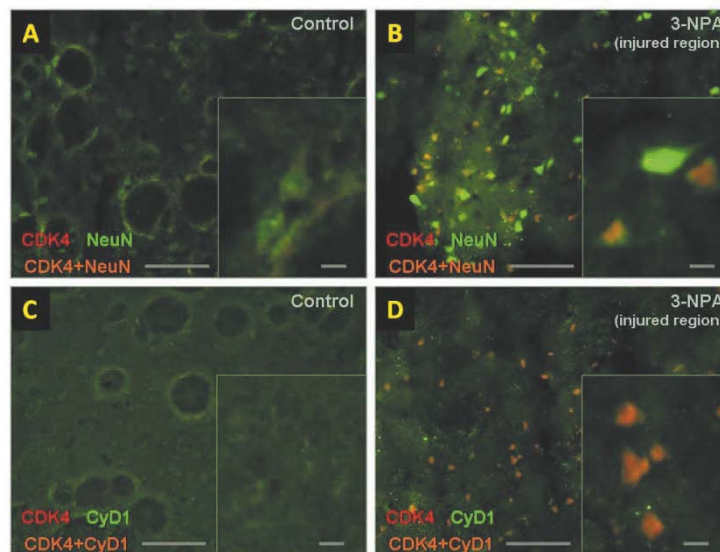


Figura 20. Marcatge doble de CDK4 amb NeuN i CyD1 en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA. Imatges representatives del cos estriat de rates control (A, C) i tractades amb 3-NPA (B, D) després de realitzar un marcatge immunohistoquímic de CDK4 i NeuN (A, B) i CDK4 i CyD1 (C, D). En els animals tractats amb la toxina, les imatges corresponen a la zona lesionada del seu cos estriat. Barra d'escala: 100 μm. Insets: 10 μm.

En els estudis realitzats amb mostres cerebrals humanes de pacients de la MH, es va trobar sobreexpressió de la CyD1 i de l'E2F1 (Figura 21).

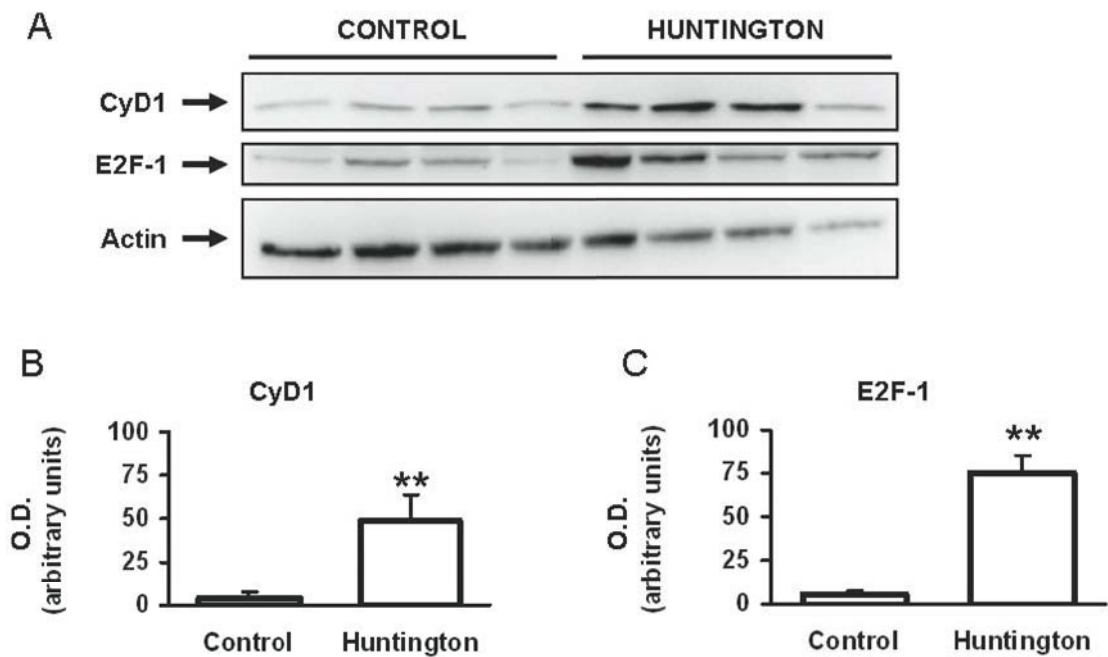
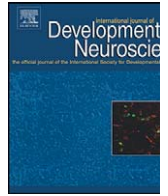


Figura 21. Expressió de CyD1 i E2F1 en mostres de cervells de pacients de la MH. A) Western-blot representatiu de l'expressió de CyD1 i E2F1. B i C) Densitat òptica (O.D.) de la CyD1 i de l'E2F1 en pacients control i en pacients de la MH. Els resultats s'expressen en mitjana + SEM. ** $p < 0.01$ vs control.

Conclusions: Per una banda, aquest estudi indica que el tractament amb 3-NPA indueix l'expressió d'elements de la fase G1 del cicle cel·lular que poden ser responsables de la reactivació del cicle cel·lular. A més a més, l'anàlisi de mostres humanes de cervells de pacients de la MH va mostrar la sobreexpressió de CyD i E2F1. Així, es va concloure que la reactivació del cicle cel·lular podia ser un mecanisme implicat a la neurodegeneració observada tant al model del 3-NPA com als cervells dels pacients afectats de MH.



Cell cycle activation in striatal neurons from Huntington's disease patients and rats treated with 3-nitropropionic acid

Carme Pelegrí^{a,d}, Joaquim Duran-Vilaregut^{a,d}, Jaume del Valle^{a,d}, Natàlia Crespo-Biel^{b,d}, Isidre Ferrer^{c,d}, Mercè Pallàs^{b,d}, Antoni Camins^{b,d}, Jordi Vilaplana^{a,d,*}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^c Institut de Neuropatologia, IDIBELL - Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain

^d CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2008

Received in revised form 28 July 2008

Accepted 28 July 2008

Keywords:

Huntington's disease

Apoptosis

Cell cycle

Striatum

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the potential role of cell cycle re-entry in an experimental model of Huntington's disease and in human brain samples. We found that after treatment of rats with the mitochondrial neurotoxin 3-nitropropionic acid, the expression of cell cycle markers of G1 phase measured by immunohistochemistry was induced in the striatal brain region. Furthermore, we detected an increase in the nuclear and also cytoplasmatic E2F-1 expression, suggesting that this protein could activate the apoptotic cascade in rat brain. Western blot analysis of post-mortem brain samples from patients also showed an increase in the expression of E2F-1 and cyclin D1 in comparison with control samples. These results indicate that cell cycle re-entry is activated in Huntington's disease and may contribute to the neurodegenerative process.

© 2008 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The molecular basis of neuronal cell death mediated by mitochondrial dysfunction is an area of intensive research. Thus, a common characteristic of all experimental neurodegenerative models, and also of human illness, is the evidence of the dramatic increase in oxidative stress mediated by mitochondrial alteration (Pallàs and Camins, 2006; Camins et al., 2008). Activity inhibition of mitochondrial electron chain complexes with neurotoxins leads to loss of ATP synthesis and constitutes suitable experimental models of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) and Huntington's disease (HD) (Manfredi and Beal, 2007). Some neurotoxins used are 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), that inhibits mitochondrial complex I; and 3-nitropropionic acid (3-NPA), a fungal toxin that irreversibly

inhibits succinate dehydrogenase of complex II (Brouillet et al., 1998, 2005; Bizat et al., 2003; Vila and Przedborski, 2003; Przedborski et al., 2004).

In addition to oxidative stress, in the last years the expression of neuronal cell cycle proteins in the central nervous system of patients with neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease (AD), PD and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) has been demonstrated (Nunomura et al., 2007; Woods et al., 2007). Moreover, unusual expression of cell-cycle proteins in the central nervous system in other neurological disorders such as Pick's disease, progressive supranuclear palsy, Down's syndrome and stroke has also been observed (Camins et al., 2006). Evidence for cell cycle re-entry in neurons includes the activation of cyclin-dependent kinases (CDKs) and the expression of the transcription factor E2F-1 (Krantic et al., 2005; Camins et al., 2007). Likewise, the expression of proteins involved in cell cycle regulation is not only limited to the central nervous system of patients with neurodegenerative diseases, but they are also expressed in the hippocampus of schizophrenic patients (Nunomura et al., 2007). These data are consistent with the idea that both oxidative stress increasing and cell cycle re-entry could be characteristic features not only in neurodegenerative diseases but also in neurological disorders (Woods et al., 2007; Zhu et al., 2007).

Furthermore, evidence of cell cycle reactivation involvement in the process of neuronal loss is also found in several models

* Corresponding author at: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 4024505; fax: +34 93 4035901.

E-mail address: vilaplana@ub.edu (J. Vilaplana).

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; BSA, bovine serum albumin; CDK, cyclin-dependent kinase; CyD1, cyclin D1; CyE, cyclin E; HD, Huntington's disease; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; PD, Parkinson's disease; PVDF, polyvinylidene fluoride; 3-NPA, 3-nitropropionic acid.

of neurodegenerative diseases induced by administration of diverse neurotoxins, such as models of excitotoxicity induced by kainic acid, models of stroke, the MPTP model of PD and the superoxide dismutase-1 mouse model of ALS (Verdaguer et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Höglinger et al., 2007). According to this, the expression of cell-cycle proteins has been evidenced after treating neuronal cell cultures or neuron-like cultures with apoptotic stimuli such as potassium deprivation in cerebellar granule cells (Yeste-Velasco et al., 2007), treatment with excitatory amino acid glutamate and kainic acid (Gendron et al., 2001; Smith et al., 2003; Verdaguer et al., 2003, 2004), β -amyloid treatment (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2008; Majd et al., 2008), camptothecin treatment (Park et al., 2000) and other stimuli (Kranenburg et al., 1996). As a whole, these studies demonstrate that neurotoxins in neuronal cell cultures increase the expression of proteins involved in cell-cycle regulation and the proapoptotic transcription factor E2F-1.

Thus, it seems that the process of cell cycle re-entry might be a common component of the process of neuronal loss. That is why the aim of the present study was to evaluate the cell cycle proteins involved in G0/G1 phase in rats treated with 3-NPA, to demonstrate the attempt to cell cycle re-entry in the rat brain. We studied cyclin D1 (CyD1) which is associated with CDK4 and cyclin E (CyE) which is associated with CDK2. Furthermore, we have evaluated the transcription factor E2F-1 because the increase in its expression is associated to the well-known apoptotic route. Finally, the expression of E2F-1 and CyD1 in human samples of HD was also analyzed and showed as an evidence of translational results from the animal model to the human disease.

2. Experimental procedures

2.1. Animals and tissue harvesting

Sprague–Dawley male rats (220–250 g, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) had food and water *ad libitum* and were kept in standard conditions of temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and 12:12-h light–dark cycles (300 lx/0 lx). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. One group of rats received a saline solution of 3-NPA adjusted to pH 7.4 with NaOH at a dose of 20 mg/kg *i.p.* once a day for 3 days (days 0, 1 and 2). The other group was injected only with saline (control group). All rats were evaluated daily for both body weight loss and motor impairments from day 0 until day 6 of experiment. On day 6, animals were anaesthetized with 80 mg/kg of sodium pentobarbital. Intra-cardiac perfusion was then performed by injecting 50 ml of saline into the left ventricle and making an incision on the right auricle to drain all incoming venous blood. Immediately after, brains were removed, snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80°C until further use. Thereafter, frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA, USA) and 20- μm -thick cryostatic sections which contained striatum were obtained at -22°C . Slides were fixed with acetone for 10 min at 4°C , allowed to dry at room temperature and then frozen at -20°C until staining.

2.2. Immunohistochemistry of rat brain sections

Immunohistochemistry was performed as described previously (Pelegrí et al., 2007). Slides were allowed to defrost at room temperature and then rehydrated with PBS for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma–Aldrich) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma–Aldrich) for 20 min. After two 5 min washes in PBS, brain sections were incubated with the primary antibody (see below) for 90 min at room temperature. Slides were washed again and then incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). After washing again, nuclear staining was performed by incubating slides in Hoechst reagent at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS for 10 min at room temperature in the dark. Finally, slides were washed, mounted using Prolong Gold anti-fade medium and stored at 4°C in the dark. Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies.

The following primary antibodies against cell cycle proteins or factors were used: rabbit polyclonal anti-human CDK2 (sc-163), rabbit polyclonal anti-mouse CDK4 (sc-260), mouse monoclonal anti-E2F-1 (sc-251) and rabbit polyclonal anti-rat CyE

(sc-481) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA; dilution 1/50); and mouse anti-recombinant human CyD1 (#2926) from Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA; dilution 1/50). Mouse monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN, MAB377, Millipore, Molsheim, France; dilution 1/100) was also used in order to visualize neurons. AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG and AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; dilution 1/250) were used as secondary antibodies.

2.3. Confocal microscopy of rat brain sections

Slides were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany). Staining for AlexaFluor 488 was excited with a laser of 488 nm (blue zone) and visualized as green fluorescence. AlexaFluor 555 anti-mouse IgG was excited at 543 nm (green zone) and visualized as red fluorescence. Finally, nuclear staining (Hoechst) was excited at 351 and 364 nm (ultraviolet) and visualized as blue fluorescence. All images that were compared between them were acquired under the same microscope setup and laser and software adjustments.

2.4. Human brain samples of neurodegenerative processes

Eight brain samples (four from HD patients and four controls, sex and age-matched) were obtained from the Institute of Neuropathology and the University of Barcelona Brain Bank, once the informed consent of the patients or their relatives and the approval of the local ethics committee had been given. At autopsy, half of each cerebral tissue was fixed in 4% buffered formalin, frozen on dry ice and stored at -80°C until further use. All brain samples (with and without clinical neurological disease) were processed in the same way using the same sampling and staining protocols. The neuropathological characterization of HD ($n=4$) was carried out according to established criteria (Stuss and Levine, 1996). No remarkable changes were detected in control subjects ($n=4$). The postmortem delay was between 3 and 17 h.

2.5. E2F-1 and CyD1 immunodetection in human brain samples

Tissues were homogenized with a polytron homogenizer at 4°C in 10 volumes of cold lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100 and 10% glycerol), protease inhibitor cocktail (1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM PMSF and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin), phosphatase inhibitor cocktail 1 (Sigma, Madrid, Spain) and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. For protein preparations, homogenates were centrifuged at $14,000 \times g$ for 5 min at 4°C . Supernatants were collected and protein content determined using BSA as the standard. Aliquots of homogenate, containing 30 μg of protein per sample, were analyzed by western blot. Briefly, samples were placed in buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and denatured by boiling at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 5 min. Samples were then separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Proteins were subsequently transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets (ImmobilonTM-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) using a transblot apparatus (BioRad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked overnight with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (Tris 50 mM, NaCl 1.5%, Tween 20, 0.05%, pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against E2F-1 (sc-251, Santa Cruz Biotechnology) or CyD1 (#2926, Cell Signalling Technology). After 90 min, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase conjugated IgG antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA). Immunoreactive protein was visualized using a chemiluminescence-based detection kit following the manufacturer's instructions (ECL kit; Amersham Corp.). Digital images were taken with a Chemidoc XRS (Biorad), which allows semi-quantitation of band intensity. Protein load was periodically monitored by staining the blot membrane with phenol red and via immunodetection of actin. Results were presented in arbitrary units of optical density (D.O.).

2.6. Statistical analysis

In order to analyze body weight evolution, mean of daily body weight of rats treated with 3-NPA were compared with that of control rats by using a non-parametric Mann–Whitney *U*-test, and differences were considered significant at $p < 0.05$.

On the human study, the western blot of four patients of each group was analyzed. Optical density data for each group are given as mean + S.E.M. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test, and differences were also considered significant at $p < 0.05$ vs control.

3. Results

3.1. Body weight loss and motor abnormalities in 3-NPA treated rats

When compared to control rats, 3-NPA treated animals showed evident disturbances in the body weight curve. Fig. 1 shows the daily mean of body weight from both studied groups. As expected,

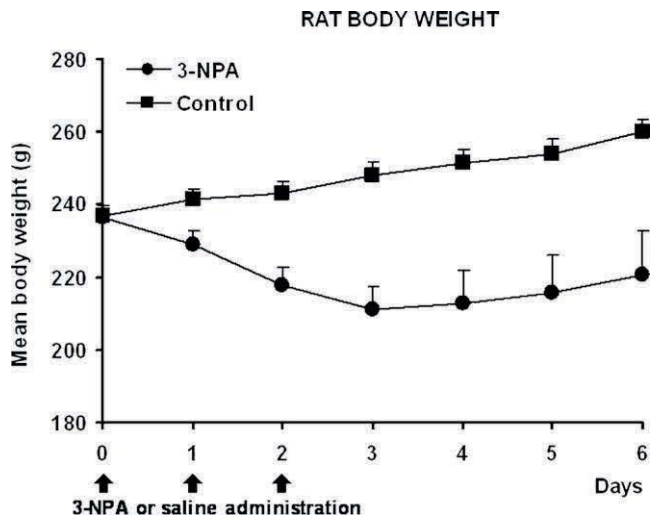


Fig. 1. Body weight throughout the study of rats treated with 3-NPA and control rats. Data are expressed as mean + S.E.M. On days 0–2, treated rats received 3-NPA, while control rats received saline solution.

at the beginning of the study, on day 0, there were not significant differences between both groups. On day 1, 24 h after the first administration, the mean body weight of 3-NPA treated animals was significantly lower than the observed in control animals. Animals treated with 3-NPA continued losing weight until day 3, 24 h after the third (and last) administration of the toxin, and differences with the control group appeared more remarkable. From day 3 on, the body weight of treated animals increased but remained significantly lower than control group (Mann–Whitney *U*-test, $p < 0.05$ in all days except day 0).

Moreover, animals treated with 3-NPA exhibited motor abnormalities, which were evident when the animals were allowed to climb a cage grid. Treated animals used only their forelimbs to climb the grid as they could not use their hind limbs. Control animals climbed the grid in a well-coordinated postural control.

3.2. Expression of cell-cycle proteins in striatal neurons from 3-NPA treated rats

The observation at the microscope of the striatum stained with the different antibodies used showed strong differences between 3-NPA treated and control rats. NeuN staining showed, in control brains, the characteristic neuronal arrangements on the fine defined structure of striatum (Fig. 2A). In 3-NPA treated animals, an important lesion was observed at the dorsal zone of striatum. This lesion was visible by the disorganization of their structural pattern, and was accompanied by a loss of NeuN-labelled neurons (Fig. 2C). Away from the lesion, in peripheral and ventral zones of striatum, the staining pattern was similar to that of control animals; although certain tissue disorganization could be observed, as well as a more diffuse staining with NeuN (Fig. 2E). When observing Hoechst nuclear staining, neurons in striatum of control brains (Fig. 2B) showed a characteristic well-defined nucleus (insets B1 and B2). In the injured region of the striatum of the 3-NPA treated animals (Fig. 2D), typical apoptotic condensation and fragmentation of chromatin could be observed (insets D1 and D2, respectively). In non-injured region of the striatum of the 3-NPA treated animals (Fig. 2F) nuclear staining was highly variable: some neuronal nuclei appeared normally stained (inset F1) while, in others, chromatin appeared to be condensed or fragmented (inset F2).

In brains of 3-NPA treated animals, staining with anti-CDK4 showed a high number of positive cells present in the injured zone

of striatum (Fig. 3B), while this intense staining did not appear in brains from control animals (Fig. 3A) or in non-injured zones of 3-NPA treated brains. On the other hand, striatal injured zones from 3-NPA treated animals presented cells with an intense positive staining for CDK2 (Fig. 3D), while this intense staining was not seen in the non-injured zone from this group nor in control animals (Fig. 3C). Moreover, only in the injured zone from treated animals, positive staining for CyE and E2F-1 appeared (Fig. 3F and 3H, respectively). The rest of the striatum of the 3-NPA treated animals showed only a slight staining which could be observed for these antibodies in some of these animals, while staining was practically not present in control animals (Fig. 3E and G).

All CDK4⁺ cells of the injured striatum from 3-NPA treated animals showed positive staining for NeuN, although some NeuN⁺ cells did not show positive staining for CDK4 (Fig. 4B). Moreover, all CDK4⁺ cells in the injured zone showed positive staining for anti-CyD1 (Fig. 4D), while there did not appear any CyD1⁺ cell being CDK4⁻. It must be pointed out that high CDK4 and CyD1 staining was present in cells on the striatal lesion of the 3-NPA treated animals, but not in control animals (Fig. 4A and C).

It is interesting to point out that striatum from control animals and non-injured zones of striatum from 3-NPA treated rats, as well as cerebral cortex from both studied groups, can present a slight cellular staining for the different markers. However, this staining was much lower than that observed in disrupted zones of striatum.

3.3. Expression of E2F-1 and CyD1 in brains from HD patients

Samples from the brains of HD patients were also specifically studied using western blot technique to determine E2F-1 and CyD1 expression as robust markers of re-entry in neuronal cell cycle. The expression of both proteins was dramatically higher in the four HD cases studied than in the age-matched control patients. Representative western blot of CyD1 and E2F-1 can be observed in Fig. 5. Quantification and statistical analysis of band intensity indicates that both protein load of CyD1 and E2F-1 are significantly higher on HD samples than in control healthy patients.

4. Discussion

This study demonstrates that cell cycle activation in cerebral tissue from rats treated with 3-NPA can constitute a potential pathway involved in neuronal cell death in this experimental model of HD. These findings are in agreement with results from a recent published study which suggest that neuronal death owed to 3-NPA treatment is mediated by cell cycle re-entry (Akashiba et al., 2008). Specifically, they have found that treatment of striatal neuronal cultures with 3-NPA decreased the expression of the cell cycle inhibitor p27 and increased the phosphorylation of retinoblastoma protein, a marker of cell cycle progression at late G1 phase. Our results show a neuronal expression of G1 markers (CDK4, CDK2, CyD1 and CyE) and E2F-1 in rat striatum after the treatment with 3-NPA.

The involvement of cell cycle re-entry and specifically the expression of the transcription factor E2F-1 in neuronal apoptosis has been demonstrated (Kranenburg et al., 1996; O'Hare et al., 2000; Gendron et al., 2001; Hou et al., 2001b; Smith et al., 2003; Verdaguer et al., 2004; Höglinger et al., 2007; Woods et al., 2007). Therefore, it can be deduced that some neurons that are still present in the injured zone of striatum of 3-NPA treated rats are initiating an apoptotic process, as can be observed by the presence of positive staining for the different markers used. Evidence that E2F-1 is a key component of the neuronal apoptotic route was demonstrated by utilizing neuronal cell cultures lacking this transcription factor. Thus, the loss of E2F-1 attenuates neuronal

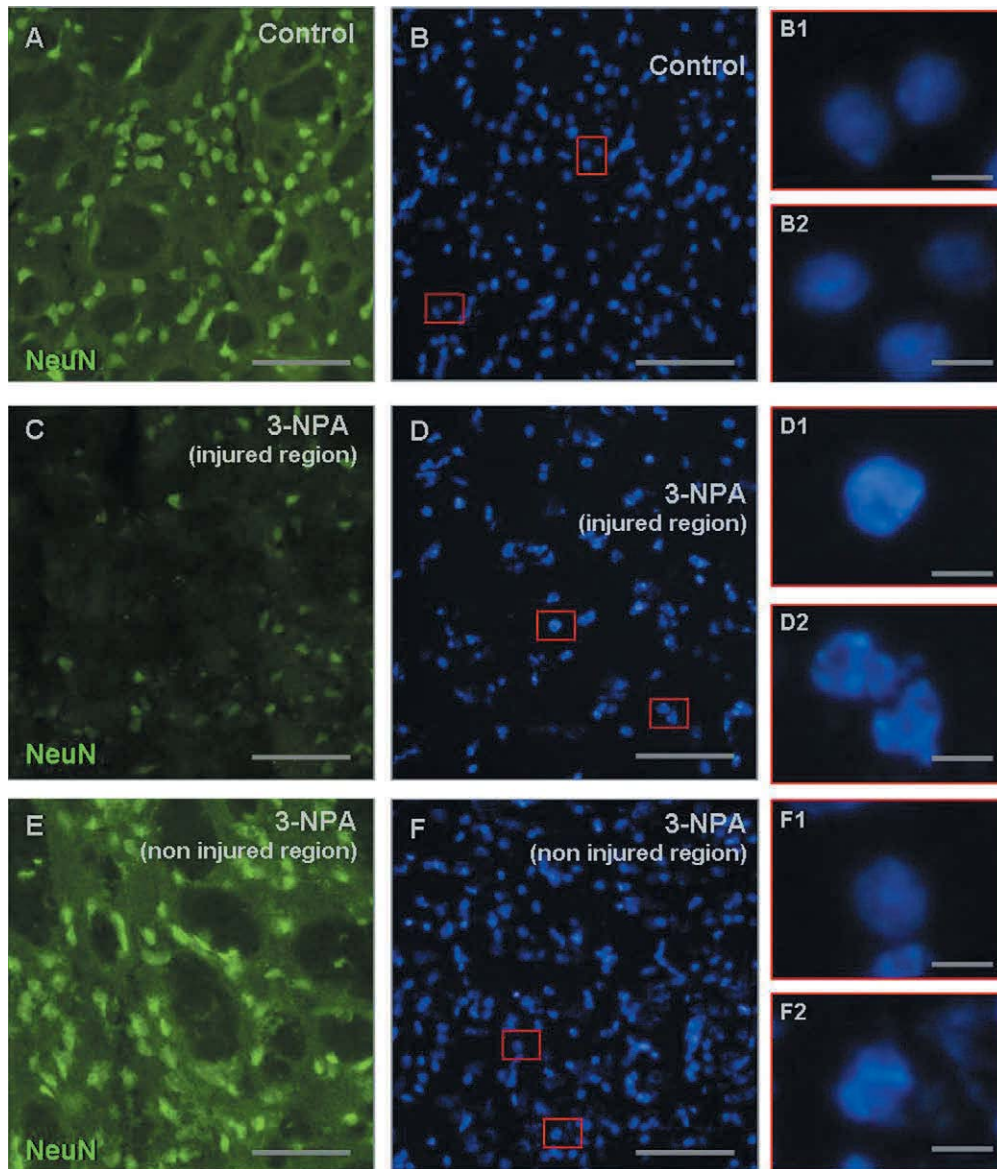


Fig. 2. Representative NeuN (A, C and E) and Hoechst (B, D and F) staining of striatum from control and 3-NPA treated rats. A and B: striatum from a control animal. C and D: injured region of striatum of a 3-NPA animal. E and F: non-injured region of striatum of a 3-NPA treated animal. Inset on B, D and F: magnification of neuronal nuclei stained by Hoechst. Scale bar: 100 μm (insets: 10 μm). (For interpretation of the references to color in the text, the reader is referred to the web version of the article).

cell death from neurotoxic stimuli. Examples include potassium deprivation in cerebellar granule cells, neuronal cell death mediated by neurotoxins such as kainic acid or MPTP, ischemia, apoptosis mediated by oxygen–glucose deprivation in cortical and hippocampal cultures, and cell death induced by β -amyloid (Giovanni et al., 1999, 2000; O'Hare et al., 2000; Gendron et al., 2001; Hou et al., 2001a,b; MacManus et al., 2003; Smith et al., 2003; Höglinger et al., 2007). Moreover, this experimental data is in accordance with observations that E2F-1 expression, itself, is sufficient to induce death in cortical neurons in the absence of any apoptotic stimuli (Giovanni et al., 2000). E2F-1 induced apoptosis encompasses several mechanisms as p53 activation, mitochondrial protein release, proapoptotic gene activation, Apaf-1/bax and other signals like NF- κ B inhibition (Liu and Greene, 2001; Stanelle and Pützer, 2006). Thus, E2F-1 directly induces the expression of p53 proapoptotic targets such as PUMA and Noxa. With reference to NF- κ B, this transcription factor is involved in the regulation of cell survival in response to death-promoting stimuli and the

inhibition of NF- κ B by E2F-1 induces an increase in oxidative stress by suppression of the enzyme superoxide dismutase (Phillips et al., 1999). Accordingly, E2F-1 could also be involved in ROS regulation and may increase neuronal apoptosis by the inhibition of cell survival signals (Phillips et al., 1999; Konishi and Bonni, 2003). Interestingly, another target of E2F-1 is the induction of Cdc2 (CDK1) expression following potassium deprivation in cerebellar granule neurons. Moreover, this study constitutes a novel apoptotic route in neurons between CDKs-pRb-E2F-1 pathway and the mitotic kinase Cdc2, via phosphorylation of BH3-only protein BAD (Konishi and Bonni, 2003). Therefore, Cdc2 represents a selective target for E2F-1 in postmitotic neurons.

In the human studies conducted here, we confirm that CyD1 involved in cell cycle re-entry, as well as the transcription factor E2F-1 are also over-expressed in brains from HD patients. As several markers of G1 phase are present in degenerating neurons in experimental models and also in human samples, the evoked G1 phase related mechanism might be important for neuronal loss in

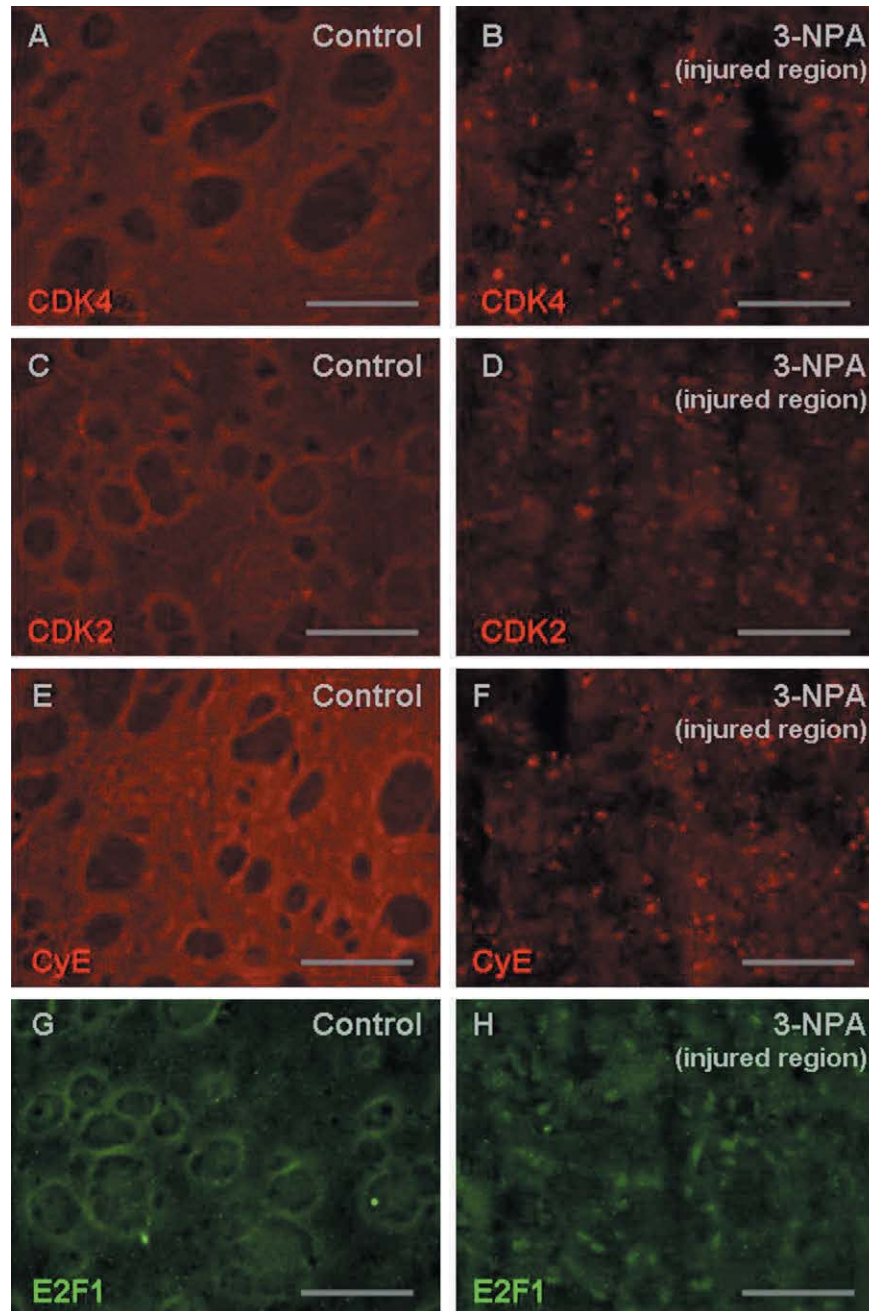


Fig. 3. Representative striatum from control (A, C, E and G) and 3-NPA treated (B, D, F and H) animals stained for CDK4 (A and B), CDK2 (C and D), CyE (E and F) and E2F-1 (G and H). All images from 3-NPA animals correspond to the injured region of the striatum. Scale bar: 100 μ m. (For interpretation of the references to color in the text, the reader is referred to the web version of the article).

HD and other neurodegenerative diseases. Moreover, our data agrees with the hypothesis that re-entry in the cell cycle could constitute a convergent point in all neurodegenerative diseases towards the induction of neuronal demise. On the other hand, the importance of cell cycle activation is further supported by the evidence that inhibition of CDKs by drugs such as flavopiridol and roscovitine induces neuroprotective effects in neuronal cell cultures (Verdaguer et al., 2004).

Although the apoptotic pathways implicated in HD are still being determined, in previous studies we and others have suggested that calpain activation may be a prominent pathway in 3-NPA-induced striatal neuronal cell death (Bizat et al., 2003; Pang et al., 2003; Brouillet et al., 2005; Crespo-Biel et al., 2007). In addition, we have demonstrated that CDK5, a CDK regulated by

calpain activation, is activated after a treatment with this neurotoxin suggesting a direct impact of calpain in HD pathogenesis (Crespo-Biel et al., 2007). Interestingly, Strachan et al. (2005) suggest in a recent work that cytoplasm E2F-1 localization is involved in the process of calpain activation and may constitute a novel pathway regulating neuronal loss in neurodegenerative diseases. In support of this, E2F-1 has been shown to exhibit increased immunostaining in multiple neurodegenerative diseases including PD, Down syndrome, AD and ALS (Motonaga et al., 2001; Jordan-Sciutto et al., 2003; Zhang et al., 2004; Nguyen et al., 2003; Ranganathan and Bowser, 2003). Interestingly, in all these studies, E2F-1 showed mainly cytoplasm localization in neurons. Thus, it could be hypothesised that when E2F-1 move from nucleus towards the cytoplasm it

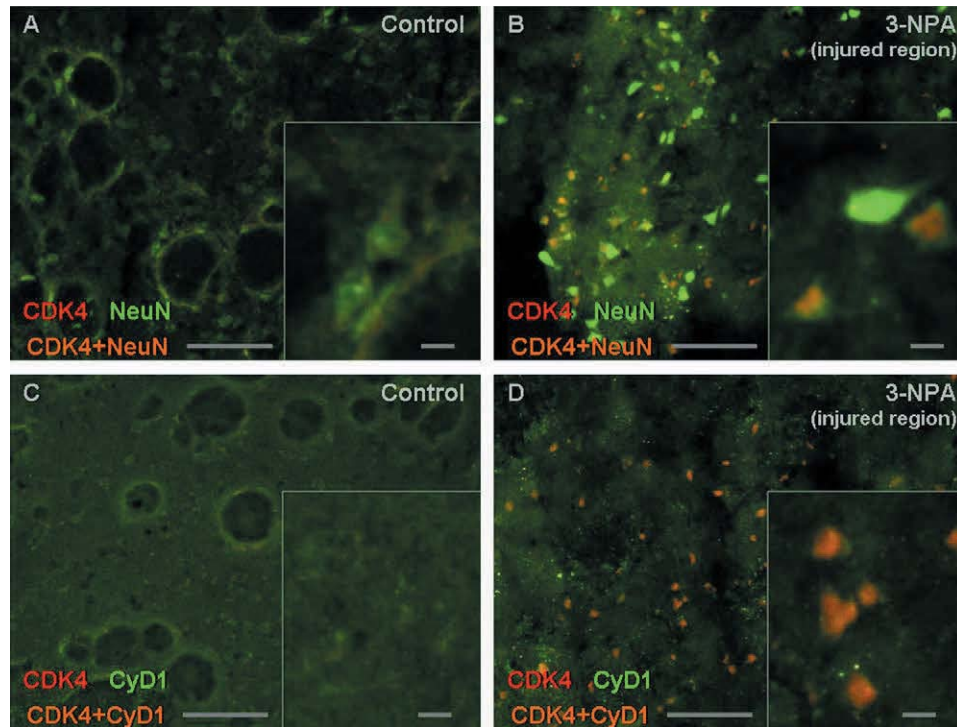


Fig. 4. Representative striatum from control (A and C) and 3-NPA treated (B and D) animals stained for CDK4 and NeuN (A and B) and CDK4 and CyD1 (C and D). Insets: magnification of some stained cells. All images from 3-NPA animals correspond to the injured region of the striatum. Scale bar: 100 μ m (insets: 10 μ m). (For interpretation of the references to color in the text, the reader is referred to the web version of the article).

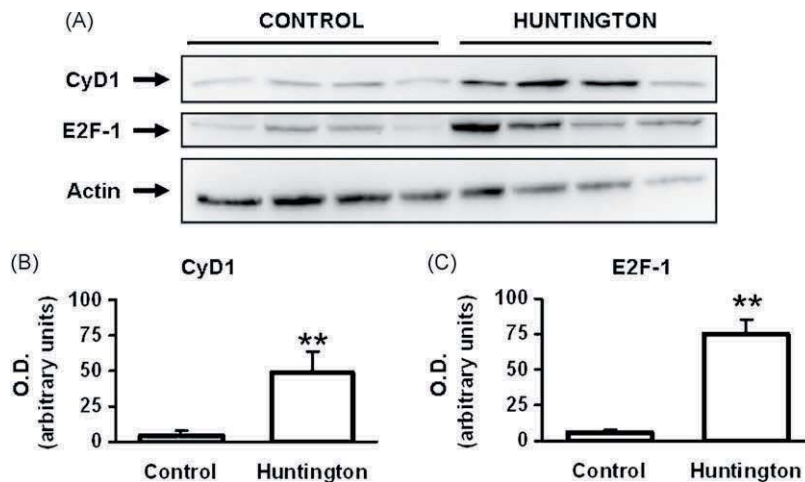


Fig. 5. (A) Representative western blot of CyD1 and E2F-1 expression in brain human samples. (B and C) Optical density (O.D.) for CyD1 and E2F-1 on control and HD patients. Data are expressed as mean + S.E.M. ** $p < 0.01$ vs control.

may have a role in neuronal apoptosis. Understanding the mechanism by which E2F-1 induces apoptosis, probably may provide novel targets for HD therapy.

Taken together, these findings indicate that re-entry in the cell cycle in experimental and human HD may be a new pathway implicated in neuronal apoptosis in this disease. Moreover, data presented in the present work give support to the evidence that neuronal cell cycle re-entry constitutes a prerequisite of apoptosis in neurodegenerative diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants BFU/2006-11981, SAF2005-01604 and SAF-2006-13092 from the *Ministerio de Educación*

y *Ciencia* (Spain); and 2005/SGR00893 from the *Generalitat de Catalunya*. J. del Valle is sponsored by *Fundació Universit ria Agustí Pedro i Pons 2007* scholarship (Universitat de Barcelona). Authors are grateful to A. Folch for revising the English language.

References

- Akashiba, H., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., Matsuki, N., 2008. Differential involvement of cell cycle reactivation between striatal and cortical neurons in cell death induced by 3-nitropropionic acid. *J. Biol. Chem.* 283, 6594–6606.
- Bizat, N., Hermel, J.M., Boyer, F., Jacquard, C., Créminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Kajewski, S., Brouillet, E., 2003. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23, 5020–5030 (Erratum in *J. Neurosci.* 23 (2003) 9960).

- Brouillet, E., Guyot, M.C., Mittoux, V., Altairac, S., Condé, F., Palfi, S., Hantraye, P., 1998. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70, 794–805.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D., 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 95, 1521–1540.
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., Pallàs, M., 2006. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev.* 12, 135–148.
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., Beas-Zarate, C., Canudas, A.M., Pallàs, M., 2007. Inhibition of ataxia telangiectasia-p53-E2F-1 pathway in neurons as a target for the prevention of neuronal apoptosis. *Curr. Drug Metab.* 8, 709–715.
- Camins, A., Pallas, M., Silvestre, J.S., 2008. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 30, 43–65.
- Crespo-Biel, N., Camins, A., Pelegrí, C., Vilaplana, J., Pallàs, M., Canudas, A.M., 2007. 3-Nitropropionic acid activates calpain/cdk5 pathway in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 421, 77–81.
- Gendron, T.F., Mealing, G.A., Paris, J., Lou, A., Edwards, A., Hou, S.T., MacManus, J.P., Hakim, A.M., Morley, P., 2001. Attenuation of neurotoxicity in cortical cultures and hippocampal slices from E2F-1 knockout mice. *J. Neurochem.* 78, 316–324.
- Giovanni, A., Wirtz-Brugger, F., Keramaris, E., Slack, R., Park, D.S., 1999. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F × DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J. Biol. Chem.* 274, 19011–19016.
- Giovanni, A., Keramaris, E., Morris, E.J., Hou, S.T., O'Hare, M., Dyson, N., Robertson, G.S., Slack, R.S., Park, D.S., 2000. E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3. *J. Biol. Chem.* 275, 11553–11560.
- Höglinger, G.U., Breunig, J.J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Bouillier, A.L., Degregori, J., Oertel, W.H., Rakic, P., Hirsch, E.C., Hunot, S., 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3585–3590.
- Hou, S.T., Cowan, E., Dostanic, S., Rasquinha, I., Comas, T., Morley, P., MacManus, J.P., 2001a. Increased expression of the transcription factor E2F1 during dopamine-evoked, caspase-3-mediated apoptosis in rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 306, 153–156.
- Hou, S.T., Cowan, E., Walker, T., Ohan, N., Dove, M., Rasquinha, I., MacManus, J.P., 2001b. The transcription factor E2F-1 promotes dopamine-evoked neuronal apoptosis by a mechanism independent of transcriptional activation. *J. Neurochem.* 78, 287–297.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2008. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 38–55.
- Jordan-Sciutto, K.L., Dorsey, R., Chalovich, E.M., Hammond, R.R., Achim, C.L., 2003. Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* 62, 68–74.
- Konishi, Y., Bonni, A., 2003. The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J. Neurosci.* 23, 1649–1658.
- Kranenburg, O., van der Eb, A.J., Zantema, A., 1996. Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J.* 15, 46–54.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R., 2005. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 670–676.
- Liu, D.X., Greene, L.A., 2001. Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* 32, 425–438.
- MacManus, J.P., Jian, M., Preston, E., Rasquinha, I., Webster, J., Zurakowski, B., 2003. Absence of the transcription factor E2F-1 attenuates brain injury and improves behavior after focal ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1020–1028.
- Majd, S., Zarifkar, A., Rastegar, K., Takhshid, M.A., 2008. Different fibrillar Abeta 1–42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain Res.* 1218, 224–229.
- Manfredi, G., Beal, M.F., 2007. Merging mitochondria for neuronal survival. *Nat. Med.* 13, 1140–1141.
- Motonaga, K., Itoh, M., Hirayama, A., Hirano, S., Becker, L.E., Goto, Y., Takashima, S., 2001. Up-regulation of E2F-1 in Down's syndrome brain exhibiting neuropathological features of Alzheimer-type dementia. *Brain Res.* 905, 250–253.
- Nguyen, M.D., Boudreau, M., Kriz, J., Couillard-Després, S., Kaplan, D.R., Julien, J.P., 2003. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J. Neurosci.* 23, 2131–2140.
- Nunomura, A., Moreira, P.I., Lee, H.G., Zhu, X., Castellani, R.J., Smith, M.A., Perry, G., 2007. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6, 411–423.
- O'Hare, M.J., Hou, S.T., Morris, E.J., Cregan, S.P., Xu, Q., Slack, R.S., Park, D.S., 2000. Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *J. Biol. Chem.* 275, 25358–25364.
- Pallàs, M., Camins, A., 2006. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 12, 4389–4408.
- Pang, Z., Bondada, V., Sengoku, T., Siman, R., Geddes, J.W., 2003. Calpain facilitates the neuron death induced by 3-nitropropionic acid and contributes to the necrotic morphology. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* 62, 633–643.
- Park, D.S., Morris, E.J., Bremner, R., Keramaris, E., Padmanabhan, J., Rosenbaum, M., Shelanski, M.L., Geller, H.M., Greene, L.A., 2000. Involvement of retinoblastoma family members and E2F/DP complexes in the death of neurons evoked by DNA damage. *J. Neurosci.* 20, 3104–3114.
- Pelegrí, C., Canudas, A.M., del Valle, J., Casadesus, G., Smith, M., Camins, A., Pallàs, M., Vilaplana, J., 2007. Increased permeability of blood–brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech. Ageing Dev.* 128, 522–528.
- Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., Vousden, K.H., 1999. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol. Cell.* 4, 771–781.
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., Vila, M., 2004. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J. Bioenergy Biomembr.* 36, 375–379.
- Ranganathan, S., Bowser, R., 2003. Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* 162, 823–835.
- Smith, R.A., Walker, T., Xie, X., Hou, S.T., 2003. Involvement of the transcription factor E2F-1/Rb in kainic acid-induced death of murine cerebellar granule cells. *Mol. Brain Res.* 116, 70–79.
- Stanelle, J., Pützer, B.M., 2006. E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol. Med.* 12, 177–185.
- Strachan, G.D., Koike, M.A., Siman, R., Hall, D.J., Jordan-Sciutto, K.L., 2005. E2F-1 induces cell death, calpain activation, and MDMX degradation in a transcription independent manner implicating a novel role for E2F-1 in neuronal loss in SIV encephalitis. *J. Cell Biochem.* 96, 728–740.
- Stuss, D.T., Levine, B., 1996. The dementias: nosological and clinical factors related to diagnosis. *Brain Cogn.* 31, 99–113.
- Verdaguer, E., Jordà, E.G., Canudas, A.M., Jiménez, A., Sureda, F.X., Rimbau, V., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J., Pallàs, M., Camins, A., 2003. 3-Amino thioacridone, a selective cyclin-dependent kinase 4 inhibitor, attenuates kainic acid-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience* 120, 599–603.
- Verdaguer, E., Jiménez, A., Canudas, A.M., Jordà, E.G., Sureda, F.X., Pallàs, M., Camins, A., 2004. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 609–616.
- Vila, M., Przedborski, S., 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 365–375.
- Woods, J., Snape, M., Smith, M.A., 2007. The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: suggestions for drug development. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 503–508.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Trullàs, R., Abad, M.A., Enguita, M., Pallàs, M., Camins, A., 2007. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 53, 295–307.
- Zhang, M., Li, J., Chakrabarty, P., Bu, B., Vincent, I., 2004. Cyclin-dependent kinase inhibitors attenuate protein hyperphosphorylation cytoskeletal lesion formation, and motor defects in Niemann-Pick Type C mice. *Am. J. Pathol.* 165, 843–853.
- Zhu, X., Lee, H.G., Perry, G., Smith, M.A., 2007. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 494–502.

ARTICLE 2

**SYSTEMIC ADMINISTRATION OF 3-NITROPROPIONIC ACID POINTS OUT A
DIFFERENT ROLE FOR ACTIVE CASPASE-3 IN NEURONS AND ASTROCYTES**

Joaquim Duran-Vilaregut, Jaume del Valle, Gemma Manich, Fèlix Junyent,
Antoni Camins, Mercè Pallàs, Carme Pelegrí i Jordi Vilaplana

Neurochemistry International 2010; 56: 443-450

RESUM

Objectius: Estudiar la presència de caspasa-3 activa i marcatge de TUNEL, ambdós utilitzats com a marcadors d'apoptosi, en neurones i astròcits de cervells de rates tractades amb 3-NPA, per aprofundir en el coneixement dels mecanismes involucrats en la neurodegeneració estriatal provocada per la toxina i comprovar si hi ha inducció de l'apoptosi en els tipus cel·lulars esmentats.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates SD de 220-250 g de pes. El model experimental es va induir administrant a les rates una dosi de 3-NPA de 20 mg/kg per via intraperitoneal durant 3 dies (dia 0, 1 i 2). També es va disposar d'un grup control sa que es va injectar amb sèrum fisiològic. El dia 6, es van anestessiar els animals, es van perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció de l'encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a -80 °C. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos dirigits contra la caspasa-3 activa, la proteïna NeuN, per visualitzar les neurones, i contra la proteïna GFAP, per visualitzar els astròcits. Alguns procediments immunohistoquímics van incloure també el TUNEL (*Terminal dUTP Nick End Labeling*), kit que s'utilitza per detectar la mort cel·lular *in situ*. Les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal.

Resultats: Les neurones i els astròcits apareixen distribuïts homogèniament a l'escorça i a l'estriat dels animals control i a l'escorça dels animals tractats. A l'estriat lesionat, la població neuronal va disminuint com més ens apropem al centre de la lesió, i les poques neurones que queden a l'àrea lesionada tenen aspecte picnòtic. D'altra banda, els astròcits mostren un marcatge de GFAP fragmentat al centre de la lesió i un marcatge molt dens i brillant a la vora de la lesió, indicant la presència d'astrogliosi.

La caspasa-3 activa es va trobar àmpliament distribuïda en els astròcits de l'escorça i el cos estriat, tant als animals control com a les àrees no afectades per la toxina dels animals tractats. Pel que fa a les neurones, només presentaven marcatge de caspasa-3 activa les que estaven en procés de degeneració a la vora de la lesió estriatal. Les neurones de les àrees no afectades per la toxina dels animals tractats no presentaven caspasa-3 activa (Figura 22).

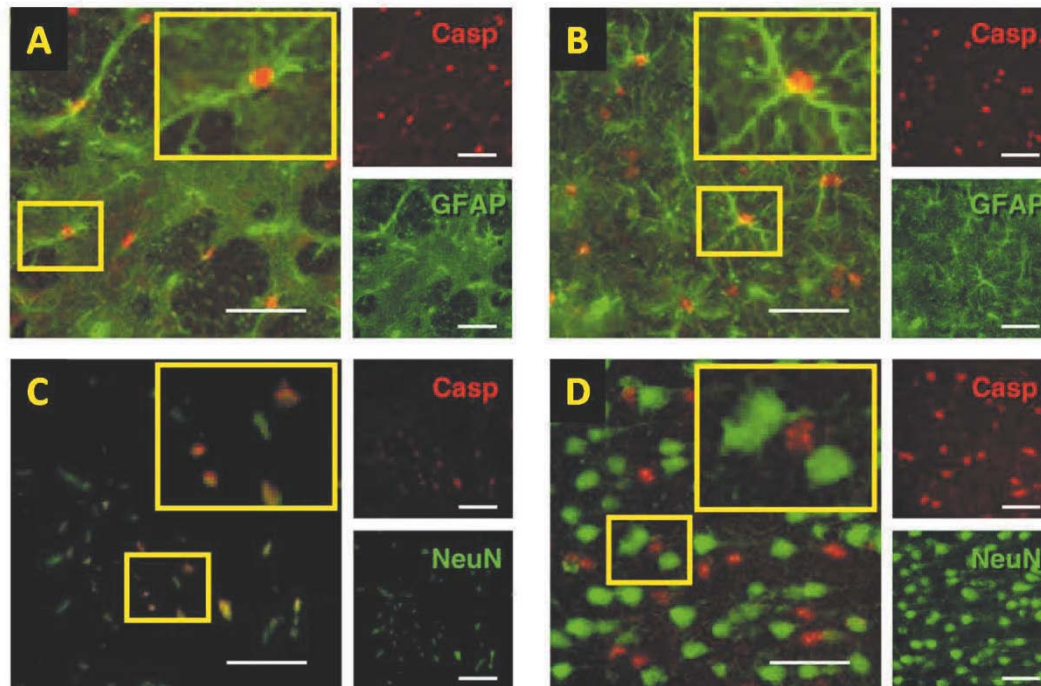


Figura 22. Marcatge de caspasa-3 activa en neurones i astròcits de rates control i tractades amb 3-NPA. Marcatge representatiu de caspasa-3 activa en astròcits del cos estriat (A) i l'escorça (B) en animals del grup control. En neurones, només es troba caspasa-3 activa a les que estan en procés de degeneració a la vora de la lesió estriatal dels animals tractats (C). Les neurones de les àrees no afectades per la toxina dels animals tractats no mostren la proteasa (D). Barres d'escala: 100 μ m.

El marcatge amb TUNEL, que juntament amb el de la caspasa-3 activa, s'utilitzen per identificar processos d'apoptosi, només va aparèixer a l'àrea estriatal lesionada dels animals tractats amb el 3-NPA. Algunes de les neurones amb caspasa-3 activa eren positives, a la vegada, per al marcatge de TUNEL. En altres casos, les neurones TUNEL positives no tenien caspasa-3 activa, i finalment també n'hi havia que únicament expressaven la proteasa (Figura 23).

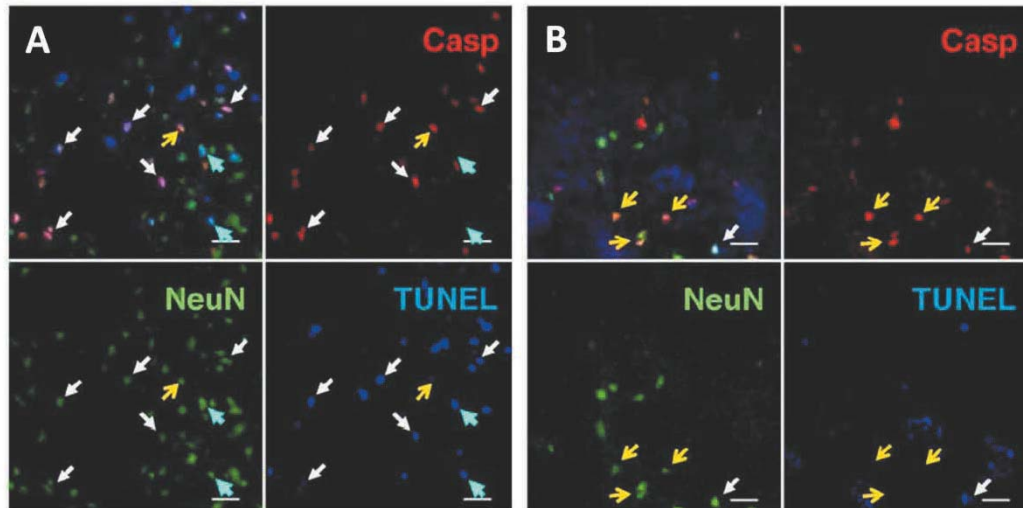
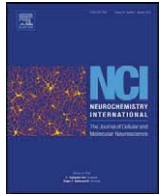


Figura 23. Marcatge de caspasa-3 activa, TUNEL i NeuN de l'àrea lesionada del cos estriat de rates tractades amb 3-NPA. Marcatge triple representatiu de caspasa-3 activa (vermell), TUNEL (blau) i NeuN (verd) a l'àrea lesionada del cos estriat d'una rata tractada amb 3-NPA (A, B). Fletxes blanques: colocalització de TUNEL, caspasa-3 activa i NeuN. Fletxes blau clar: colocalització de TUNEL i NeuN. Fletxes grogues: colocalització de caspasa-3 activa i NeuN. Barres d'escala: 30 μ m.

Conclusions: En les rates tractades amb 3-NPA, part de la degeneració neuronal del cos estriat està mediada per l'activació de la via de senyalització apoptòtica que culmina amb l'activació de la caspasa-3. D'altra banda, la presència de caspasa-3 activa en els astròcits sembla ser constitutiva.



Systemic administration of 3-nitropropionic acid points out a different role for active caspase-3 in neurons and astrocytes

Joaquim Duran-Vilaregut^{a,c}, Jaume del Valle^{a,c}, Gemma Manich^a, Fèlix Junyent^{b,c}, Antoni Camins^{b,c}, Mercè Pallàs^{b,c}, Carme Pelegrí^{a,c,1}, Jordi Vilaplana^{a,c,1,*}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain

^c CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2009

Received in revised form 27 November 2009

Accepted 1 December 2009

Available online 5 December 2009

Keywords:

Huntington's disease

Apoptosis

Neurodegeneration

Rat

TUNEL

Striatum

ABSTRACT

The intraperitoneal administration of 3-nitropropionic acid, which is commonly used to induce toxicity models of Huntington's disease in experimental animals, produces severe brain injury in the lateral part of the striatum. We studied the presence of active caspase-3 in neurons and astrocytes from brains of rats treated with 3-nitropropionic acid following a subacute administration protocol. Active caspase-3 was almost absent in the core of the striatal lesion. However, it was expressed, albeit weakly, in the neurons present in the rim of the lesion. In cortex and non-injured striatal areas, and in the cortex and striatum of control animals, active caspase-3 staining was widely distributed and vivid, but localized in the cell bodies of astrocytes rather than in neurons. In treated animals, some of the active caspase-3 positive neurons localized in the rim of the lesion were also positive for TUNEL staining. This indicates the presence of a caspase-mediated apoptotic process. TUNEL was not present in control animals or in the astrocytes of treated animals. Thus, the presence of active caspase-3 in astrocytes may be merely constitutive.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by the unstable expansion of CAG repeats in the gene encoding for a protein called huntingtin (Walling et al., 1998). In this pathology, medium-sized spiny projection neurons containing γ -aminobutyric acid (GABA), the predominant neostriatal cell type, are selectively affected during disease progression (Glass et al., 2000). It is well established that mitochondria play a pivotal role in the regulation of cellular aging and the activity of many proteins related to neuronal demise. Thus, mitochondrial dysfunction, which involves depletion in ATP production and activation of metabolic pathways leading to cell death, has been proposed to contribute to the neurodegeneration observed in HD (Lin and Beal, 2006).

It is widely accepted that necrosis and programmed cell death (PCD) are the basic ways in which a cell can die. Necrosis is a fast and chaotic process that occurs in neurons under conditions of severe energy deprivation or oxidative stress and courses with cellular edema, disruption of the plasma membrane and inflammation (Bröker et al., 2005). In contrast, apoptosis, the prototypical form of PCD, is a controlled process that does not occur in the absence of ATP (Nicotera et al., 1999). It is distinguished by morphological changes in cells, consisting of shrinkage, condensation of chromatin and the disintegration of the cell soma into small bodies that are removed by phagocytosis, in a way that prevents activation of unwanted inflammatory responses. On a biochemical level, two apoptotic cascades have been described: the intrinsic and extrinsic pathways. The intrinsic pathway, which is predominant in neurons and is decisively mediated by mitochondria, leads to the activation of caspases, a family of proteases among which caspase-3 stands out as the main effector of the apoptotic cell death process (Mattson et al., 2008; Taylor et al., 2008).

With respect to HD, studies performed on patients and post-mortem HD tissue have shown evidence of metabolic energy impairment related to mitochondrial dysfunction. This impairment takes the form of a significant decrease in the activity of mitochondrial respiratory chain complexes (MCCs) II, III and IV, among other factors (Gil and Rego, 2008). These findings led to the use of 3-nitropropionic acid (3-NPA) to induce toxicity models of

Abbreviations: 3-NPA, 3-Nitropropionic acid; AD, Alzheimer's disease; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; HD, Huntington's disease; MCC, Mitochondrial respiratory chain complex; NeuN, Neuronal nuclei protein; PBS, Phosphate buffered saline; PCD, Programmed cell death; TUNEL, Terminal dUTP Nick End Labeling.

* Corresponding author at: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 4024505; fax: +34 93 4035901.

E-mail address: vilaplana@ub.edu (J. Vilaplana).

¹ These authors contributed equally to this study.

HD in experimental animals (Brouillet et al., 1999; Gil and Rego, 2008). 3-NPA is a natural toxin that irreversibly inhibits the succinate dehydrogenase enzyme, which is the main constituent of MCC II. When it is systemically administered to rodents, 3-NPA reproduces the brain lesions observed in HD patients, which consist of degeneration of the striatum with a particular impact on medium-sized spiny projection neurons (Beal et al., 1993).

It is not clear whether apoptosis contributes to the neurodegeneration observed in HD. Some studies performed in brain tissue of HD patients showed Terminal dUTP Nick End Labeling (TUNEL) staining, which is used as a marker of apoptosis (Gavrieli et al., 1992), although the characteristic apoptotic pattern of DNA fragmentation was not found (Portera-Cailliau et al., 1995). Moreover, evidence of neuroinflammation, which is generally absent in apoptotic conditions, has also been detected in HD brains (Hedreen and Folstein, 1995). Nevertheless, activation of caspase-1 and -8 has been found in post-mortem brains from HD patients (Ona et al., 1999; Sánchez et al., 1999) and weak expression of active caspase-3 has also been observed in cells that could not be clearly identified (Vis et al., 2005).

When the 3-NPA model of HD is considered, the evidence of apoptosis mediated by caspase-3 activation is also controversial. Some studies show the cleavage of caspase-3 or DNA fragmentation in cortical and/or striatal cells (Duan et al., 2000; Almeida et al., 2004, 2006; Diwakarla et al., 2009); others report no significant activation of caspase-3 after the administration of the toxin (Bizat et al., 2003a,b; Galas et al., 2004; Del Río and Massieu, 2008). To clarify this matter, we injected 3-NPA into Sprague-Dawley rats, in accordance with a subacute administration protocol (Brouillet et al., 2005), in the hope of establishing whether the toxin induces activation of caspase-3, and if it does, to study its location in the different brain regions, particularly in the cortex and striatum, and also of characterizing the nature of the cells in which activation of caspase-3 occurs. TUNEL staining has been used as a complementary tool to establish whether cells expressing active caspase-3 undergo an apoptotic process.

2. Experimental procedures

2.1. Animals and 3-NPA treatment

Sprague-Dawley male rats (220–250 g, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) had access to food and water *ad libitum* and were kept in standard conditions of temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and 12:12 h light-dark cycles (300 lx/0 lx). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. One group of rats (treated group, eight animals) was injected with saline solution containing 3-NPA adjusted to pH 7.4 with NaOH at a dose of 20 mg/kg i.p. once a day for 3 days (days 0, 1 and 2). The other group (control group, eight animals) was injected with saline solution only. All rats were evaluated daily from day 0 until day 6 of experiment for both body weight loss and motor impairment. 3-NPA-treated rats followed a normal time course of effects (Duran-Vilaregut et al., 2009).

2.2. Brain processing

On day 6, i.e. 3 days after the last 3-NPA administration, the two groups of rats were sacrificed to obtain their brains. The animals were anaesthetized with 80 mg/kg i.p. of sodium pentobarbital and intracardially perfused with 100 ml of physiological saline. Subsequently, brains were dissected and snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80°C . Brains were then embedded in OCT cryostat embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA) and 20-mm-thick cryostat sections containing striatum were obtained. Slices were placed on common slides, fixed with acetone at 4°C for 10 min, allowed to dry at room temperature and finally frozen at -20°C until staining.

2.3. Staining of brain sections

For the standard immunostaining method, slides with brain sections were allowed to thaw at room temperature and rehydrated with phosphate buffered saline (PBS) for 5 min before being blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. They were then washed twice for 5 min with PBS and incubated with

primary antibodies (see below) for 90 min at room temperature. After a new wash, incubation with secondary antibodies (see below) was performed for 1 h at room temperature. Five minutes before the end of the second incubation, nuclear staining was performed by adding Hoechst (H-33258, Fluka) reagent at 10 mg/ml in PBS to the incubation medium, in such a way that its final concentration was 2 mg/ml. Finally, the slides were washed, mounted using Prolong Gold (Invitrogen) anti-fade medium, allowed to dry for 3 h at room temperature and stored at 4°C in the dark. Immunostaining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies.

Other immunostaining procedures that were used included TUNEL (*in situ* cell death detection kit from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). In this case, slides were allowed to thaw at room temperature, rehydrated in PBS for 5 min and blocked and permeabilized as described above. After washing, slides were incubated for 60 min at 37°C in the dark with the TUNEL reaction mixture. This mixture contained TdT enzyme and fluorescein-dUTP and was prepared following the manufacturer's instructions. For negative controls, some brain sections were only incubated with fluorescein-dUTP. Slides were then washed again and incubated with primary and secondary antibodies, as described in the standard method. The incubation was always carried out in the dark.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal antibody anti-cleaved caspase-3 from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA; dilution 1/150) which has previously been used as a marker of the active form of caspase-3 (Thuret et al., 2003; Noyan-Ashraf et al., 2005; Oomman et al., 2006); mouse monoclonal antibody raised against a protein called neuronal nuclei protein (NeuN) from Millipore (Billerica, MA, USA; dilution 1/100), which is specifically found in the nucleus of neurons (Mullen et al., 1992); and mouse monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP) from Labvision Corporation (Fremont, CA, USA; dilution 1/100), which is a specific marker of astrocytes (Bignami and Dahl, 1977; Eng et al., 2000). AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG, and AlexaFluor 660 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; dilution 1:250) were used as secondary antibodies.

2.4. Fluorescence microscopy analysis

Slides from 3-NPA-treated and control rats were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany). Series of consecutive images starting in the striatum, passing through the corpus callosum and finishing in the cortex were obtained for each staining and experimental group. In the case of treated animals, the starting point of the sequence was the injured part of the striatum. Once the image series had been collected, they were rebuilt in order to obtain single images that, subsequently, were conveniently merged using Image J software.

3. Results

In an initial set of experiments, we studied the distribution of active caspase-3 in brain slices from 3-NPA-treated and control rats. Fig. 1 shows sequences of overlapping photographs which provide a continuous view of a portion of the brain of representative control and 3-NPA-treated rats from the cortex to the striatum, passing through the *corpus callosum*. In treated animals, the non-injured part, the perilesional rim and the injured part of the striatum can be observed.

In control rats, the staining of active caspase-3 was evenly distributed along cortex and striatum (Fig. 1A). In 3-NPA-treated animals a similar pattern of staining was observed in cortex and non-injured striatal areas, while some differences appeared in the damaged part of the striatum (Fig. 1B). In injured striatum active caspase-3 staining was almost absent and, if found, was mainly on the rim of the lesion and weaker than that observed when the tissue was not injured. Neurons, stained with NeuN, appeared to be homogeneously distributed in the cortex and striatum of control animals (Fig. 1C). The same profile of neuronal staining was found in the cortex of 3-NPA-treated animals (Fig. 1D), but not in their striatum, in which the population of neurons clearly decreased as it delved into the lesion (Fig. 1D). In addition, the few neurons that still remained in the injured area had pycnotic features, as described previously in 3-NPA administration (Túnez et al., 2006). Astrocytes were also regularly found along the cortex and striatum of control rats (Fig. 1E). In 3-NPA-treated animals, GFAP staining resembled that observed for controls in the cortex. However, it appeared fragmented and scattered in the injured area of the striatum and dense and bright in the rim of the lesion (Fig. 1F), which indicates that astrogliosis had occurred.

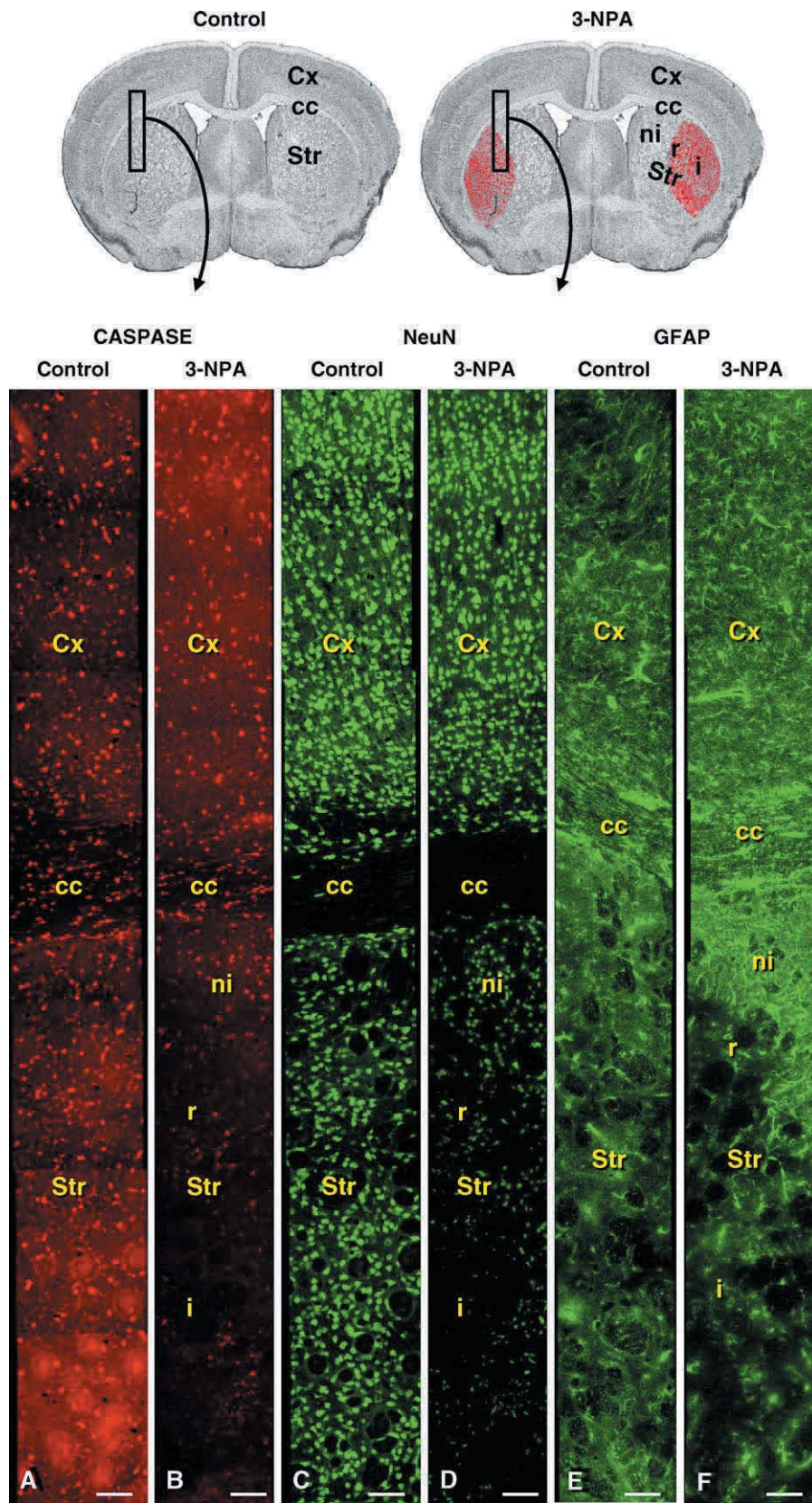


Fig. 1. Representative staining of active caspase-3, NeuN and GFAP in brain sections from control (A, C and E) and 3-NPA-treated rats (B, D and F). Images were obtained by overlapping serial photographs from the striatum to the cortex through corpus callosum. (A and B) Staining of active caspase-3. (C and D) Neurons stained by the anti-NeuN antibody. (E and F) Astrocytes stained by the anti-GFAP antibody. Cx: cortex; cc: corpus callosum; Str: striatum. i: injured area of striatum (in 3-NPA-treated animals); r: rim of the injured region (in 3-NPA-treated animals); ni: non-injured area of striatum (in 3-NPA-treated animals). Scale bars: 100 μ m.

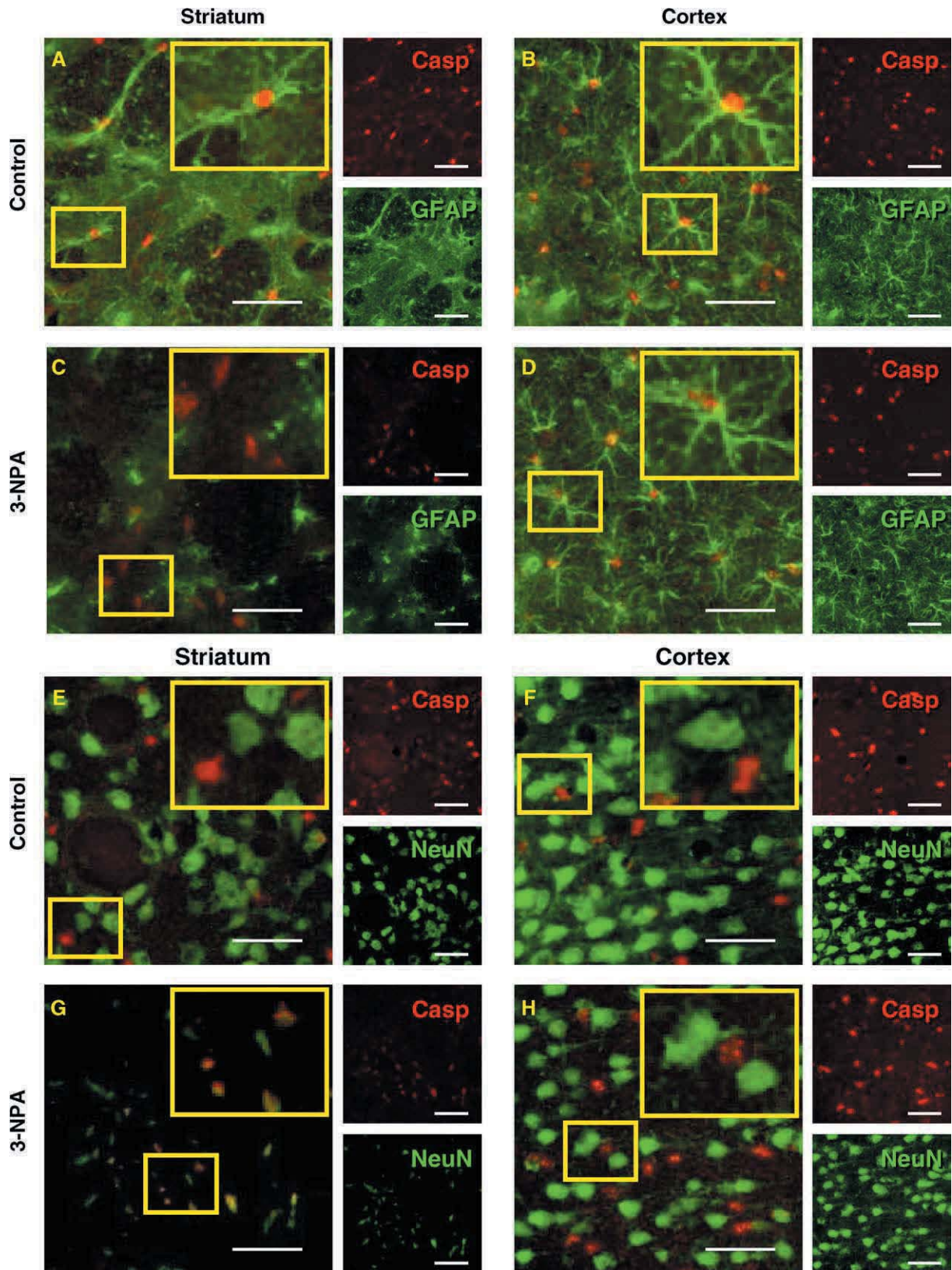


Fig. 2. Colocalization of active caspase-3 and GFAP (A–D) or NeuN (E–H) staining in striatum and cortex from representative brains of control (A, B, E, and F) and 3-NPA-treated (C, D, G, and H) rats. In the treated rats, images of the striatum correspond to the injured region. For each image, single staining and a magnification of a selected region are also shown. Scale bars: 50 μ m.

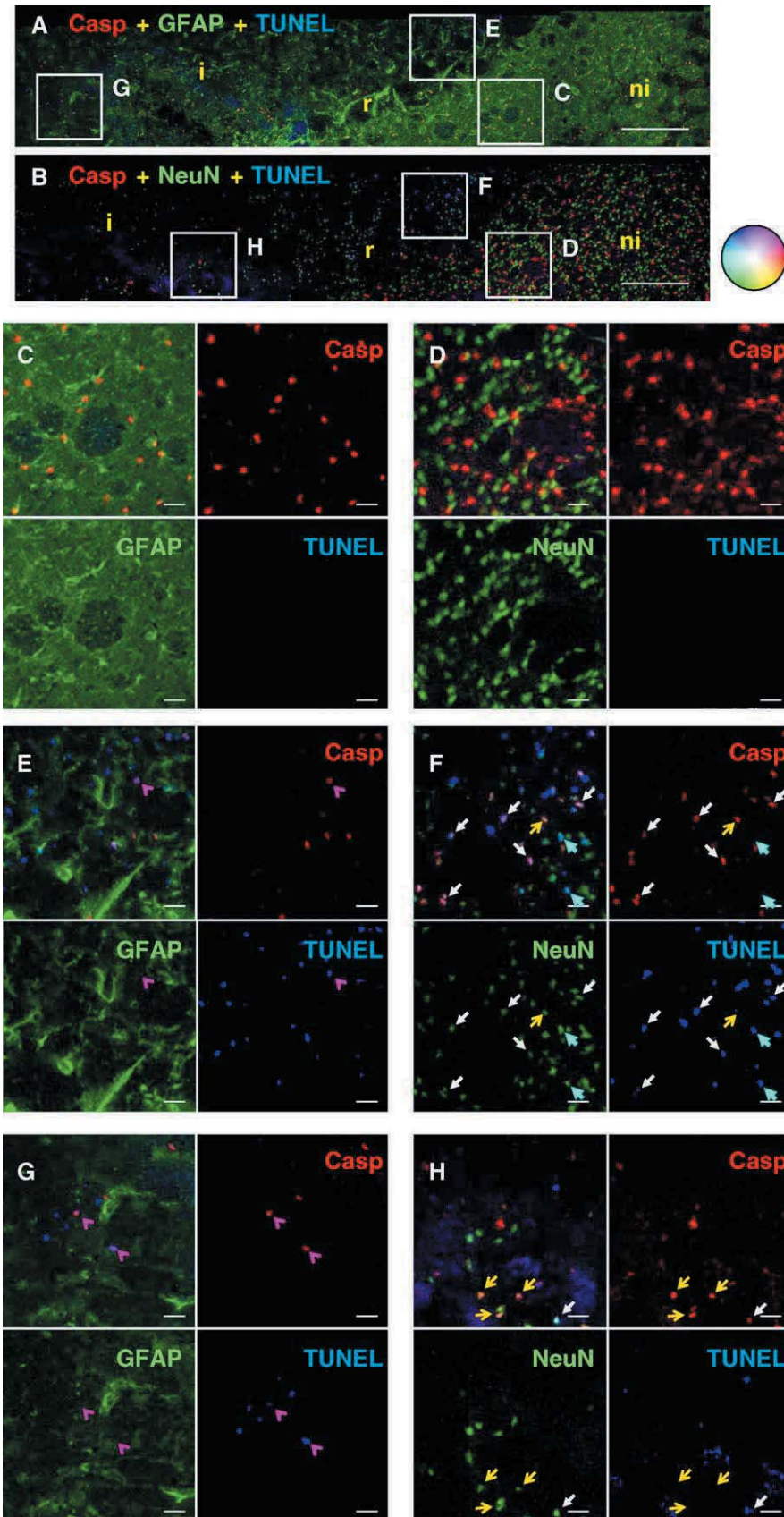


Fig. 3. (A) Representative triple-staining of active caspase-3 (red), TUNEL (blue) and GFAP (green) in striatum from a 3-NPA-treated rat. (B) Representative triple-staining of active caspase-3 (red), TUNEL (blue) and NeuN (green) in striatum from a 3-NPA-treated rat. Magnified images of selected regions of interest are shown below (C–H), accompanied by the corresponding images of single color staining. White thin arrows: colocalization of TUNEL, active caspase-3 and NeuN. Magenta open arrowheads: colocalization of TUNEL and active caspase-3. Cyan thick arrows: colocalization of TUNEL and NeuN. Yellow open arrows: colocalization of active caspase-3 and NeuN. i: injured region of striatum; r: rim of the injured region; ni: non-injured region. Scale bar on A and B: 300 μ m. Other scale bars: 30 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Some magnified regions from the sequences presented in Fig. 1, which show active caspase-3 staining merged with either NeuN or GFAP staining, are presented in Fig. 2. Colocalizations of active caspase-3 and GFAP staining revealed that almost all active caspase-3 in the cortex and striatum of control rats and the cortex of 3-NPA-treated animals was located in the cell body of astrocytes (Fig. 2A, B and D). However, weak active caspase-3 staining found in the injured area of the striatum of injected animals was not associated with GFAP staining (Fig. 2C). Colocalizations of active caspase-3 and NeuN staining showed that only some of the pycnotic neurons remaining in the injured area of the striatum of 3-NPA-treated rats expressed active caspase-3 (Fig. 2G), whereas neurons belonging to either cortex or striatum from controls and cortex or non-damaged areas of striatum from intoxicated animals did not express the active protease (Fig. 2E, F and H).

Once the expression of active caspase-3 in neurons and astrocytes of the cortex and striatum from control and 3-NPA-treated rats had been determined, the next step was to elucidate whether this protease had an apoptotic role. For this purpose, we undertook a new set of experiments, in which TUNEL staining was added to the aforementioned immunostaining to check whether cells expressing active caspase-3 presented DNA fragmentation. Fig. 3 shows the combined staining of active caspase-3 with TUNEL, coupled with GFAP (Fig. 3A) and NeuN (Fig. 3B) immunostaining of the striatum from 3-NPA-treated rats. Some magnifications of different regions belonging to these images are included (Fig. 3C–H). In intoxicated animals, TUNEL staining was not observed in the non-injured part of the striatum (Fig. 3C and D) and appeared in both the perilesional rim (Fig. 3E and F) and the injured part (Fig. 3G and H). In the lesion, colocalization of TUNEL and active caspase-3 only occurred in neurons (Fig. 3F and H, white thin arrows). Merged positive TUNEL and active caspase-3 staining were not found colocalizing with the remaining GFAP staining (Fig. 3E and G, pink arrowheads). Active caspase-3 and TUNEL positive neurons were more abundant in the rim of the lesion than in its core. In the rim of the lesion, some active caspase-3 negative and TUNEL positive neurons were observed (Fig. 3F, cyan thick arrows). Finally, active caspase-3 positive and TUNEL negative neurons were also found (Fig. 3F and H, yellow open arrows), more abundantly in the core (Fig. 3H) than in the rim of the lesion (Fig. 3F). TUNEL positive staining did not appear in cortex of treated animals, or in cortex and striatum of control animals (data not shown).

4. Discussion

We studied the presence of active caspase-3 and DNA fragmentation in neurons and astrocytes from brains of rats treated with 3-NPA, according to a subacute administration protocol. As it has already been described (Brouillet et al., 1999; Blum et al., 2001; Duran-Vilaregut et al., 2009), the intraperitoneal administration of 3-NPA produced severe injury in the lateral part of the striatum of rat brains. It is also known that the toxin produces a lateral focused lesion with a perilesional rim that progressively extends along the striatum (Nishino et al., 1995, 1997). Therefore, although the extension of the injured, non-injured and perilesional rim areas is supposed to vary as the lesion progresses, one can assume that, at any time point of this progression, cells in each of these areas will be in the same physiological stage. We observed here that active caspase-3 staining was almost completely absent in the core of the striatal lesion and was weak in its rim. In both sites, the active protease mainly colocalized with neurons. In contrast, active caspase-3 staining was vivid and widely distributed in non-injured striatal areas and the cortex, but colocalized with the cell bodies of astrocytes instead of neurons. TUNEL staining was confined to the striatal injured area, and colocalized mainly with neurons. In

control rats, striatal and cortical active caspase-3 staining was detected with the same pattern as that observed in the non-injured striatum and cortex of treated animals, and it also colocalized with astrocytes. In control animals, TUNEL staining was not found at all.

The role of apoptosis in neurodegenerative diseases remains controversial, as it has been emphasized in recent reviews about HD (Hickey and Chesselet, 2003; Gil and Rego, 2008) and Alzheimer's disease (AD, Raina et al., 2003). Studies performed in post-mortem tissue from AD patients revealed a clear elevation of the upstream caspases from the apoptotic cascade in neurons containing neurofibrillary tangles, while, in these cells, effector caspases such as 3 or 7 remained at control levels (Raina et al., 2001). In the same report, caspase-6, which is also considered an effector caspase, was found associated to senile plaques but not to neurons. This novel phenomenon, in which the activation of upstream apoptotic cascade signals does not lead to the activation of the downstream caspase effectors, has been called apoptotic avoidance or abortosis and proposed to play a significant role in prolonging neuronal survival in AD (Raina et al., 2001, 2003). Furthermore, it has been suggested that apoptosis, which in fact requires only 16–24 h to be completed, would be a mathematically improbable mechanism involved in the neurodegeneration observed in a chronic disease like AD, with an average duration of almost 10 years (Perry et al., 1998; Zhu et al., 2006). Regarding HD, evidence of apoptosis based on caspase activation has been found in post-mortem HD brains (Ona et al., 1999; Sánchez et al., 1999; Vis et al., 2005). When the existing transgenic models of HD are considered, reports come to different conclusions, since the activation of apoptosis varies depending on the severity of the model studied (Hickey and Chesselet, 2003). Evidence of transcriptional caspase-1 and -3 up-regulation has been found in R6/2 mice, the first transgenic model of the disease to be developed (Sanchez Mejia and Friedlander, 2001). This suggests that caspases play a role in HD. Moreover, administration of caspase inhibitors such as minocycline to these mice increased their survival and improved their motor response (Chen et al., 2000). Regarding the 3-NPA model of HD, there is variation in the results. Intraperitoneal injection and subcutaneous pump implantation are the two systemic methods of *in vivo* administration that have been used by researchers to induce this model in experimental animals. In both cases, the lesions produced in their striatum mimicked the histopathology of HD (Brouillet et al., 1999; Yang et al., 2004). In the *in vivo* studies, the molecular mechanisms underlying neuronal degeneration seem to differ depending on the systemic administration method. Intraperitoneal administration of 3-NPA in an acute dose of 30 mg/kg to Sprague–Dawley rats (Duan et al., 2000) or two doses of 50 mg/kg at 90-min intervals to Lewis rats (Bizat et al., 2003a) led, in both reports, to an increase in the levels of active caspase-3 and DNA fragmentation in the striatum of the treated rats compared to the controls. Conversely, the administration of two intraperitoneal doses of 15 mg/kg of 3-NPA separated by 24 h to Wistar rats provoked only minor and transient activation of caspase-3 11 h after the second injection (Del Río and Massieu, 2008). When 3-NPA is chronically administered, activation of caspase-3 remains at control levels (Bizat et al., 2003a) or even below them (Bizat et al., 2003b). In addition, increased activity of the Ca^{2+} -activated neutral protease called calpain, which is usually associated with necrosis (Wang, 2000), is detected in the striatum (Bizat et al., 2003a,b). This fact, and the subsequent discovery of the ability of calpain to directly cleave the active form of caspase-3 (Bizat et al., 2003b), suggests that, in this model, active caspase-3 is not required for 3-NPA to induce striatal degeneration. However, it has subsequently been shown that the administration of a systemic broad-spectrum active caspase inhibitor attenuates 3-NPA toxicity in a similar chronic model (Yang et al., 2004).

The nature of the cells that express increased levels of active caspase-3 or calpain was not investigated in any of the aforementioned *in vivo* studies, as the analysis was performed mainly by means of Western blot and proteolytic activity assay techniques. In the present report, we used a subacute model of HD and confirmed the presence of neurons expressing active caspase-3 in the injured area of the striatum of treated rats, which is in agreement with the increase in active caspase-3 levels observed in acute models by Duan et al. (2000) and Bizat et al. (2003a). In addition, our findings indicate that there is constitutive expression of active caspase-3 in the bodies of astrocytes. We demonstrated that astrocytes are affected by 3-NPA, since GFAP positive staining in the core of the lesion does not colocalize with active caspase-3 staining. This could provide an additional explanation for the fact that, in chronic models of 3-NPA administration, active caspase-3 remains at control levels or even below them during the intoxication. In these cases, the overexpression of active caspase-3 in neurons due to 3-NPA administration could be counteracted by the loss of active protease that is constitutively expressed in the bodies of astrocytes. Thus, neurons could experience apoptosis mediated by active caspase-3 in chronic models of 3-NPA administration. However, the increase in striatal levels could not be appreciable by proteolytic activity assays or Western blot techniques.

It is important to emphasize that the pycnotic neurons in the injured area of the striatum of 3-NPA-treated rats display different patterns of staining. Active caspase-3 and TUNEL positive neurons are the most abundant. These neurons are supposed to undergo a classic apoptotic process, since TUNEL in conjunction with active caspase-3 is considered a reliable tool for assessing apoptosis progression (Lei et al., 2004). Active caspase-3 positive and TUNEL negative neurons are also found. This indicates that in these cells, either the apoptotic cascade has been stopped before DNA fragmentation, an event that is downstream to the protease activation, or DNA fragmentation has still not taken place. In relation to the former possibility, it has been shown that expression of survivin, a protein with the ability to inhibit the activity, but not the activation, of caspase-3 (Tamm et al., 1998), has a parallel pattern of expression to active caspase-3 after traumatic brain injury in rats and may attenuate the DNA fragmentation induced by the protease (Johnson et al., 2005). The last remarkable group of neurons located in the injured striatal area corresponds to active caspase-3 negative and TUNEL positive stained neurons, which may be involved in a caspase-independent apoptotic process. Almeida et al. (2006) supported this idea, as they found that, after exposing cultured cortical neurons to 3-NPA, cell death was mediated in part by the release of apoptotic-inducing factor (AIF), an endonuclease involved in DNA fragmentation (Susin et al., 1999).

The astrocytes present in the cortex and striatum of brains from control rats and cortex and striatal non-injured areas of 3-NPA-treated animals had positive staining for active caspase-3 in their cellular bodies. Caspase-3 is one of the caspase family members, which are a set of cysteine proteases present as inactive precursors in virtually all mammalian cells. They are involved in different stages of the apoptotic cell death process, in which they act as either initiators or effectors. Caspase-3 is the most abundant cysteine protease in the brain and is considered an effector, since it is activated by initiator caspases and becomes one of the enzymes that is responsible for the proteolysis observed in the latter phases of apoptosis (Taylor et al., 2008). However, evidence of active caspase-3 involvement in neuronal processes that are not linked to apoptosis, such as synaptic remodeling or neuroprotection, is in fact growing (Schwerk and Schulze-Osthoff, 2003; McLaughlin, 2004). In addition, there seems to be some relationship between this protease and constitutive glia. Active caspase-3 has been found in the nuclei of Bergmann glia and subpopulations of astrocytes in

the cerebellar cortex, hippocampus and spinal cords of adult rats of different strains, without playing an apoptotic role (Noyan-Ashraf et al., 2005). These authors suggested that the active protease could process transcription factors as some of the members of the FOXO family, which contain a conserved caspase-3 cleavage site (Charvet et al., 2003), instead of the normal apoptotic substrates. In a subsequent study carried out with Bergmann glia cultures, active caspase-3 appeared to function as both an inducer and maintenance factor for the differentiation of this cellular type (Oomman et al., 2006). Furthermore, when an excitotoxic cortical damage paradigm was applied to postnatal rat brains, some active caspase-3 was observed in neurons. However, most of the protease was found in the nuclei of astrocytes during the study interval (Acarin et al., 2007). Astrocytes were mainly TUNEL negative, which suggests a non-apoptotic function, and it was hypothesized that the protease may participate in astrocyte cytoskeletal remodeling processes. Interestingly, the authors found astrocytes with active caspase-3 in their nuclei in the cingulum of the corpus callosum of control and saline-injected brains. On this basis, our work represents progress in the study of active caspase-3 in non-apoptotic processes, since our results suggest that, in the absence of injury, protease in its active form is constitutively present in astrocytes from the cortex and striatum of the brain of rats, and does not indicate cell death. The lack of TUNEL staining supports this hypothesis.

We conclude that part of the neuronal degeneration in striatum due to the intraperitoneal administration of 3-NPA is produced via active caspase-3 apoptotic signaling, while active caspase-3 in astrocytes is merely constitutive. These different roles of active caspase-3 can lead to misinterpretation in studies in which cellular compartments are omitted.

Acknowledgments

This work was supported by grants BFU/2006-11981 and SAF/2006-13092 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain); PI080400 and Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER) from the Instituto de Salud Carlos III; and 2005/SGR00893 from the Generalitat de Catalunya.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neuint.2009.12.001.

References

- Acarin, L., Villapol, S., Faiz, M., Rohn, T.T., Castellano, B., González, B., 2007. Caspase-3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation. *Glia* 55, 954–965.
- Almeida, S., Domingues, A., Rodrigues, L., Oliveira, C.R., Rego, A.C., 2004. FK506 prevents mitochondrial-dependent apoptotic cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat primary cortical cultures. *Neurobiol. Dis.* 17, 435–444.
- Almeida, S., Brett, A.C., Góis, I.N., Oliveira, C.R., Rego, A.C., 2006. Caspase-dependent and -independent cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat cortical neurons. *J. Cell. Biochem.* 98, 93–101.
- Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Miller, J.M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B.R., Hyman, B.T., 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13, 4181–4192.
- Bignami, A., Dahl, D., 1977. Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 466–469.
- Bizat, N., Hermel, J.M., Boyer, F., Jacquard, C., Créminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Kajewski, S., Brouillet, E., 2003a. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced *in vivo* by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23, 5020–5030.
- Bizat, N., Hermel, J.M., Humbert, S., Jacquard, C., Créminon, C., Escartin, C., Saudou, F., Krajewski, S., Hantraye, P., Brouillet, E., 2003b. *In vivo* calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J. Biol. Chem.* 278, 43245–43253.

- Blum, D., Gall, D., Cuvelier, L., Schiffmann, S.N., 2001. Topological analysis of striatal lesions induced by 3-nitropropionic acid in the Lewis rat. *Neuroreport* 12, 1769–1772.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 11, 3155–3162.
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., Hantraye, P., 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59, 427–468.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D., 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 95, 1521–1540.
- Charvet, C., Alberti, I., Luciano, F., Jacqué, A., Bernard, A., Auberger, P., Deckert, M., 2003. Proteolytic regulation of Forkhead transcription factor FOXO3a by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 22, 4557–4568.
- Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Fink, K.B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L.A., Hersch, S.M., Hobbs, W., Vonsattel, J.P., Cha, J.H., Friedlander, R.M., 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6, 797–801.
- Del Río, P., Massieu, L., 2008. Mild mitochondrial inhibition in vivo enhances glutamate-induced neuronal damage through calpain but not caspase activation: role of ionotropic glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 212, 179–188.
- Diwakarla, S., Mercer, L.D., Kardashyan, L., Chu, P.W., Shin, Y.S., Lau, C.L., Hughes, M.L., Nagley, P., Beart, P.M., 2009. GABAergic striatal neurons exhibit caspase-independent, mitochondrially mediated programmed cell death. *J. Neurochem.* 109 (Suppl. 1), 198–206.
- Duan, W., Guo, Z., Mattson, M.P., 2000. Participation of par-4 in the degeneration of striatal neurons induced by metabolic compromise with 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 165, 1–11.
- Duran-Vilaregut, J., del Valle, J., Camins, A., Pallás, M., Pelegrí, C., Vilaplana, J., 2009. Blood–brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Neurotoxicology* 30, 136–143.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439–1451.
- Galas, M.C., Bizat, N., Cuvelier, L., Bantubungí, K., Brouillet, E., Schiffmann, S.N., Blum, D., 2004. Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 15, 152–159.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493–501.
- Gil, J.M., Rego, A.C., 2008. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2803–2820.
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L., 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505–519.
- Hedreen, J.C., Folstein, S.E., 1995. Early loss of neostriatal striosome neurons in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 105–120.
- Hickey, M.A., Chesselet, M.F., 2003. Apoptosis in Huntington's disease. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 255–265.
- Johnson, E.A., Svetlov, S.I., Wang, K.K., Hayes, R.L., Pineda, J.A., 2005. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats. *Exp. Brain Res.* 167, 17–26.
- Lei, B., Popp, S., Capuano-Waters, C., Cottrell, J.E., Kass, I.S., 2004. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 125, 691–701.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., Cheng, A., 2008. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60, 748–766.
- McLaughlin, B., 2004. The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling. *Apoptosis* 9, 111–121.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201–211.
- Nicotera, P., Leist, M., Manzo, L., 1999. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 46–51.
- Nishino, H., Shimano, Y., Kumazaki, M., Sakurai, T., 1995. Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood–brain barrier. *Neurosci. Lett.* 186, 161–164.
- Nishino, H., Kumazaki, M., Fukuda, A., Fujimoto, I., Shimano, Y., Hida, H., Sakurai, T., Deshpande, S.B., Shimizu, H., Morikawa, S., Inubushi, T., 1997. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood–brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci. Res.* 27, 343–355.
- Noyan-Ashraf, M.H., Brandizzi, F., Juurlink, B.H., 2005. Constitutive nuclear localization of activated caspase 3 in subpopulations of the astroglial family of cells. *Glia* 49, 588–593.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., Yuan, J., Penney, J.B., Young, A.B., Cha, J.H., Friedlander, R.M., 1999. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399, 263–267.
- Oomman, S., Strahlendorf, H., Dertien, J., Strahlendorf, J., 2006. Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. *Brain Res.* 1078, 19–34.
- Perry, G., Nunomura, A., Lucassen, P., Lassmann, H., Smith, M.A., 1998. Apoptosis and Alzheimer's disease. *Science* 282, 1268–1269.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J.C., Price, D.L., Koliatsos, V.E., 1995. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15, 3775–3787.
- Raina, A.K., Hochman, A., Zhu, X., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Siedlak, S.L., Boux, H., Castellani, R.J., Perry, G., Smith, M.A., 2001. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 101, 305–310.
- Raina, A.K., Zhu, X., Shimohama, S., Perry, G., Smith, M.A., 2003. Tipping the apoptotic balance in Alzheimer's disease: the abortosis concept. *Cell Biochem. Biophys.* 39, 249–255.
- Sánchez, I., Xu, C.J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., Yuan, J., 1999. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22, 623–633.
- Sanchez Mejia, R.O., Friedlander, R.M., 2001. Caspases in Huntington's disease. *Neuroscientist* 7, 480–489.
- Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K., 2003. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1453–1458.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J.C., 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58, 5315–5320.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 231–241.
- Thuret, G., Chiquet, C., Herrag, S., Dumollard, J.M., Boudard, D., Bednarz, J., Campos, L., Gain, P., 2003. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *Br. J. Ophthalmol.* 87, 346–352.
- Túnez, I., Collado, J.A., Medina, F.J., Peña, J., del, C., Muñoz, M., Jimena, I., Franco, F., Rueda, I., Feijóo, M., Muntané, J., Montilla, P., 2006. 17 beta-estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem. Int.* 48, 367–373.
- Vis, J.C., Schipper, E., de Boer-van Huizen, R.T., Verbeek, M.M., de Waal, R.M., Wesseling, P., ten Donkelaar, H.J., Kremer, B., 2005. Expression pattern of apoptosis-related markers in Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* 109, 321–328.
- Walling, H.W., Baldassare, J.J., Westfall, T.C., 1998. Molecular aspects of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 54, 301–308.
- Wang, K.K., 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23, 20–26.
- Yang, L., Sugama, S., Mischak, R.P., Kiaei, M., Bizat, N., Brouillet, E., Joh, T.H., Beal, M.F., 2004. A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol. Dis.* 17, 250–259.
- Zhu, X., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A., 2006. Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 393–396.

ARTICLE 3

**NEURONAL APOPTOSIS IN THE STRIATUM OF RATS TREATED WITH 3
NITROPROPIONIC ACID IS NOT TRIGGERED BY CELL-CYCLE RE-ENTRY**

Joaquim Duran-Vilaregut, Gemma Manich, Jaume del Valle, Mercè Pallàs,
Antoni Camins, Carme Pelegrí i Jordi Vilaplana

Neurotoxicology 2011; 32: 734-741

RESUM

Objectius: Establir si les neurones apoptòtiques presents en l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA, identificades amb marcatge TUNEL, expressen els marcadors de la fase G1 del cicle cel·lular CDK4 i CyD. A més a més, estudiar el patró de marcatge de les proteïnes pRb i Ki67, ambdues involucrades en la regulació del cicle cel·lular.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates SD de 220-250 g de pes. El model experimental es va induir administrant a les rates una dosi de 3-NPA de 20 mg/kg per via intraperitoneal durant 3 dies (dia 0, 1 i 2). Al mateix temps, un grup control es va injectar amb sèrum fisiològic. El dia 6, es van anestessiar els animals, es van perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció de l'encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a -80 °C. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos dirigits contra la CyD, la CDK4 (ambdues marcadors de la fase G1 del cicle), la pRb (proteïna nuclear que inhibeix la transcripció de gens que són necessaris per la progressió del cicle cel·lular), la Ki67 (proteïna present a totes les fases actives del cicle cel·lular), el NeuN (per visualitzar les neurones) i la GFAP (per visualitzar els astròcits). Alguns procediments immunohistoquímics van incloure també el marcatge TUNEL (kit per detectar la mort cel·lular *in situ*). Les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal.

Resultats: Primerament es va estudiar l'expressió de CDK4 i CyD a les neurones positives per al marcatge de TUNEL. Al cos estriat de les rates control no es van trobar neurones marcades amb TUNEL o amb CDK4 (Figura 24 E). Com era d'esperar, aquests dos marcatges tampoc es van trobar a l'àrea del cos estriat no afectada per la toxina de les rates tractades (Figura 24 D). El marcatge amb TUNEL es va detectar a la vora de la lesió i dèbilment en el centre de la mateixa (Figura 24 B). D'altra banda, el marcatge amb CDK4 era absent a la vora de la lesió però apareixia de forma abundant i intensa al centre de la zona lesionada en neurones (Figura 24 C). Les neurones del centre de la lesió que mostraven CDK4 no mostraven TUNEL, el seu marcatge de NeuN era més dèbil que el de les neurones positives per TUNEL i, a més a més, no mostraven marcatge nuclear de Hoechst (Figura 24 G, inset). Pel que fa a les neurones positives per TUNEL, no mostraven marcatge de CDK4 i sempre tenien marcatge nuclear de Hoechst, encara que en alguns casos era lleu (Figura 24 F, inset).

De forma similar a l'observat per a la CDK4, la CyD no es va detectar en el cos estriat dels animals control o en les zones no lesionades dels tractats. En els animals tractats es va detectar en algunes cèl·lules de la vora de la lesió que es va veure que eren astròcits. Igual que passava amb la CDK4, les neurones positives per TUNEL no mostraven expressió de CyD. El marcatge intens de CyD apareixia al centre de la lesió en neurones que no mostraven marcatge de TUNEL, tenien un marcatge de NeuN més feble que les de la vora de la lesió i no tenien marcatge nuclear de Hoechst (no es mostra la figura al resum).

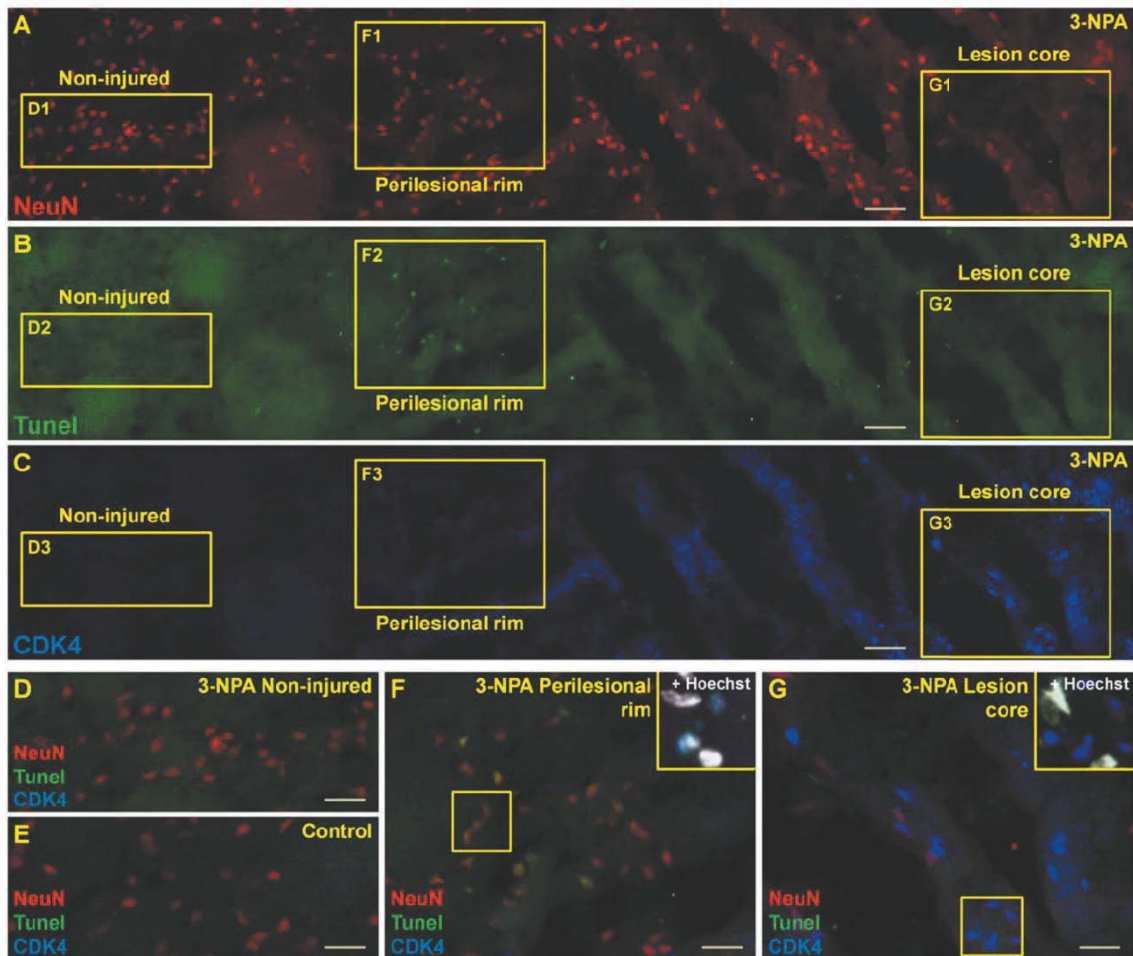


Figura 24. Marcatge de NeuN, TUNEL i CDK4 d'una secció del cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA. Marcatges representatius de NeuN, TUNEL i CDK4 en seccions criostàtiques del cos estriat de cervell de rates tractades amb 3-NPA (A, B i C) i rates control (E). En el cas de les rates tractades, les imatges es van obtenir a partir de la superposició de fotografies seriadades de l'estriat i inclouen zones lesionades i no lesionades. A) Marcatge de neurones amb l'anticòs NeuN. B) Marcatge de TUNEL. C) Marcatge de CDK4. E) Colocalització de NeuN, TUNEL i CDK4. D, F, G) Ampliacions de les tres zones de l'estriat, zona no lesionada, vora de la lesió i centre de la lesió, d'un animal tractat amb 3-NPA en les que es mostra la colocalització de NeuN, TUNEL i CDK4. Els insets a les Figures F i G mostren una ampliació de la zona seleccionada que inclou marcatge nuclear amb Hoechst. Barres d'escala a A, B i C: 100 µm; a D, E, F i G: 50 µm.

Pel que fa a la pRb, el marcatge de les rates control va permetre veure que la proteïna era expressada constitutivament per les neurones del cos estriat. En els animals tractats amb 3-NPA, es va veure que les neurones de la lesió estriatal perdien la proteïna tan bon punt començaven a degenerar. L'addició del marcatge de TUNEL va permetre veure que les neurones positives per TUNEL ja no expressaven la pRb (Figura 25).

El marcatge de Ki67 va mostrar uns resultats similars als obtinguts per a la pRb. La Ki67 era expressada, tot i que de forma feble, per les neurones del cos estriat, i es va veure que el tractament amb 3-NPA induïa la pèrdua de l'expressió de la proteïna per part de les neurones estriatals afectades. El triple marcatge amb TUNEL va mostrar, igual que per a la pRb, que cap de les neurones positives per TUNEL expressava Ki67. Cal destacar que el tractament amb 3-NPA induïa una expressió intensa de Ki67 en algunes cèl·lules, que no eren neurones en cap cas (Figura 26).

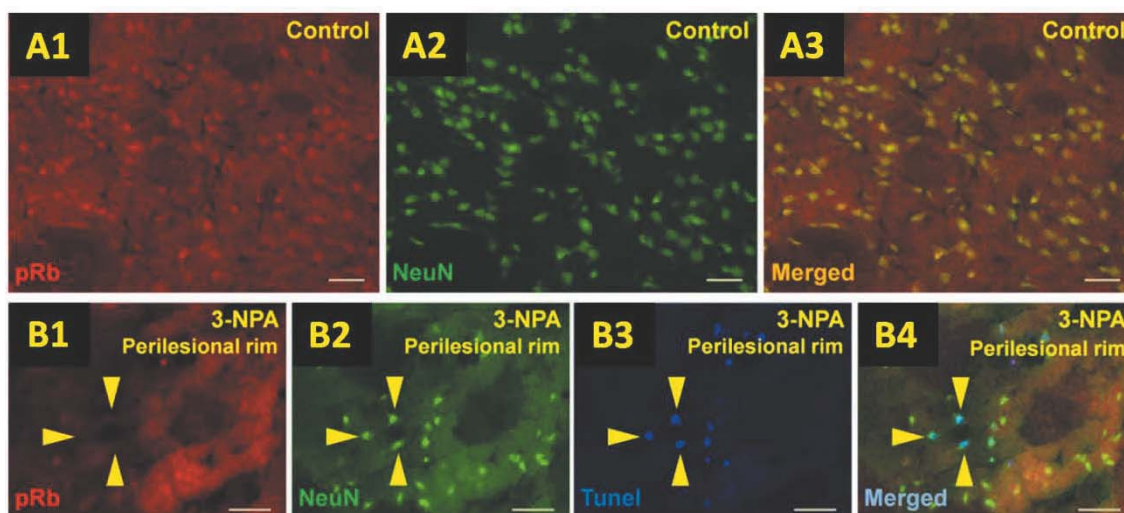


Figura 25. Marcatge de pRb i NeuN en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA. Marcatges representatius de pRb i NeuN en seccions criostàtiques del cos estriat de cervell de rates control (A1, A2 i A3) i tractades amb 3-NPA (B1, B2, B3 i B4). En el cas de les rates tractades, només es mostra una imatge corresponent a la vora de la lesió estriatal i s'inclou el marcatge de TUNEL. A1, A2 i A3) Colocalització del marcatge de pRb amb NeuN. B1, B2, B3 i B4) Colocalització del marcatge de pRb amb NeuN i TUNEL. Barres d'escala: 50 μ m.

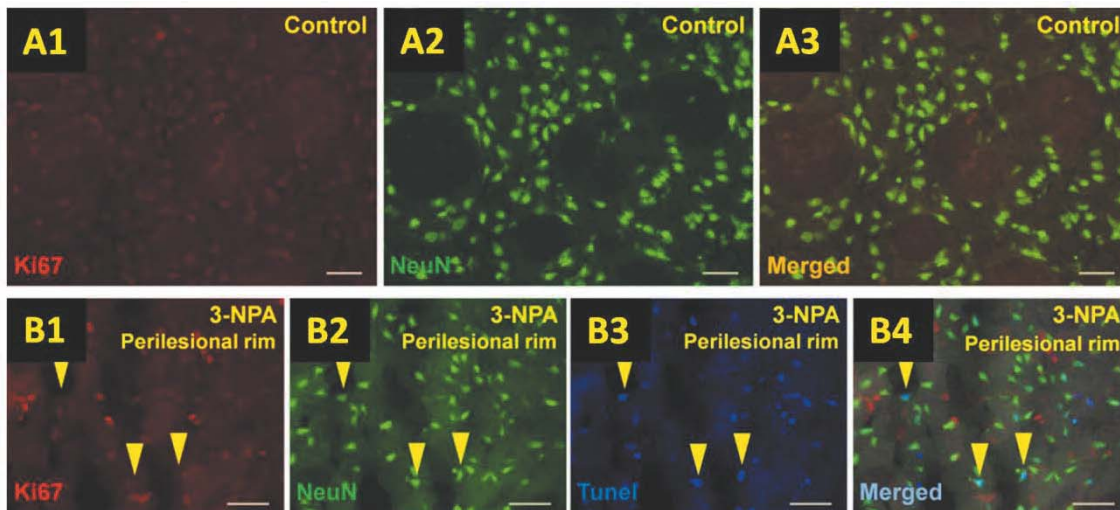


Figura 26. Marcatge de Ki67 i NeuN en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA. Marcatges representatius de Ki67 i NeuN en seccions criostàtiques del cos estriat de cervell de rates control (A1, A2 i A3) i tractades amb 3-NPA (B1, B2, B3 i B4). En el cas de les rates tractades, només es mostra una imatge corresponent a la vora de la lesió estriatal i s'inclou el marcatge de TUNEL. A1, A2 i A3) Colocalització del marcatge de Ki67 amb NeuN. B1, B2, B3 i B4) Colocalització del marcatge de Ki67 amb NeuN i TUNEL. Barres d'escala: 50 μ m.

Conclusions: La reentrada al cicle cel·lular no està implicada en l'inici de la degeneració neuronal observada a la lesió del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA. Per tant, l'expressió de marcadors de cicle de la fase G1 trobada a les neurones del centre de la lesió que no expressen TUNEL ni Hoechst es considera una resposta aberrant cap a la supervivència.



Neuronal apoptosis in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid is not triggered by cell-cycle re-entry

Joaquim Duran-Vilaregut^{a,c}, Gemma Manich^a, Jaume del Valle^{a,c}, Mercè Pallàs^{b,c}, Antoni Camins^{b,c}, Carme Pelegrí^{a,c,1}, Jordi Vilaplana^{a,c,1,*}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., E-08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., E-08028 Barcelona, Spain

^c CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2011

Accepted 22 July 2011

Available online 30 July 2011

Keywords:

3-Nitropropionic acid

Cell-cycle re-entry

Apoptosis

Neurodegeneration

Immunohistochemistry

ABSTRACT

Although terminally differentiated neurons lack the capacity to undergo cell division, they retain the capacity to reactivate the cell cycle. This reactivation, however, has been linked to the degeneration of neurons in many experimental models of neurodegenerative disease and in *post-mortem* brains of affected patients. Expression of markers of the G1 phase and apoptotic neurons has been detected in the striatal lesion of rats treated with 3-nitropropionic acid (3-NPA). Here we examined whether neuronal apoptosis induced by 3-NPA was mediated by the reactivation of the cell cycle. To this end, we studied whether TUNEL-positive neurons expressed the G1-phase markers cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and cyclin D (CyD). In addition, we also evaluated the neuronal expression of pRb and Ki67 antigens, both of which are involved in the regulation of cell-cycle progression. In 3-NPA-treated rats, CDK4 and CyD were not detected in TUNEL-positive neurons, but they were expressed in neurons in the core of the lesion, which were assumed to be in a more advanced stage of degeneration, since they had weaker NeuN staining and lacked Hoechst staining. In addition, injured neurons in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats had lost the constitutive expression of pRb and Ki67 that we had detected in control animals. Taken together, these results indicate that neuronal apoptosis in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats was not triggered by cell-cycle re-entry, and we conclude that expression of G1 markers may be considered an aberrant survival response, with no relation to the mechanisms of apoptosis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The cell cycle is a tightly regulated process that is essential to the control of development, differentiation and proliferation of eukaryotic cells. It proceeds through five phases, G0, G1, S, G2 and M, and requires the coordinated participation of several proteins, including cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), the retinoblastoma family of “pocket” proteins, namely retinoblastoma protein (pRb), p107 and p130, and members of the E2F transcription factor family (Greene et al., 2007; Rashidian et al.,

2007). Although it may seem contradictory, the fact that cell proliferation and cell death show similar morphological changes, including substrate detachment, cell rounding, cell shrinkage and chromatin condensation, and share some common cell-cycle regulators, suggests a link between cell cycle and apoptosis (Vermeulen et al., 2003; Wang et al., 2009). Moreover, it has been proposed that cell proliferation and cell death are linked in such a way that any initiation of mitotic machinery also primes the apoptotic cascades, which may serve as a safety measure to abort uncontrolled proliferation of cells (Stoica et al., 2009). Such a link is also found in the case of post-mitotic, terminally differentiated neurons, which, despite having no capacity to undergo cell division, retain the ability to reactivate the cell cycle in response to central nervous system (CNS) insults. However, this reactivation, far from being mitogenic, is lethal for the neurons (Yang and Herrup, 2007).

Furthermore, cell-cycle activation plays an active role in the acute CNS damage induced by cerebral ischemia, brain trauma or spinal cord injury, promoting apoptosis in neurons and cellular proliferation/activation in astroglia and microglia that may contribute to neurotoxicity (Byrnes and Faden, 2007; Stoica

Abbreviations: 3-NPA, 3-nitropropionic acid; AD, Alzheimer's disease; CDK, cyclin-dependent kinase; CNS, central nervous system; CyD, cyclin D; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MCCII, mitochondrial respiratory chain complex II; NeuN, neuronal antigen nuclei; PBS, phosphate buffered saline; pRb, retinoblastoma protein; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author at: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n., E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4024505;

fax: +34 93 4035901.

E-mail address: vilaplana@ub.edu (J. Vilaplana).

¹ Contributed equally to this study.

et al., 2009). Many studies have also revealed abnormal expression of cell-cycle proteins in *post-mortem* brains from patients suffering from neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease (Becker and Bonni, 2004; Herrup et al., 2004; Wang et al., 2009). Moreover, neuronal apoptosis linked to cell-cycle re-entry has been described in several models of neurodegeneration induced by neurotrophic factor deprivation (Park et al., 1997) or the administration of diverse neurotoxins such as kainic acid (Ino and Chiba, 2001; Smith et al., 2003; Verdaguer et al., 2002), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (Höglinger et al., 2007), β -amyloid (Majd et al., 2008), camptothecin (Park et al., 2000), thrombin (Rao et al., 2007) and lead (Li et al., 2008).

3-Nitropropionic acid (3-NPA) is a natural toxin that irreversibly inhibits the mitochondrial respiratory chain complex II (MCCII). This inhibition leads to a rapid fall in ATP, with a concomitant rise in the production of reactive oxygen species (ROS) and delayed activation of *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptors. This in turn induces a second rise in ROS production that eventually triggers neuronal cell death (Liot et al., 2009). 3-NPA is widely used to induce experimental models of Huntington's disease in laboratory animals such as rodents and non-human primates, taking advantage of its capacity to reproduce the brain lesions observed in the disease, which mainly consist of specific striatal neurodegeneration (Brouillet et al., 2005).

Some authors claim that cell-cycle activation has a significant role in 3-NPA-induced neuronal cell death. Flavopiridol, an inhibitor of CDKs, blocked the delayed death of cultured cortical neurons evoked by exposure to the toxin (Park et al., 2000). Moreover, it was recently shown, both *in vitro* and *in vivo*, that 3-NPA reduced the level of the CDK inhibitor p27 and induced phosphorylation of pRb in striatal neurons, thus indicating the reactivation of the cell cycle (Akashiba et al., 2008). In a previous study we detected, in the injured striatal areas of brains of treated rats, some neurons with increased expression of cell-cycle markers of the G1 phase, namely CDK4 and cyclin D (CyD) among others (Pelegrí et al., 2008). Moreover, in another study we identified apoptotic neurons with a pyknotic appearance which were positive for active caspase-3 and TUNEL staining in the striatal lesions of intoxicated rats (Duran-Vilaregut et al., 2010). Thus, the present study examines whether apoptotic neurons in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats, identified by TUNEL staining, express the G1 cell cycle markers CDK4 and CyD. Both early G1 elements are believed to have a prominent role in neuronal apoptosis (Becker and Bonni, 2004; Wang et al., 2009). Furthermore, we also studied the pattern of expression of pRb and Ki67 antigens in the striatum of control and 3-NPA treated rats, since both proteins are involved in cell-cycle regulation. pRb is a nuclear protein that represses transcription of genes required for cell cycle progression and is regulated by CDK-mediated phosphorylation (Inoue et al., 2007). The antigen detected by Ki67 antibody is a large protein that is used as a marker of cell proliferation, since it is expressed in all active stages of the cell cycle and is absent in resting cells (Schlüter et al., 1993).

2. Materials and methods

2.1. Animals and 3-NPA treatment

Male Sprague-Dawley rats (220–250 g, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) with access to food and water *ad libitum* were kept in standard conditions of temperature (22 ± 2 °C) and 12:12-h light–dark cycles (300 lx/0 lx). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. One group of 10 rats (treated group) was injected with saline solution containing 3-NPA

(Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) adjusted to pH 7.4 with NaOH, at a dose of 20 mg/kg i.p. once a day for 3 days (days 0, 1 and 2). The control group, which included 5 animals, was injected only with saline solution. On day 6, both groups of animals were sacrificed and their brains were excised. All rats were evaluated daily from day 0 until day 6 of the experiment for both body weight loss and motor impairment, and the evolution observed was similar to that described in previous studies in our laboratory (Duran-Vilaregut et al., 2009).

2.2. Brain processing

Brains for immunohistochemistry and TUNEL staining were obtained as follows. Rats were anaesthetized with 80 mg/kg i.p. of sodium pentobarbital and intracardially perfused with 100 ml of physiological saline. Brains were then excised and snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80 °C. Thereafter, brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA, USA) and 20- μ m-thick cryostatic sections containing striatum were obtained. Slices were picked up on common slides, fixed with acetone for 10 min at 4 °C, allowed to dry at room temperature and finally frozen at -20 °C until staining.

2.3. Staining of brain sections

For the standard immunostaining method, slides with brain sections were allowed to thaw at room temperature and rehydrated with phosphate buffered saline (PBS) for 5 min before being blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma–Aldrich) for 20 min. They were then washed twice for 5 min in PBS and incubated with freshly prepared (following the manufacturer's instructions) TUNEL reaction mixture containing TdT enzyme and fluorescein-dUTP (*in situ* cell death detection kit from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) for 60 min at 37 °C. For negative controls, some brain sections were incubated with fluorescein-dUTP alone. Slides were then washed again and incubated with primary antibodies (see below) for 90 min at room temperature. After another wash, incubation with secondary antibodies (see below) was performed for 1 h at room temperature. Five minutes before the end of the second incubation, nuclear staining was performed by adding Hoechst (H-33258, Sigma–Aldrich) reagent at 10 mg/ml in PBS to the incubation medium to a final concentration of 2 mg/ml. Finally, the slides were washed, mounted using Prolong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) anti-fade medium, allowed to dry for 3 h at room temperature and stored at 4 °C in the dark. Immunostaining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies. All incubations were carried out in the dark.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-CyD1 (Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:100), rabbit polyclonal anti-CDK4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dilution 1:100), rabbit monoclonal anti-pRb (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; dilution 1:50), rabbit polyclonal anti-Ki67 antigen (Neomarkers, Fremont, CA, USA; dilution 1:100), mouse monoclonal anti-neuronal antigen nuclei (NeuN) (Millipore, Billerica, MA, USA; dilution 1:100) and mouse monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Abcam; dilution 1:100). AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG, and AlexaFluor 660 goat anti-mouse IgG (Invitrogen; dilution 1:250) were used as secondary antibodies.

2.4. Fluorescence microscopy analysis

Brain sections from 3-NPA-treated and control rats were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2, Leica

Microsystems, Wetzlar, Germany). In some cases, series of consecutive images were obtained for each staining and experimental group. In the case of treated animals, the sequence of images included injured and non-injured areas of the striatum. Once the image series had been collected, they were reconstructed in order to obtain single images, which were then merged using Image J (National Institute of Mental Health, North Bethesda, MD, USA) and Photoshop software (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA).

3. Results

As previously described (Duran-Vilaregut et al., 2010), 3-NPA induced a lesion in the lateral part of the striatum of treated rats. Following the same criteria established in this previous work, the non-injured part, the perilesional rim and the injured part of the striatum of 3-NPA-treated animals were considered in all immunostainings here studied. We first attempted to establish whether expression of cell-cycle markers of the G1 phase was related to 3-NPA-induced neuronal apoptosis. To this end, we ascertained whether apoptotic neurons, identified by TUNEL staining, were positive for CyD and CDK4. Fig. 1 shows representative images of the striatum of control and 3-NPA-treated rats in which immunostaining for CDK4 and NeuN was performed together with TUNEL staining. In the case of intoxicated

rats, a portion of the striatum including injured and non-injured areas is shown. TUNEL and CDK4 stains were not detected in control rats (Fig. 1E) or in the non-injured striatal areas of 3-NPA-treated animals (Fig. 1D). TUNEL staining was mainly detected in the rim of the striatal lesion (Fig. 1B, perilesional rim), while it was much weaker closer to the core (Fig. 1B, lesion core). Conversely, CDK4 staining was absent in the rim of the lesion (Fig. 1C, perilesional rim) but profusely detected in the deeper areas of the lesion (Fig. 1C, lesion core). Colocalization of both stains with NeuN stain revealed that TUNEL staining in the rim of the lesion was almost exclusively detected in neurons which did not show positive staining for CDK4 (Fig. 1F). TUNEL-positive, CDK4 negative neurons were, in turn, positive for Hoechst staining, although weakly so in some cases (Fig. 1F, inset). Closer to the core of the lesion, degenerating neurons showed no TUNEL staining (Fig. 1B) and weaker NeuN staining (Fig. 1A, lesion core). Moreover, they began to display positive staining for CDK4 (Fig. 1C, lesion core), in such a way that the weaker the NeuN staining, the more intense that of CDK4 (Fig. 1G). TUNEL-negative, CDK4-positive neurons did not show Hoechst staining (Fig. 1G, inset).

The same triple immunostaining design was performed to examine CyD instead of CDK4, and the results were similar. CyD was not detected in neurons either in the striata of control rats (Fig. 2A1) or in the non-injured striatal areas of 3-NPA treated animals (Fig. 2B1). CyD staining was sparingly detected in the rim

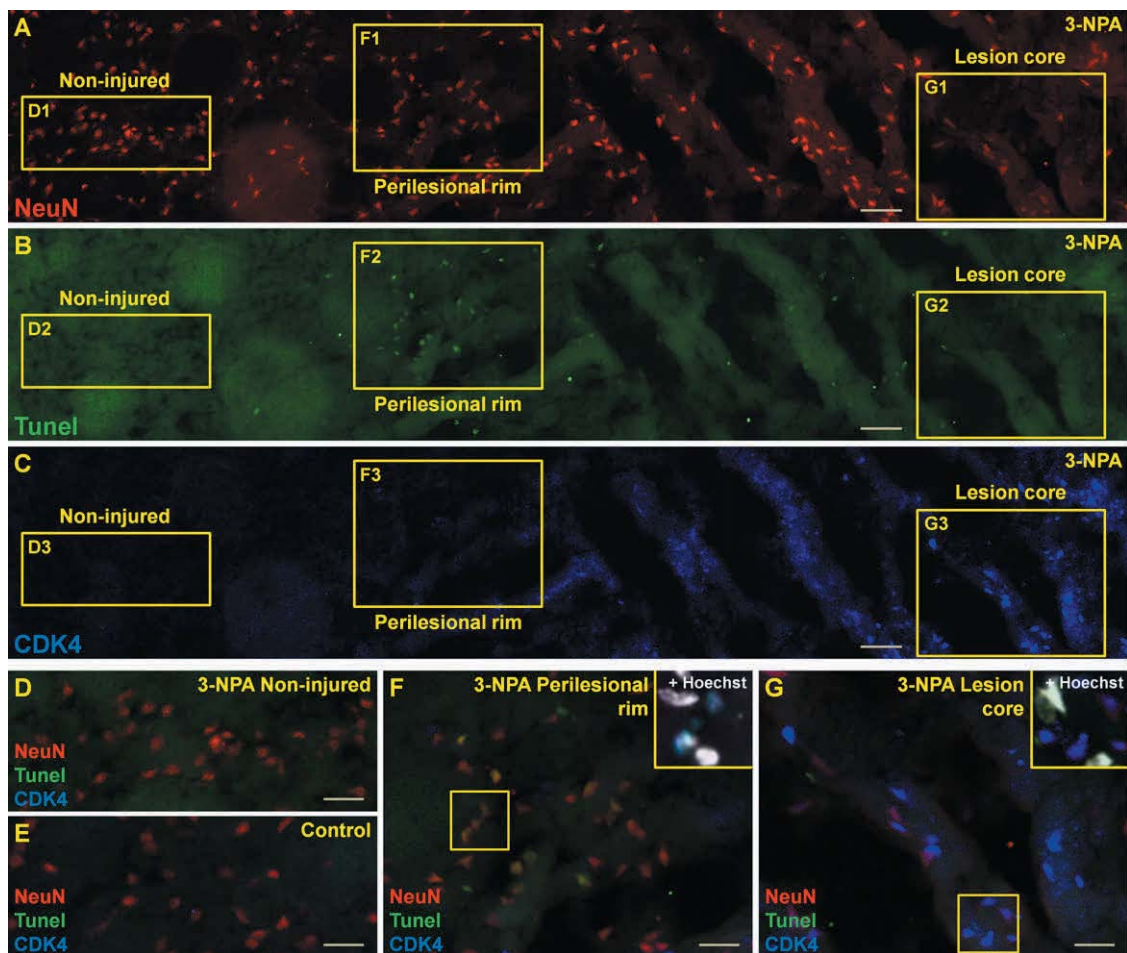


Fig. 1. Representative staining of NeuN, TUNEL and CDK4 in striatal sections from 3-NPA-treated (A, B and C) and control rats (E). In the case of 3-NPA-treated rats, images were obtained by overlapping serial photographs from the striatum including non-injured and injured areas. (A) Neurons stained by the anti-NeuN antibody. (B) TUNEL staining. (C) Staining of CDK4. (E) Overlapping of NeuN, TUNEL and CDK4 staining. (D, F and G) Magnifications of the three striatal areas considered in 3-NPA-treated animals, namely non-injured area, rim of the lesion and core of the lesion respectively, in which overlapping of NeuN, TUNEL and CDK4 staining is shown. Insets in Figures F and G show a magnification of the selected area that includes Hoechst staining. Scale bars in A, B and C: 100 μ m. Scale bars in D, E, F and G: 50 μ m.

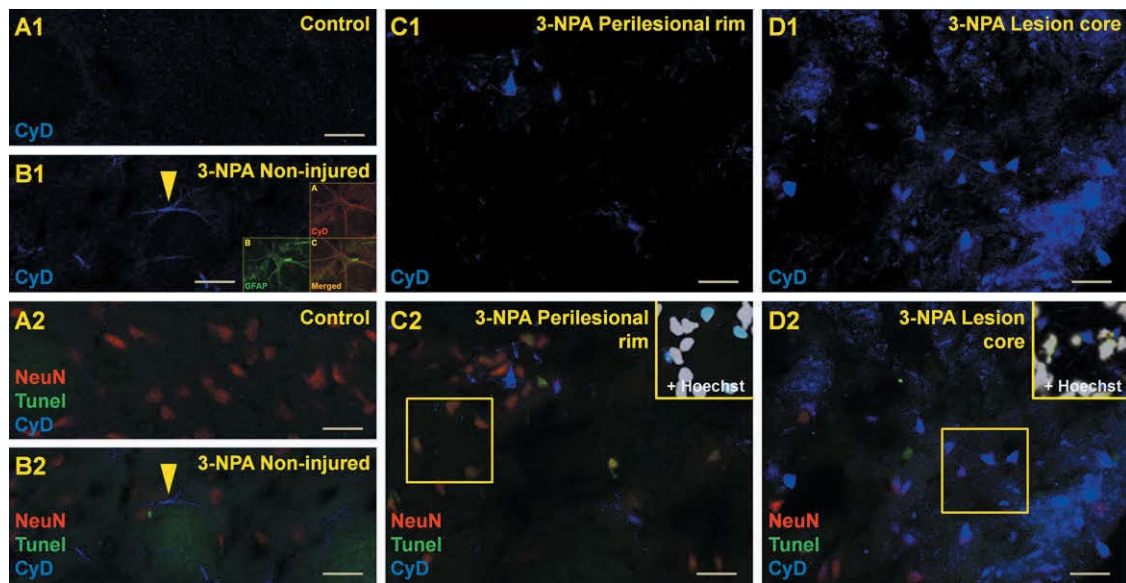


Fig. 2. Representative staining of CyD in striatal sections from control (A1) and 3-NPA-treated rats (B1, C1, and D1). In all cases, images in which CyD staining is overlapped with NeuN and TUNEL staining are also shown (A2: control rat; B2, C2 and D2: 3-NPA-treated rat). For 3-NPA-treated rats, three striatal areas are considered, namely non-injured area (B1 and B2), rim of the lesion (C1 and C2) and core of the lesion (D1 and D2). Insets in B1 show colocalization (Inset C) of CyD staining (Inset A) and GFAP staining (Inset B). Insets in figures C2 and D2 show a magnification of the selected area that includes Hoechst staining. Scale bars: 50 μ m.

of the striatal lesion (Fig. 2C1), although it was not found in TUNEL-positive neurons (Fig. 2C2). Similarly to that observed for CDK4, CyD was strongly expressed by neurons located in the deeper areas of the striatal lesion that exhibited weaker NeuN staining and were negative for TUNEL staining (Fig. 2D2). Taken together, these results suggested that neuronal apoptosis in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats was not triggered by reactivation of cell cycle. As we described elsewhere, the striatal lesion induced by 3-NPA is surrounded by an area of astrogliosis containing reactive astrocytes (Duran-Vilaregut et al., 2010). Interestingly, a slight CyD staining that resembled astrocytial processes was detected surrounding the striatal lesion of intoxicated animals (Fig. 2B1, arrowhead), and this was not observed for CDK4. Insets in Fig. 2B1 show colocalization (Inset C) of CyD staining that resembled astrocytes (Inset A) and GFAP staining (Inset B). Hence, this finding suggests that, in our experimental model, activation of astrocytes may be accompanied by the expression of CyD.

We next studied the pattern of expression of pRb and Ki67 in control and 3-NPA-treated rats. As shown in Fig. 3A3, striatal neurons in control rats constitutively expressed pRb. In 3-NPA-treated animals, pRb was also detected in neurons in the non-injured areas of the striatum (Fig. 3B3, non-injured area). Conversely, as soon as they started to degenerate, neurons no longer showed pRb staining, indicating that they had lost the protein (Fig. 3B3, perilesional rim). Colocalization of pRb and NeuN immunostaining with TUNEL staining confirmed that neurons undergoing apoptosis had lost pRb (Fig. 3C4, arrowheads). A weak stain corresponding to Ki67 antigen was detected in the striatum of control rats (Fig. 4A1). Colocalization with NeuN staining revealed that Ki67 antigen was almost exclusively expressed by neurons (Fig. 4A3). In the non-injured area of 3-NPA-treated rats, neurons preserved their slight Ki67 antigen staining (Fig. 4B3, non-injured area). Some cells with strong expression of Ki67 were detected in the same area (Fig. 4B1, arrowheads), although they were not neurons as they did not colocalize with NeuN staining (Fig. 4B3, arrowheads). As observed for pRb, neurons lost their Ki67 antigen staining when they began to degenerate (Fig. 4B3, perilesional rim). Cells positive for Ki67 antigen detected in the striatal lesion were not neurons (Fig. 4B3, perilesional rim and lesion core).

Colocalization of Ki67 antigen and NeuN immunostaining with TUNEL staining confirmed that apoptotic neurons were not positive for Ki67 antigen (Fig. 4C4, arrowheads). Taken together, these results support the hypothesis that cell-cycle re-entry does not trigger neuronal apoptosis in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats.

4. Discussion

This study attempted to demonstrate the involvement of a CDK-dependent pathway in neuronal apoptosis. To this end, we first studied two markers of G1 phase, namely CDK4 and its activating cyclin, CyD, in order to check whether they were expressed by apoptotic neurons identified by TUNEL staining. Among cell-cycle elements, G1 kinase CDK4 and its activating cyclin CyD have received attention for their potential role in apoptosis of postmitotic neurons. An increase in their levels has been detected in numerous *in vitro* models of neuronal cell death such as trophic factor withdrawal (Freeman et al., 1994), oxygen glucose deprivation (Katchanov et al., 2001), excitotoxicity mediated by kainic acid (Giardina et al., 1998; Ino and Chiba, 2001; Verdaguer et al., 2002) and neurotoxicity mediated by aggregates of β -amyloid peptide (Copani et al., 1999), and also in models of ischemia and spinal cord injury *in vivo* (Rashidian et al., 2007). The subsequent use of CDK inhibitors such as olomoucine, roscovitine or flavopiridol, antisense oligonucleotides, dominant negative CDKs or knockdown strategies, all of which proved to be protective in several paradigms of neuronal death, provided evidence for the functional involvement of CDK4 and CyD in neuronal apoptosis (Greene et al., 2007; Rashidian et al., 2007). Moreover, two reports addressing the 3-NPA-mediated activation of cell cycle suggested a positive role for it in the resulting striatal neurodegeneration (Akashiba et al., 2008; Park et al., 2000). In contrast to this body of evidence, our results indicate that, although TUNEL-positive neurons are detected simultaneously with CDK4- or CyD-positive neurons in the striatal injured area of 3-NPA treated rats, they are clearly located in different areas of the lesion. TUNEL-positive neurons are preferentially found in the rim of the lesion, while CDK4- or CyD-positive neurons are located near the core.

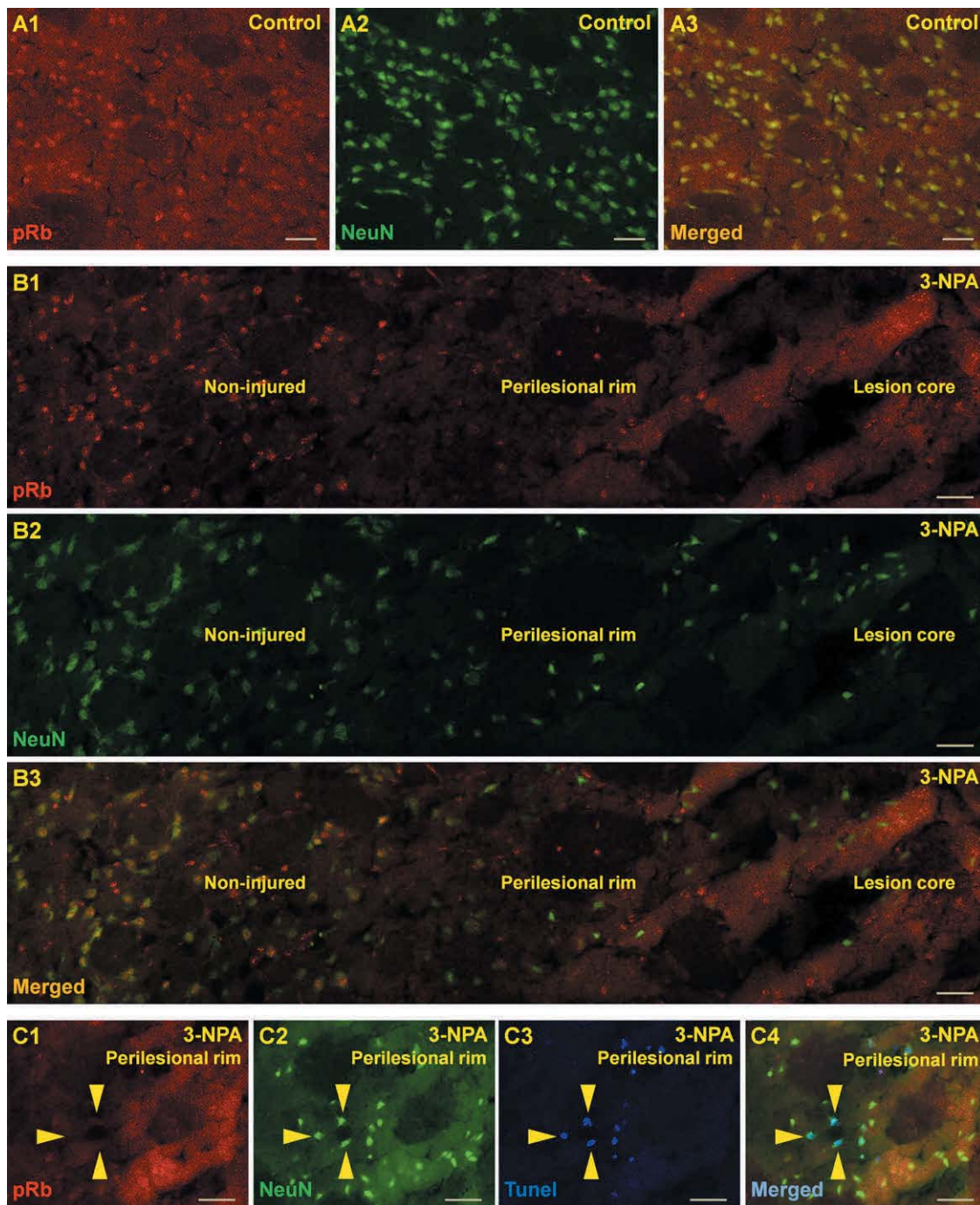


Fig. 3. Representative staining of pRb and NeuN in striatal sections from control (A1, A2 and A3) and 3-NPA-treated rats (B1, B2 and B3). In the case of 3-NPA-treated rats, images were obtained by overlapping serial photographs from the striatum including non-injured and injured areas. (A1 and B1) Staining of pRb. (A2 and B2) Neurons stained with the anti-NeuN antibody. (A3 and B3) Overlapping of pRb and NeuN staining. A representative section of the rim of the striatal lesion of a 3-NPA treated animal in which pRb (C1), NeuN (C2) and TUNEL (C3) stainings were performed simultaneously (C4, merged image) is also shown. Scale bars: 50 μ m.

Moreover, the latter exhibit weaker NeuN staining than the former, indicating that they may be at a more advanced stage of degeneration. Taken together, these findings suggest that the increase in G1 markers is a delayed event with respect to the apoptotic process. Interestingly, one of the previous reports (Ino and Chiba, 2001) studied the immunoreactivity of CDK4 and CyD in TUNEL-positive cells in the piriform cortex of rats treated with kainic acid. The cells studied were assumed to be neurons, since the authors ascertained that, after kainic acid treatment, most of the neurons in the piriform cortex were TUNEL positive, and TUNEL staining was not detected in sporadic cells. The authors reported

that several TUNEL-positive cells expressed CyD, although CyD expression was generally weak, and they mentioned, in line with our findings, that most of the TUNEL-positive cells were devoid of CDK4.

CDK4 and CyD staining were detected in neurons in the inner areas of the striatal lesion of 3-NPA-treated rats. These neurons were not TUNEL positive, showed weak NeuN staining and had completely lost Hoechst staining, which was always detected, although slightly in some cases, in TUNEL-positive neurons, indicating that the former had lost their DNA. Several studies, performed in models of ischemia and cortical traumatism, are

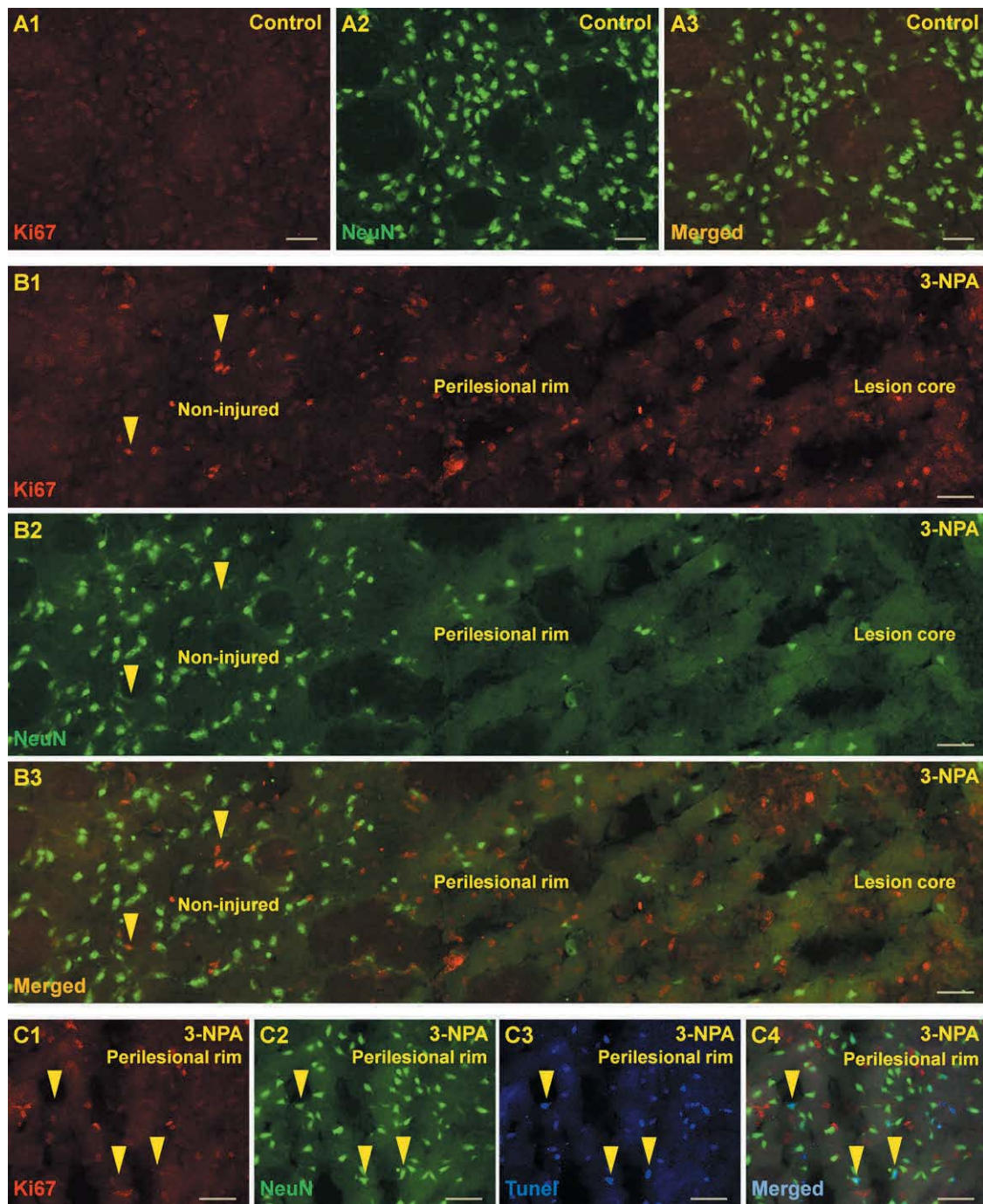


Fig. 4. Representative staining of Ki67 and NeuN in striatal sections from control (A1, A2 and A3) and 3-NPA-treated rats (B1, B2 and B3). In the case of 3-NPA-treated rats, images were obtained by overlapping serial photographs from the striatum including non-injured and injured areas. (A1 and B1) Staining of Ki67. (A2 and B2) Neurons stained with the anti-NeuN antibody. (A3 and B3) Superposition of Ki67 and NeuN staining. A representative section of the rim of the striatal lesion of a 3-NPA treated animal in which Ki67 (C1), NeuN (C2) and TUNEL (C3) staining were performed simultaneously (C4, merged image) is also shown. Scale bars: 50 μ m.

consistent with our findings. CyD was detected in intact and injured neurons, but not in apoptotic neurons identified by TUNEL staining in rat brain after cortical contusion injury (Kaya et al., 1999). A focal cerebral ischemia induced in rats showed expression of CDK4 and CyD in normal and reversibly injured neurons localized to the boundary zone of damaged areas (Li et al., 1997). Both reports concluded that expression of cell-cycle components was involved in a survival response related to DNA repair. Li et al. (1997) also mentioned, however, that apoptotic neurons without cell-cycle proteins at the time of sacrifice, 72 h after the last 3-NPA

administration in our case, may have expressed these proteins earlier. Furthermore, activation of G1 components of the cell cycle was suggested to be a survival response involved in DNA repair in postmitotic neurons exposed to subtoxic concentrations of hydrogen peroxide (Schwartz et al., 2007). Thus, It might be argued that the presence of CDK4 and CyD in neurons in the core of the 3-NPA-induced lesion is a survival response, although it would be a sterile response, since these neurons have lost their DNA. Similarly to our findings on CDK4, a study performed in a rat model of transient ischemia reported that TUNEL-positive cells appeared

as early as 3 h after reperfusion, while CDK4 staining was detected 1 day later. The authors concluded that aberrant expression of cell-cycle elements did not cause apoptosis (Hayashi et al., 1999). It has been reported that partial execution of apoptosis *in vivo*, due to defects in energy metabolism, may result in the persistence of damaged cells within the tissue until they lyse (Nicotera, 2002). This might explain our results, although it appears that neurons in the core of the striatal lesion retained the ability to express CDK4 and CyD. Their state might be similar to that described in other studies showing that brains from transgenic mouse models of AD and ataxia telangiectasia exhibited neurons that can enter a cell-cycle-like process. This leads to the constitutive expression of cell-cycle components and the acquisition of hyper-diploid DNA. The process persists in the brain, contributing to the progress of the disease, for long periods of time, as if apoptosis had been blocked (Herrup and Yang, 2007). Survival time after the initial injury, which is related to the severity of the insult, may be a critical factor that would determine whether apoptotic neurons pass the G1/S phase checkpoint and synthesize new DNA or remain blocked in a previous stage (Kuan et al., 2004).

To further investigate the role of cell-cycle re-entry in neuronal apoptosis induced by 3-NPA administration, we next evaluated the pattern of expression of pRb and Ki67 antigens in control and treated rats. We found that pRb expression, which was constitutive in striatal neurons in control animals, was lost in degenerating neurons located in the lesion induced by 3-NPA. Ki67 antigen was also absent in degenerating neurons, which supports the hypothesis that apoptosis was not mediated by cell-cycle re-entry in our 3-NPA model. pRb plays a central role in cell-cycle regulation, since upon mitogenic stimulation it is phosphorylated by active cyclin D/CDK4/6 complexes and released from E2F proteins, thus de-repressing the E2F-responsive genes that contribute to S-phase entry (Liu and Greene, 2001). Phosphorylation of pRb has been detected in cultured neurons in diverse paradigms of cell death (Becker and Bonni, 2004), and also in models of neurodegeneration *in vivo* such as ischemia (Wang et al., 2002; Wen et al., 2005) or AD (Malik et al., 2008). Moreover, an increase in the phosphorylated form of pRb was also detected both *in vitro* and *in vivo* after 3-NPA neurotoxicity (Akashiba et al., 2008). The loss of pRb that we detected in striatal degenerating neurons is consistent, rather than with a role for the protein in the promotion of neuronal apoptosis as this report suggested, with a growing body of evidence that ascribes to pRb additional functions in many processes fundamentally important for cell survival including cellular stress responses and differentiation (Goodrich, 2006; McClellan et al., 2007). Furthermore, it has been demonstrated that, during apoptosis, pRb was cleaved and degraded by caspase-3-like enzymes (Fattman et al., 2001) and that a mutant cleavage-resistant form of pRb attenuated cell death (Tan et al., 1997; Tan and Wang, 1998). These findings are in accordance with ours, since we detected active caspase-3 in striatal degenerating neurons after 3-NPA treatment (Duran-Vilaregut et al., 2010) that would explain their loss of pRb, which in turn may facilitate the apoptotic process.

5. Conclusions

This study shows that neuronal apoptosis detected in the striatal lesion of our 3-NPA model induced in rats was not triggered by the reactivation of cell cycle, since TUNEL-positive neurons were not positive for any of the cell-cycle components studied. Thus, expression of CDK4 and CyD detected in neurons in the core of the striatal lesion of intoxicated animals, which were assumed to be at an advanced stage of degeneration, was considered to be an aberrant survival response without any relation to the causes of apoptotic cell death.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grants BFU/2010-22149, BFU/2009-08352 and SAF/2009-13093 from Spain's 'Ministerio de Educación y Ciencia', PI080400 from the Spain's 'Instituto de Salud Carlos III' (FEDERFOUND) and 610RT0405 from the 'Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo' (CYTED). We would like to thank the 'Generalitat de Catalunya' for supporting the research group (2009/SGR853).

The funding sources had no involvement in this study.

References

- Akashiba H, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. Differential involvement of cell cycle reactivation between striatal and cortical neurons in cell death induced by 3-nitropropionic acid. *J Biol Chem* 2008;283:6594–606.
- Becker EB, Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol* 2004;72:1–25.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 2005;95:1521–40.
- Byrnes KR, Faden AL. Role of cell cycle proteins in CNS injury. *Neurochem Res* 2007;32:1799–807.
- Copani A, Condorelli F, Caruso A, Vancheri C, Sala A, Giuffrida Stella AM, et al. Mitotic signaling by beta-amyloid causes neuronal death. *FASEB J* 1999;13:2225–34.
- Duran-Vilaregut J, del Valle J, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. Blood-brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Neurotoxicology* 2009;30:136–43.
- Duran-Vilaregut J, Del Valle J, Manich G, Junyent F, Camins A, Pallàs M, et al. Systemic administration of 3-nitropropionic acid points out a different role for active caspase-3 in neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 2010;56:443–50.
- Fattman CL, Delach SM, Dou QP, Johnson DE. Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:2918–26.
- Freeman RS, Estus S, Johnson EM Jr. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 1994;12:343–55.
- Giardina SF, Cheung NS, Reid MT, Beart PM. Kainate-induced apoptosis in cultured murine cerebellar granule cells elevates expression of the cell cycle gene cyclin D1. *J Neurochem* 1998;71:1325–8.
- Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006;25:5233–43.
- Greene LA, Liu DX, Troy CM, Biswas SC. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:392–401.
- Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y. DNA fragmentation precedes aberrant expression of cell cycle-related protein in rat brain after MCA occlusion. *Neurol Res* 1999;21:695–8.
- Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* 2004;24:9232–9.
- Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 2007;8:368–78.
- Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, et al. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3585–90.
- Ino H, Chiba T. Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death *in vivo*. *J Neurosci* 2001;21:6086–94.
- Inoue Y, Kitagawa M, Taya Y. Phosphorylation of pRb at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRb and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J* 2007;26:2083–93.
- Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waerber C, Hirt L, et al. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 2001;21:5045–53.
- Kaya SS, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Chopp M. Expression of cell cycle proteins (cyclin D1 and cdk4) after controlled cortical impact in rat brain. *J Neurotrauma* 1999;16:1187–96.
- Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng WL, Williams MT, et al. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci* 2004;24:10763–72.
- Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1997;765:301–12.
- Li C, Xing T, Tang M, Yong W, Yan D, Deng H, et al. Involvement of cyclin D1/CDK4 and pRb mediated by PI3K/AKT pathway activation in Pb²⁺-induced neuronal death in cultured hippocampal neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;229:351–61.
- Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 2009;16:899–909.

- Liu DX, Greene LA. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res* 2001;305:217–28.
- Majd S, Zariifkar A, Rastegar K, Takshid MA. Different fibrillar Abeta 1–42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain Res* 2008;1218:224–9.
- Malik B, Currais A, Andres A, Towilson C, Pitsi D, Nunes A, et al. Loss of neuronal cell cycle control as a mechanism of neurodegeneration in the presenilin-1 Alzheimer's disease brain. *Cell Cycle* 2008;7:637–46.
- McClellan KA, Ruzhynsky VA, Douda DN, Vanderluit JL, Ferguson KL, Chen D, et al. Unique requirement for Rb/E2F3 in neuronal migration: evidence for cell cycle-independent functions. *Mol Cell Biol* 2007;27:4825–43.
- Nicotera P. Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Toxicol Lett* 2002;127:189–95.
- Park DS, Levine B, Ferrari G, Greene LA. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 1997;17:8975–83.
- Park DS, Obeidat A, Giovanni A, Greene LA. Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging* 2000;21:771–81.
- Pelegrí C, Duran-Vilaregut J, del Valle J, Crespo-Biel N, Ferrer I, Pallàs M, et al. Cell cycle activation in striatal neurons from Huntington's disease patients and rats treated with 3-nitropropionic acid. *Int J Dev Neurosci* 2008;26:665–71.
- Rao HV, Thirumangalakudi L, Desmond P, Grammas P. Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 2007;101:498–505.
- Rashidian J, Iyirhiaro GO, Park DS. Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:484–93.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513–22.
- Schwartz EI, Smilenov LB, Price MA, Osredkar T, Baker RA, Ghosh S, et al. Cell cycle activation in postmitotic neurons is essential for DNA repair. *Cell Cycle* 2007;6:318–29.
- Smith RA, Walker T, Xie X, Hou ST. Involvement of the transcription factor E2F1/Rb in kainic acid-induced death of murine cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;116:70–9.
- Stoica BA, Byrnes KR, Faden AI. Cell cycle activation and CNS injury. *Neurotox Res* 2009;16:221–37.
- Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JY. Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J Biol Chem* 1997;272:9613–6.
- Tan X, Wang JY. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol* 1998;8:116–20.
- Verdaguer E, García-Jordà E, Canudas AM, Domínguez E, Jiménez A, Pubill D, et al. Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 2002;13:413–6.
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003;36:165–75.
- Wang F, Corbett D, Osuga H, Osuga S, Ikeda JE, Slack RS, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:171–82.
- Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D. Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol* 2009;89:1–17.
- Wen Y, Yang S, Liu R, Simpkins JW. Cell-cycle regulators are involved in transient cerebral ischemia induced neuronal apoptosis in female rats. *FEBS Lett* 2005;579:4591–9.
- Yang Y, Herrup K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:457–66.

ARTICLE 4

**EXPRESSION PATTERN OF ATM, P53, AKT AND GSK3 β IN THE STRIATUM OF
RATS TREATED WITH 3-NITROPROPIONIC ACID**

Joaquim Duran-Vilaregut, Gemma Manich, Jaume del Valle, Mercè Pallàs,
Antoni Camins, Jordi Vilaplana i Carme Pelegrí

Journal of Neuroscience Research, en premsa

RESUM

Objectius: Estudiar la possible activació o inhibició de les proteïnes ATM, p53, Akt i GSK3 β en neurones estriatals de rates tractades amb 3-NPA.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates SD de 220-250 g de pes. El model experimental es va induir administrant a les rates una dosi de 3-NPA de 20 mg/kg per via intraperitoneal durant 3 dies (dia 0, 1 i 2). Al mateix temps, un grup control es va injectar amb sèrum fisiològic. El dia 6, es van anestessiar els animals, es van perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció de l'encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a -80 °C. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos dirigits contra la phospho^{Ser1981}-ATM, la phospho^{Ser15}-p53, la phospho^{Ser473}-Akt, la phospho^{Ser9}-GSK3 β , el NeuN (per visualitzar les neurones) i la GFAP (per visualitzar els astròcits). Les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal.

Resultats: Els animals control no van mostrar marcatge de la forma fosforilada activa de l'ATM ni de la forma fosforilada de la p53. De la mateixa manera, no es va detectar marcatge d'aquestes proteïnes a la zona no lesionada del cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA. El marcatge de phospho^{Ser1981}-ATM només es va detectar a la vora de la lesió estriatal dels animals tractats, i els dobles marcatges amb NeuN i GFAP van posar de manifest que la forma activa de l'ATM només era expressada per astròcits reactius presents a la vora de la lesió (Figura 27). De forma similar, el marcatge de phospho^{Ser15}-p53 es va detectar a la vora de la lesió estriatal en astròcits reactius i, a més a més, també se'n va trobar associat a restes de marcatge d'astròcits al llarg del centre de la lesió (Figura 28). El marcatge de phospho^{Ser15}-p53 tampoc es va trobar associat a neurones.

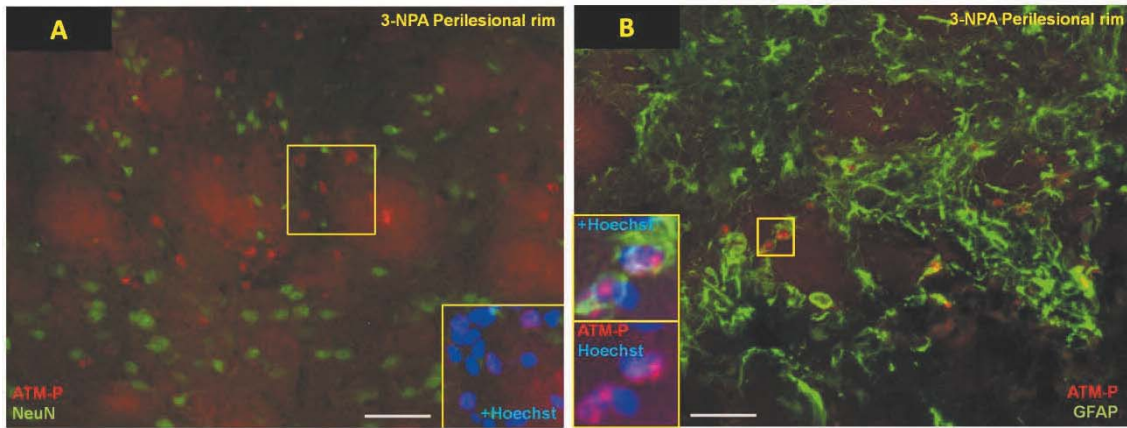


Figura 27. Marcatges representatius de phospho^{Ser1981}-ATM, NeuN i GFAP a la vora de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA. A) Colocalització del marcatge de phospho^{Ser1981}-ATM amb NeuN. B) Colocalització del marcatge de phospho^{Ser1981}-ATM amb GFAP. Barres d'escala 50 µm.

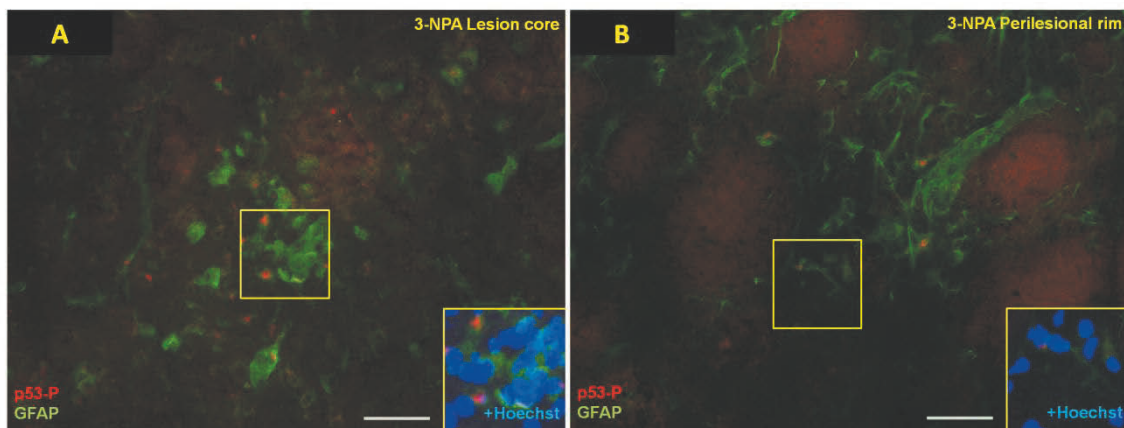


Figura 28. Marcatges representatius de phospho^{Ser15}-p53 i GFAP al centre i a la vora de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA. A) Colocalització del marcatge de phospho^{Ser15}-p53 amb GFAP al centre de la lesió. B) Colocalització del marcatge de phospho^{Ser15}-p53 amb GFAP a la vora de la lesió. Barres d'escala 50 µm.

Pel que fa a l'Akt, la seva forma fosforilada activa es va trobar de forma constitutiva a les neurones del cos estriat de les rates control, i també a les neurones estriatals no afectades per la toxina. En canvi, les neurones de l'àrea lesionada del cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA perdien el marcatge de phospho^{Ser473}-Akt tan bon punt començaven a degenerar (Figura 29).

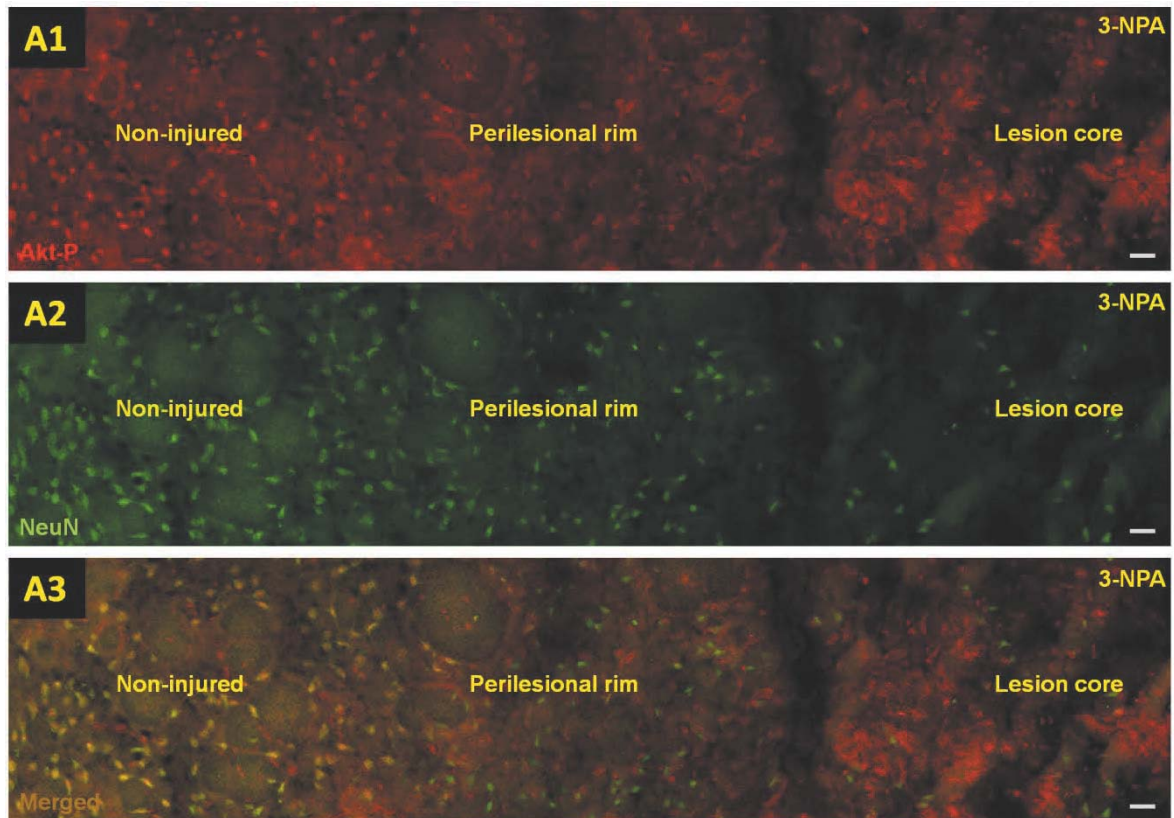


Figura 29. Marcatges representatius de phospho^{Ser473}-Akt i NeuN en una porció del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA. S'inclou l'àrea no lesionada, la vora i una part més central de la lesió. A1) Marcatge de phospho^{Ser473}-Akt. A2) Marcatge de NeuN. A3) Colocalització del marcatge de phospho^{Ser473}-Akt amb NeuN. Barres d'escala 50 µm.

D'altra banda, el marcatge de phospho^{Ser9}-GSK3β es va detectar de manera intensa a la vora de la lesió estriatal, en forma d'agregats densos que colocalitzaven o envoltaven algunes de les neurones en procés de degeneració (Figura 30, puntes de fletxa). A mida que ens apropàvem cap al centre de la lesió, el marcatge de phospho^{Ser9}-GSK3β era cada cop més feble i només es detectava ocasionalment envoltant alguna neurona (Figura 30, fletxes).

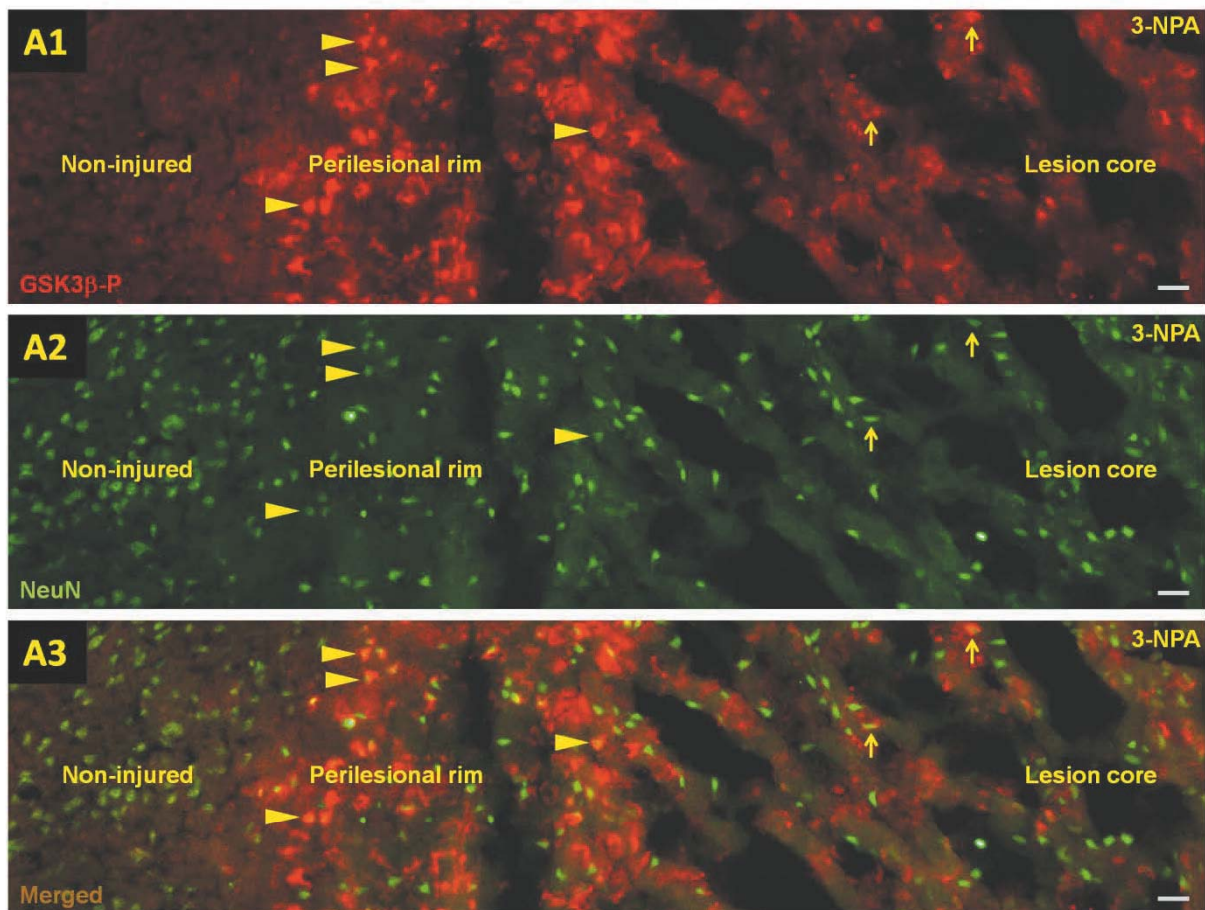


Figura 30. Marcatges representatius de phospho^{Ser9}-GSK3β i NeuN en una porció del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA. S'inclou l'àrea no lesionada, la vora i una part més central de la lesió. A1) Marcatge de phospho^{Ser9}-GSK3β. A2) Marcatge de NeuN. A3) Colocalització del marcatge de phospho^{Ser9}-GSK3β amb NeuN. Barres d'escala 50 μm.

Conclusions: La via de senyalització ATM/p53 no sembla que participi de la degeneració de les neurones estriatals associada a l'administració del 3-NPA, ja que les formes fosforilades d'ATM i p53 s'han detectat en astròcits però no en neurones. D'altra banda, la pèrdua de la forma activa d'Akt sí que sembla jugar un paper destacat a la neurodegeneració associada a l'administració del 3-NPA, ja que les neurones en procés de degeneració perden la seva expressió. La GSK3β inactiva es detecta principalment a la vora de la lesió, i es pensa que en la seva fosforilació intervé una quinasa diferent de l'Akt.

Expression Pattern of Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), p53, Akt, and Glycogen Synthase Kinase-3 β in the Striatum of Rats Treated With 3-Nitropropionic Acid

Joaquim Duran-Vilaregut,^{1,2} Gemma Manich,¹ Jaume del Valle,^{1,2}
Antoni Camins,^{2,3} Mercè Pallàs,^{2,3} Jordi Vilaplana,^{1,2} and Carme Pelegrí^{1,2*}

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

³Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB),
Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

3-Nitropropionic acid (3-NPA) is a mitochondrial toxin used in the laboratory to replicate neurodegenerative conditions that are accompanied by degeneration of the caudate-putamen. 3-NPA induces depletion in ATP production, reactive oxygen species production, and secondary excitotoxicity mediated by activation of N-methyl-D-aspartate receptors that culminates in the triggering of cell death mechanisms, including apoptosis. We here examined by immunohistochemical methods whether cellular expression of phospho^{Ser1981}-ataxia telangiectasia mutated (ATM), phospho^{Ser15}-p53, phospho^{Ser473}-Akt, and phospho^{Ser9}-glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), which are key signal molecules that play a critical role in regulating cellular processes related to cell survival and demise, were involved in the striatal neurodegeneration in the brains of rats treated with 3-NPA. Our results indicate that the toxin induced the activation of ATM and p53 only in astrocytes, and a role for these proteins in neuronal degeneration was ruled out. On the other hand, striatal neurons lost the active form of Akt as soon as they began to appear pyknotic, indicating impairment of the PI3K/Akt/GSK3 pathway in their degenerative process. The inactive form of GSK3 β was detected extensively, mainly in the rim of the striatal lesions around degenerating neurons, which could be attributed to a cell death or cell survival response. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: neurotoxin; immunohistochemistry; rat

3-Nitropropionic acid (3-NPA) is a mitochondrial toxin and its precursor, 3-nitropropanol, is present in plants such as *Astragalus* and fungus such as *Arthrinium* (Ludolph et al., 1991). In humans, 3-NPA produces preferential degeneration of the putamen and caudate nucleus, associated with severe neurological symptoms. Systemic administration of the toxin to experimental animals such as nonhuman primates or rodents produces similar effects. Thus, 3-NPA is used in the laboratory to

replicate neurodegenerative conditions associated with degeneration of the caudate-putamen (Brouillet et al., 2005). 3-NPA has been used mainly to study Huntington's disease (HD), a neurodegenerative disorder preferentially affecting the striatum, in which deficits in energy metabolism and dysfunction of mitochondrial chain complexes (MCCs) play a pivotal role (Gu et al., 1996; Browne et al., 1997). In addition, 3-NPA is suitable for modeling features of acute neuronal insults, such as cerebral ischemia (Pang et al., 2003). The toxin irreversibly inhibits succinate dehydrogenase (SDH), the main constituent of the MCC II (Brouillet et al., 1999). A recent study (Liot et al., 2009), performed in cultured cortical neurons, revealed that 3-NPA-mediated inhibition of SDH causes an initial dramatic depletion in ATP production. This depletion is concomitant to a mild increase in reactive oxygen species (ROS) and delayed secondary excitotoxicity, mediated by activation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) by glutamate. This activation in turn induces a second rise in ROS production and mitochondrial fragmentation, which triggers neuronal cell death.

Contract grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia; Contract grant numbers: BFU/2009-08352, BFU/2010-22149, SAF/2009-13093; Contract grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III (FEDERFOUND); Contract grant number: PI080400; Contract grant sponsor: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED); Contract grant number: 610RT0405; Contract grant sponsor: Generalitat de Catalunya; Contract grant number: 2009/SGR.853.

J. Vilaplana and C. Pelegrí contributed equally to this work.

*Correspondence to: Carme Pelegrí, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: carmepelegrí@ub.edu

Received 21 December 2011; Revised 16 February 2012; Accepted 4 March 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/jnr.23060

Both necrosis and apoptosis, which have traditionally been considered as the basic mechanisms of cell death, are involved in 3-NPA-mediated neurotoxicity in vitro (Pang and Geddes, 1997; Nasr et al., 2003; Pang et al., 2003). With in vivo administration, it has been reported that calpain, a cysteine protease that is activated by Ca^{2+} and is related to necrotic processes (Wang, 2000), is a predominant effector of striatal cell death when SDH is persistently inhibited by chronic administration of 3-NPA (Bizat et al., 2003a,b; Galas et al., 2004). In contrast, transient inhibition of SDH by acute or subacute treatment with the toxin leads to the additional activation of caspase-3, the main effector of the apoptotic process, as has been shown in our laboratory (Duran-Vilaregut et al., 2010) and others (Duan et al., 2000; Bizat et al., 2003a).

Several signaling pathways could be responsible for activation of the apoptotic process that culminates in caspase-3 activation and subsequent neuronal demise after acute or subacute 3-NPA administration. It has been proposed that the toxin induces overproduction of ROS, which causes oxidative DNA damage and DNA fragmentation (Kim and Chan, 2002). Thus, we first focused on the study of the activation of ataxia telangiectasia mutated (ATM), which is activated by autophosphorylation at Ser1981 in response to DNA damage signals. It then phosphorylates a number of proteins that are essential to the control of cell cycle checkpoints; DNA repair; and, in the case of excessive DNA damage, cell death (McKinnon, 2004). In addition to ATM, we studied the form of p53 phosphorylated at Ser15, one of the main substrates of the former (Shiloh, 2003). p53 is a transcription factor that is activated in response to stress signals and elicits several cellular responses, including growth arrest, senescence, and apoptosis (Polager and Ginsberg, 2009). On the other hand, it has been reported that an increase in the phosphorylated form of Akt is protective against 3-NPA-induced neurodegeneration (Lee et al., 2008a,b; Almeida et al., 2009). Akt, also called *protein kinase B*, is a serine/threonine protein kinase of the PI3K pathway that plays a central role in cell survival, in that it blocks the function of proapoptotic proteins and processes (Manning and Cantley, 2007). Here we studied its fully activated form, which requires phosphorylation at Ser473 (Alesi et al., 1999; Liao and Hung, 2010). Moreover, we analyzed the β isoform of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) phosphorylated at Ser9, which is a main substrate of Akt (Cohen and Frame, 2001). GSK3 is a serine/threonine protein kinase with two isoforms, namely, GSK3 α and GSK3 β , which was initially described as a key enzyme in glucogen metabolism, although recent evidence indicates that it can modulate apoptosis in a wide range of neurotoxic conditions (Joje and Johnson, 2004).

MATERIALS AND METHODS

Animals and 3-NPA Treatment

Male Sprague-Dawley rats (220–250 g; Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) had access to food and water

ad libitum and were kept under standard conditions of temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and on 12:12-hr light–dark cycles (300 lx/0 lx). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. One group of 10 rats (treated group) was injected with saline solution containing 3-NPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) adjusted to pH 7.4 with NaOH at a dose of 20 mg/kg i.p. once per day for 3 days (days 0, 1, and 2). The control group, which included five animals, was injected only with saline solution. On day 6, both groups of animals were killed as described below, and their brains were excised. All rats were evaluated daily from day 0 until day 6 of experiment for both body weight loss and motor impairment, and the evolution observed was similar to that described from previous studies performed in our laboratory (Duran-Vilaregut et al., 2009).

Brain Processing

Brains for immunohistochemistry and TUNEL staining were obtained as follows. Rats were anesthetized with 80 mg/kg i.p. sodium pentobarbital and intracardially perfused with 100 ml physiological saline. Brains were then excised and snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80°C . Thereafter, brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), and 20- μm -thick cryostatic sections containing striatum were obtained. Slices were picked up on common slides, fixed with acetone for 10 min at 4°C , allowed to dry at room temperature, and finally frozen at -20°C until staining.

Immunohistochemistry of Brain Sections

Slides with brain sections were allowed to thaw at room temperature and then rehydrated with PBS for 5 min before being blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, slides were incubated with the primary antibody (see below) for 90 min at room temperature. They were then washed again and incubated for 1 hr at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). Five minutes before the end of the second incubation, nuclear staining was performed by adding Hoechst (H-33258; Sigma-Aldrich) reagent at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS to the incubation medium to a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finally, slides were washed, mounted using Prolong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA) antifade medium, allowed to dry overnight at room temperature, and stored at 4°C in the dark. Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal antiphospho^{Ser1981}-ATM (R&D Systems, Minneapolis, MN; dilution 1:200), rabbit polyclonal antiphospho^{Ser15}-p53 (R&D Systems; dilution 1:100), rabbit polyclonal antiphospho^{Ser9}-GSK3 β (Cell Signaling, Danvers, MA; dilution 1:100), rabbit polyclonal antiphospho^{Ser473}-Akt (Abcam, Cambridge, United Kingdom; dilution 1:100), mouse monoclonal anti-NeuN (Millipore, Billerica, MA; dilution 1:100), mouse

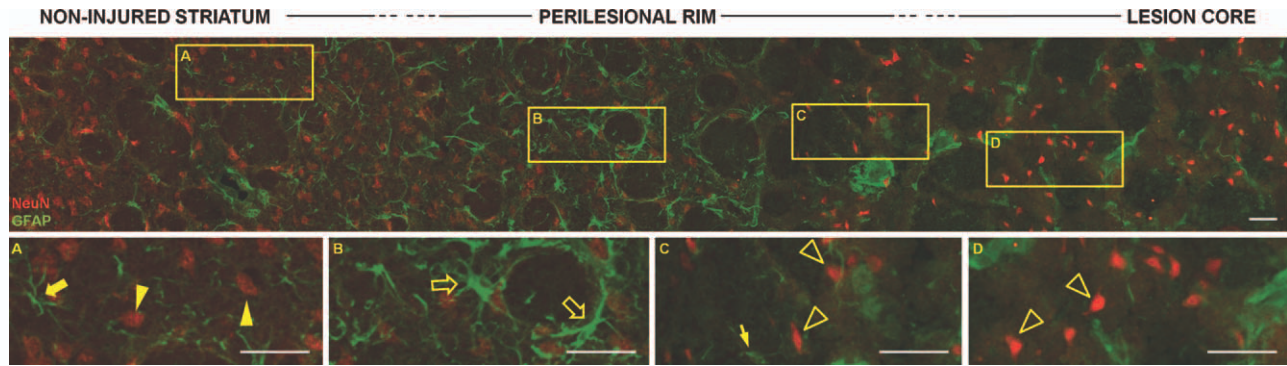


Fig. 1. Staining of neurons and astrocytes in the striatum of 3-NPA-treated rats. Representative image of the striatum of a rat from the 3-NPA-treated group immunostained with the anti-NeuN antibody and the anti-GFAP antibody, including the three regions studied. Magnifications of each of these regions are shown: noninjured striatum (A), perilesional rim (B,C), and lesion core (D). Solid arrow indicates

astrocytes not affected by 3-NPA. Solid arrowheads indicate neurons not affected by 3-NPA. Open arrows indicate reactive astrocytes. Open arrowheads indicate pyknotic neurons in the lesion induced by 3-NPA. Small arrow indicates residual GFAP staining in the lesion induced by 3-NPA. Scale bars = 50 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

monoclonal anti-GFAP (Neomarkers, Fremont, CA; dilution 1:100), and chicken polyclonal anti-GFAP (Millipore; dilution 1:100). AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 488 anti-chicken IgG, AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG, and AlexaFluor 660 anti-mouse IgG (Invitrogen; dilution 1:250) were used as secondary antibodies.

Fluorescence Microscopy Analysis

Brain sections from 3-NPA-treated and control rats were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). In some cases, series of consecutive images were obtained for each staining and experimental group. In the case of treated animals, the sequence of images included injured and noninjured areas of the striatum. Once the image series had been collected, the images were rebuilt in order to obtain single images which, subsequently, were merged in Image J (National Institutes of Mental Health) and Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA). The authors declare that there are no conflicts of interest.

RESULTS

Description of the Striatal Lesion Induced by 3-NPA

According to previous studies (Duran-Vilaregut et al., 2009, 2010), we defined three striatal regions in our studies with the 3-NPA model (Fig. 1). The region called “noninjured striatum” included all the striatal areas in which neurons and astrocytes (stained with the chicken polyclonal antiglial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody) were not affected by the treatment with the toxin, so they did not show morphological alterations compared with nontreated rats. A magnification of this area is included in Figure 1A, in which astrocytes and neurons unaffected by 3-NPA can be observed. The “perilesional rim” included the astrogliosis area and the outer area of the striatal lesion, where, according to our previous study (Duran-Vilaregut et al.,

2010), apoptotic neurons positive for active caspase-3 and TUNEL stains were mainly found. In the astrogliosis area, astrocytes appeared in their reactive form (Fig. 1B), showing stronger GFAP staining and more processes than astrocytes in the noninjured striatal area. In the outer area of the striatal lesion, neurons started to show a pyknotic appearance (Fig. 1C), and, although astrogliosis had been lost, residual GFAP staining was still detected. Reactive astrocytes in contact with the outer area of the lesion showed altered morphology, indicating that they experienced a degeneration process. Finally, in the “lesion core” region, neurons were pyknotic (Fig. 1D). According to our previous study (Duran-Vilaregut et al., 2010), they barely showed active caspase-3 or TUNEL stains. Residual GFAP staining was also found in this region.

Although the size and extent of the lesion were different in each animal, the different striatal studied areas could be observed in all of them. In each area, the cellular pattern and the protein expression were equivalent in all animals.

Expression Pattern of Phospho^{Ser1981}-ATM and Phospho^{Ser15}-p53

Figure 2 shows representative images corresponding to striatal areas of brains from control and 3-NPA-treated rats immunostained with an antibody that recognizes the form of ATM phosphorylated at Ser1981. As shown in Figure 2A, the striatum of control animals did not show any staining for phospho^{Ser1981}-ATM. In 3-NPA-treated animals, noninjured areas of their striatum had the same appearance as controls (Fig. 2B). The core of the striatal lesion did not show any positive staining for the kinase (Fig. 2C). Positive staining for phospho^{Ser1981}-ATM was detected only on the rim of the striatal lesion, where tissue had started to lose its characteristic structure (Fig. 2D1,E1). Subsequently, phospho^{Ser1981}-ATM staining was combined with NeuN

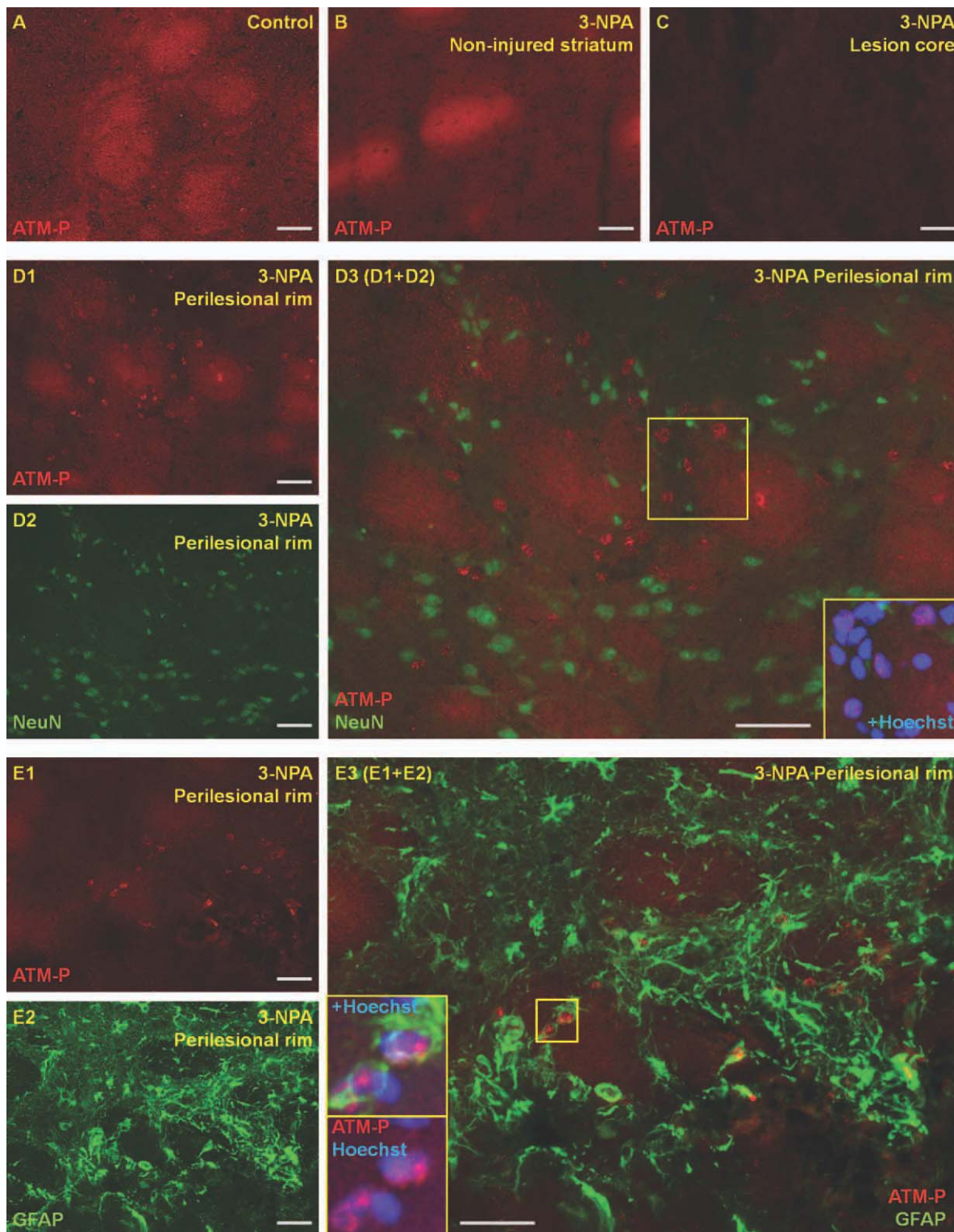


Fig. 2. Phospho^{Ser1981}-ATM staining is detected on the rim of the striatal lesion of 3-NPA-treated rats. Representative images of the striatum of control (A) and 3-NPA-treated (B,C,D1,E1) rats immunostained with the anti-phospho^{Ser1981}-ATM antibody. In the case of the rim of the striatal lesion of 3-NPA-treated animals, magnifications in which phospho^{Ser1981}-ATM staining overlaps with NeuN

(D2) and GFAP (E2) staining are included. **Insets** in D3 and E3 show a magnification of the selected area that includes Hoechst staining. ATM-P, phospho^{Ser1981}-ATM. Scale bars = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

staining to investigate whether cells expressing the active kinase were neurons. Figure 2D3 shows that phospho^{Ser1981}-ATM was present in the area where neurons began to appear pyknotic, although they did not express it in any case. Thus, we next tested whether phospho^{Ser1981}-ATM was expressed by astrocytes. Figure 2E3 shows that phospho^{Ser1981}-ATM staining was detected in the nuclei of the reactive astrocytes (stained with the mouse monoclonal anti-GFAP antibody) located in the astrogliosis area surrounding the lesion. Insets in Figure 2D3,E3 show that phospho^{Ser1981}-ATM staining was nuclear, insofar as it colocalized with Hoechst staining. Because GFAP stains the processes of astrocytes, colocalization of GFAP and phospho^{Ser1981}-ATM was not visible.

We next studied activation of one of the main targets of ATM, p53. Figure 3 shows representative images of staining of p53 phosphorylated at Ser15, in striata from control and 3-NPA-treated rats. Phospho^{Ser15}-p53 was not detected either in control animals or in the non-injured striatal areas of 3-NPA-treated animals (Fig. 3A,B, respectively). However, in contrast to ATM, positive staining for p53 was seen both on the rim (Fig. 3F1) and in the core (Fig. 3C,D1,E1) of the striatal lesion of 3-NPA-treated rats. Combination of phospho^{Ser15}-p53 and NeuN stains showed that the protein was not expressed by neurons (Fig. 3D3). In contrast, double staining with the chicken polyclonal anti-GFAP antibody showed that, as for ATM, phospho^{Ser15}-p53 was expressed in astroglia (Fig. 3E3,F3). In the core of the lesion, p53 was found mainly in accumulations of residual GFAP staining that had completely lost the characteristic appearance of astrocytes (Fig. 3E3), whereas, on the rim surrounding the lesion, it was detected in degenerating astrocytes (Fig. 3F3). Insets in Figure 3D3,E3,F3 show that phospho^{Ser15}-p53 staining was preferentially detected next to Hoechst staining but did not colocalize.

Expression Pattern of Phospho^{Ser473}-Akt and Phospho^{Ser9}-GSK3 β

Figure 4 shows representative images of striatal areas from control and 3-NPA-treated rats immunostained with an antibody directed against Akt phosphorylated at Ser473. As shown in Figure 4A3, phospho^{Ser473}-Akt was constitutively expressed in striatal neurons from control rats. Insets in Figure 4A1–A3 show that its expression was nuclear. In 3-NPA-treated animals, phospho^{Ser473}-Akt was also present in neurons located in the noninjured areas of the striata (Fig. 4B3, noninjured area). In contrast, degenerating neurons in the injured area did not show any staining for the kinase (Fig. 4B3, perilesional rim and lesion core).

Figure 5 shows representative images of striatal areas from control and 3-NPA-treated rats immunostained with an antibody that specifically recognizes phospho^{Ser9}-GSK3 β . In the injured striatal area of treated animals, phospho^{Ser9}-GSK3 β staining was

strongly detected on the rim of the lesion in the form of dense clumps (Fig. 5B1, rim of the lesion). Staining was weaker closer to the core (Fig. 5B1, lesion core). Colocalization with NeuN staining showed that phospho^{Ser9}-GSK3 β staining on the rim of the lesion was preferentially found in pyknotic neurons, and it seemed to be perikaryal (Fig. 5B3, arrowheads). Toward the core of the lesion, pyknotic neurons with perikaryal phospho^{Ser9}-GSK3 β staining were barely detected (Fig. 5B3, arrows).

DISCUSSION

Expression Pattern of Phospho^{Ser1981}-ATM and Phospho^{Ser15}-p53.

Our results indicate that 3-NPA treatment did not induce phosphorylation of ATM and p53 in neurons of the striatum of intoxicated rats. In contrast, the active form of ATM, phospho^{Ser1981}-ATM, was detected in reactive astrocytes in the area of astrogliosis that surrounded the 3-NPA-induced lesion. Phospho^{Ser15}-p53, one of the main products of active ATM, was also detected only in association with degenerating astrocytes located both in the core and on the rim of the lesion. ATM is activated in response to double strand breaks in DNA, and it then phosphorylates substrates involved in recognizing DNA damage or in signaling this damage to cell-cycle checkpoints (Shiloh, 2003; Barzilay et al., 2008). Kruman et al. (2004) showed that, in cultured neurons, exposure to genotoxic compounds induces DNA damage that triggers cell cycle re-entry and subsequent apoptosis and that pretreatment with ATM inhibitors such as caffeine or wortmannin abrogates both events without affecting the DNA damage. These findings pointed to a close relationship among DNA damage-induced apoptosis, activation of ATM, and cell cycle re-entry in postmitotic neurons and supported previous studies in which neurons from ATM-deficient mice had been shown to be resistant to DNA damage-induced apoptosis (Chong et al., 2000; Lee and McKinnon, 2000; Macleod et al., 2003). 3-NPA treatment induces overproduction of ROS, which causes oxidative DNA damage and DNA fragmentation, which were detected by 8-hydroxyguanosine immunohistochemistry and TUNEL staining, respectively (Kim and Chan, 2002). However, the lack of neuronal ATM activation shown here suggests that 3-NPA neuronal toxicity is not mediated by genotoxic effects. In a previous study performed with our 3-NPA experimental model, TUNEL staining was confined to the striatal lesion, mainly on its rim, and was widely detected in neurons that expressed active caspase-3 (Duran-Vilaregut et al., 2010), indicating that DNA fragmentation could be the final stage of the apoptotic cascade rather than a manifestation of the genotoxic effect of 3-NPA. In support of this, it has been reported that 3-NPA induces specific mitochondrial DNA damage and does not alter nuclear DNA (Mandavilli et al., 2005).

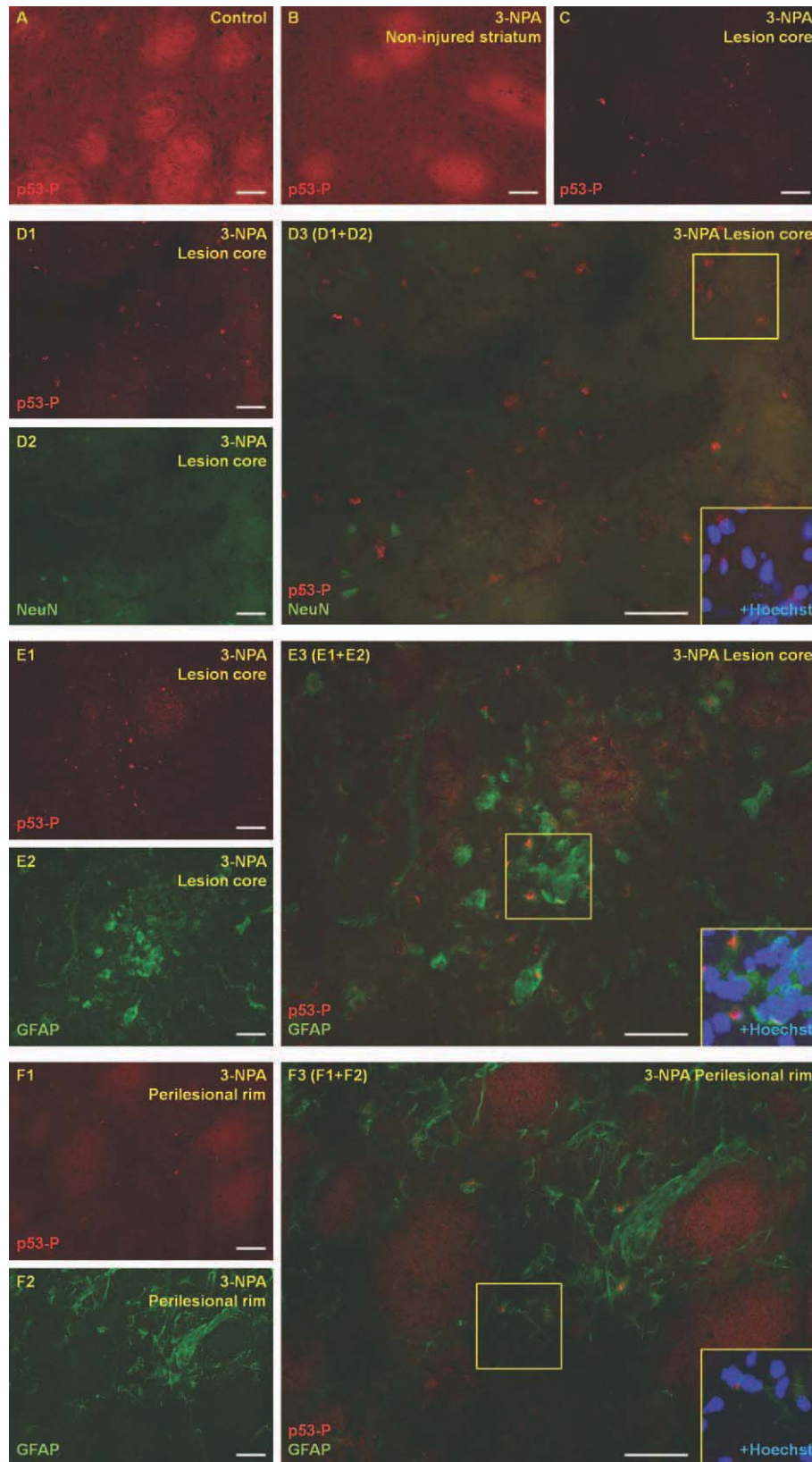


Fig. 3. Phospho^{Ser15}-p53 staining is detected on the rim and core of the striatal lesion of 3-NPA-treated rats. Representative images of the striatum of control (A) and 3-NPA-treated (B,C,D1,E1,F1) rats immunostained with the anti-phospho^{Ser15}-p53 antibody are shown. In the case of 3-NPA-treated animals, magnifications in which phospho^{Ser15}-p53 overlaps with NeuN staining in the core of the lesion

(D2) and with GFAP staining in the core (E2) and on the rim (F2) of the striatal lesion are included. **Insets** in D3, E3, and F3 show a magnification of the selected area that includes Hoechst staining, p53-P, phospho^{Ser15}-p53. Scale bars = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

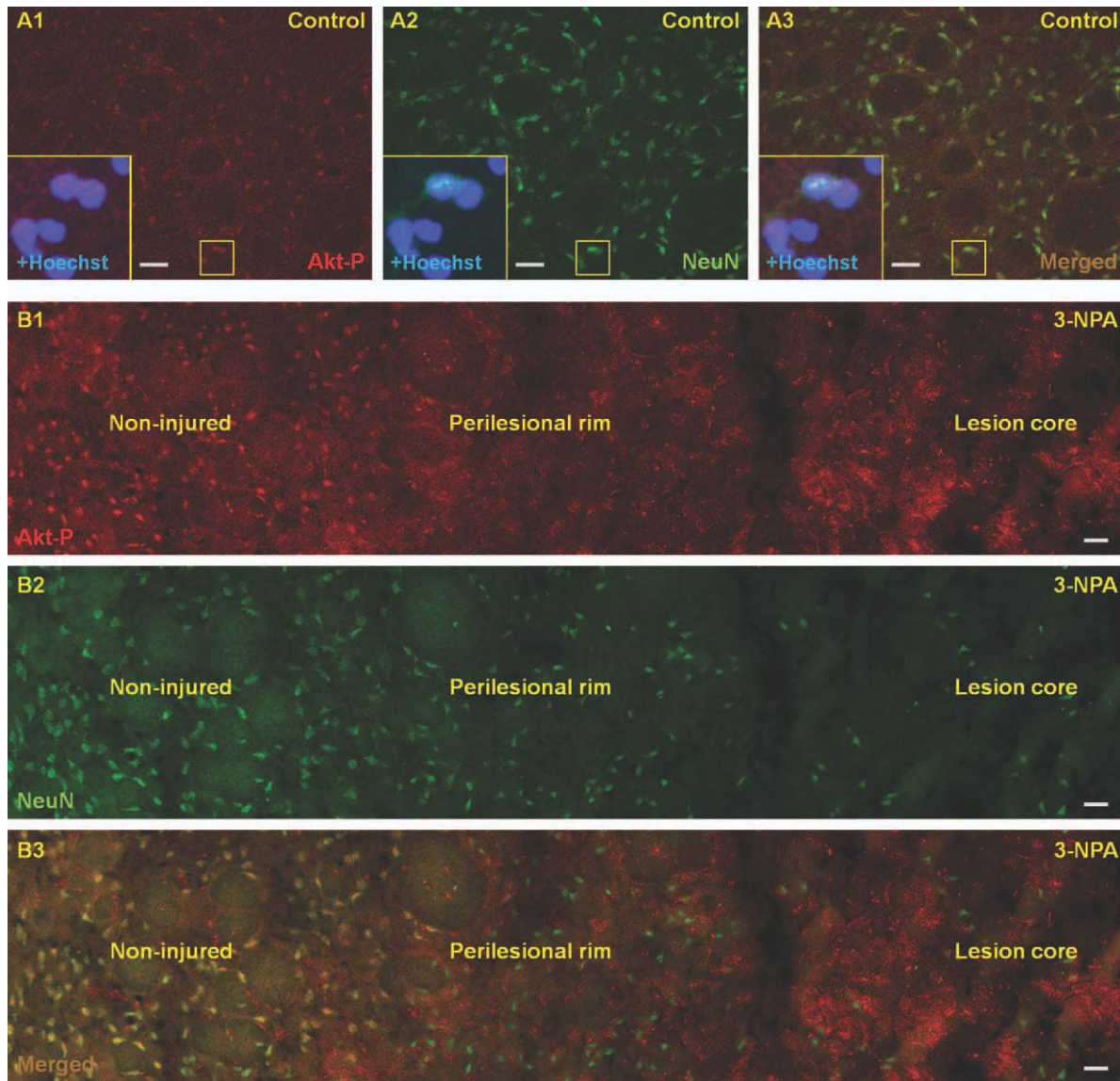


Fig. 4. Phospho^{Ser473}-Akt is lost in degenerating neurons in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats. Representative images of the striatum of control (A1–3) and 3-NPA-treated (B1–3) rats immunostained with the antiphospho^{Ser473}-Akt and anti-NeuN antibodies. In the case of 3-NPA-treated animals, images were obtained by overlapping serial photographs from the striatum including noninjured and injured areas.

A1,B1: Staining of phospho^{Ser473}-Akt. A2,B2: Neurons stained with the anti-NeuN antibody. A3,B3: Overlapping of phospho^{Ser473}-Akt and NeuN staining. **Insets** in A1–3 show a magnification of the selected area that includes Hoechst staining. AKT-P, phospho^{Ser473}-Akt. Scale bars = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

On the other hand, administration of 3-NPA induced the activation of ATM in reactive astrocytes located in the area of astrogliosis that surrounded the striatal lesion of intoxicated rats. Astrocytes interact closely with surrounding neurons by providing them with energy and substrates for neurotransmission, protecting and modulating their growth and synaptic function (Travis, 1994; Allen and Barres, 2009). Neurons are particularly vulnerable to oxidative stress, and they rely heavily on metabolic coupling with astrocytes for antioxidant support, since the latter have stronger antioxidant

potential (Shih et al., 2003; Liu et al., 2005). It has been reported that $Atm^{-/-}$ astrocytes show growth abnormalities and increased oxidative stress (Liu et al., 2005). Moreover, the absence of ATM results in oxidative stress in the brain (Kamsler et al., 2001; Chen et al., 2003). These observations indicate that ATM may modulate intracellular redox status. Recently, it has been shown that activation of ATM induced by oxidative stress can occur in the absence of DNA damage (Guo et al., 2010). According to this evidence, activation of ATM in reactive astrocytes on the rim of the striatal lesion may be a

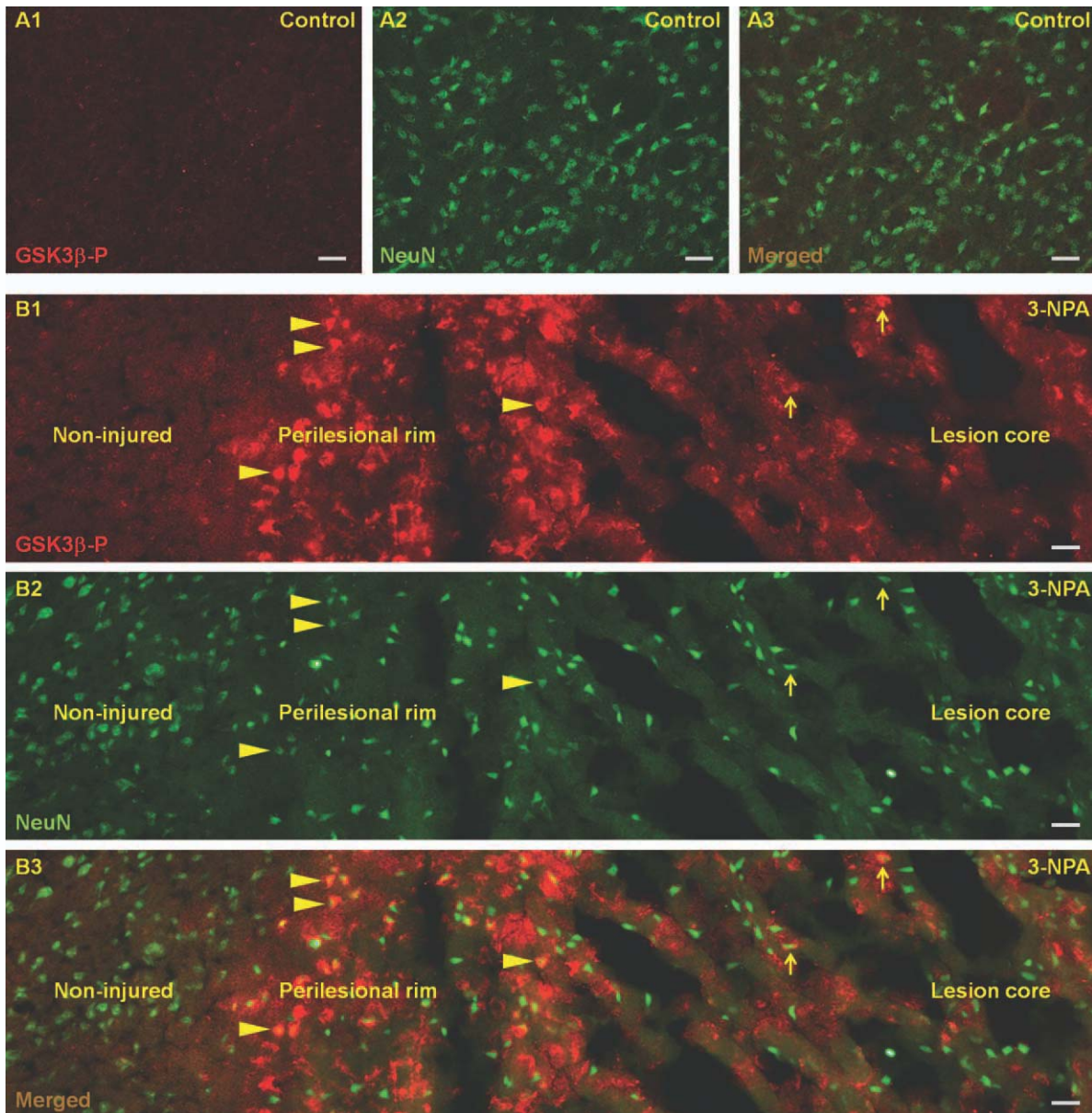


Fig. 5. Phospho^{Ser9}-GSK3 β is strongly detected on the rim of the striatal lesion of 3-NPA-treated rats. Representative images of the striatum of control (A1–3) and 3-NPA-treated (B1–3) rats immunostained with the antiphospho^{Ser9}-GSK3 β and anti-NeuN antibodies. In the case of 3-NPA-treated animals, images were obtained by overlapping serial photographs from the striatum including noninjured and injured areas. A1,B1: Staining of phospho^{Ser9}-GSK3 β .

A2,B2: Neurons stained with the anti-NeuN antibody. A3,B3: Overlapping of phospho^{Ser9}-GSK3 β and NeuN staining. Arrowheads show pyknotic neurons with perikaryal GSK3 β staining clumps in the rim of the lesion. Arrows indicate pyknotic neurons with perikaryal GSK3 β staining in the core of the lesion. GSK3 β -P, phospho^{Ser9}-GSK3 β . Scale bars = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

mechanism involved in re-establishing redox status and protecting neurons against the oxidative insult induced by 3-NPA administration.

Expression Pattern of Phospho^{Ser473}-Akt and Phospho^{Ser9}-GSK3 β

Our results show that the activated form of Akt, which is phosphorylated at Ser473, is constitutively

expressed by neurons in healthy striatal tissue from control and 3-NPA-treated rats, although it is completely lost in pyknotic neurons located in the lesioned area of the striatum in intoxicated animals. Akt is a central node in cell signaling downstream of growth factors, cytokines, and other cellular stimuli. It plays a critical role in cell survival by inhibiting, through phosphorylation, the function of proapoptotic proteins such as BAD and

caspase-9 and transcription factors such as FOXO proteins. These, in turn, promote transcription of other apoptotic proteins such as BIM and Fas ligand when active (Manning and Cantley, 2007). Consistently with our findings, it has been reported in rats that concomitant administration of atorvastatin (Lee et al., 2008a) or granulocyte colony-stimulating factor (Lee et al., 2008b) with 3-NPA protects against the striatal neurodegeneration induced by the toxin. Moreover, in an *in vitro* study, brain-derived neurotrophic factor prevented mitochondrial-dependent apoptosis induced by 3-NPA by reducing caspase-3 activation and chromatin condensation/fragmentation (Almeida et al., 2009). In all three studies, the protective treatment induced an increase in the phosphorylated form of Akt, indicating that its loss might be involved in 3-NPA-induced neurodegeneration. Furthermore, administration to rats of lentiviral vectors expressing the first 171 N-terminal amino acids of huntingtin with a pathological polyglutamine sequence of 82 units induces striatal HD neuropathology accompanied by downregulation of total and phospho^{Ser473}-Akt levels in neurons before they degenerate (Colin et al., 2005). This indicates that the decrease was not merely a consequence of apoptosis but a mechanism involved in it. Remarkably, the same study detected, in HD post-mortem brains, high levels of a truncated and inactive form of Akt resulting from caspase-3 cleavage, particularly in the striata. This confirms the involvement of the protease in the development of the disease, as the 3-NPA model also suggests (Duan et al., 2000; Duran-Vilaregut et al., 2010). A marked decrease in total and phospho^{Ser473}-Akt has also been detected in degenerating dopaminergic neurons from substantia nigra pars compacta in post-mortem brains of Parkinson's disease patients (Timmons et al., 2009). This finding has been reproduced in models of the disease *in vitro*, induced by toxins such as 6-hydroxydopamine (Malagelada et al., 2008). Likewise, senescence accelerated prone 10 (SAMP10), a mouse model of early-onset neurodegenerative dementia diseases, showed reduced hippocampal levels of phospho^{Ser473}-Akt after 6 months of age, when mice showed obvious deterioration in performance of learning and memory tasks (Nie et al., 2009). Thus, our results are consistent with a growing body of evidence pointing to impairment of Akt signaling pathway as a key event in neuronal degeneration.

With regard to GSK3 β , our results indicate a strong increase in the expression of the inhibited form of the kinase phosphorylated in Ser⁹ in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats compared with control animals. Phospho^{Ser9}-GSK3 β was found mainly forming dense perikaryal neuronal clumps, on the rim of the striatal lesion, where the majority of active caspase-3- and/or TUNEL-positive neurons were detected after 3-NPA treatment (Duran-Vilaregut et al., 2010). GSK3 is a kinase that, although traditionally associated exclusively with the metabolism of glycogen, is now recognized as a key regulator of numerous signaling pathways. When dysregulated, such pathways have been implicated in the

development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, among others (Doble and Woodgett, 2003; Jope and Johnson, 2004). Paradoxical findings have been reported regarding the involvement of GSK3 in apoptosis. On the one hand, it has been shown that its aberrant activation promotes apoptosis in a wide variety of paradigms of cell death, which include toxicity induced by amyloid- β peptide and mitochondrial toxins (Grimes and Jope, 2001) and HD-associated polyglutamine toxicity (Carmichael et al., 2002). On the other hand, transgenic mice in which GSK3 β activity was inhibited through the expression of a dominant-negative form of the protein showed increased neuronal apoptosis, which preferentially affected the striatum (Gómez-Sintes et al., 2007; Gómez-Sintes and Lucas, 2010). These apparent contradictory findings are the result of GSK3 having opposite effects on the two major apoptotic signaling pathways. It has been established that the kinase, when active, promotes the intrinsic apoptotic pathway, by facilitating the function of proapoptotic proteins, but it inhibits the extrinsic pathway by preventing the activation of the initiator caspase-8 (Beurel and Jope, 2006). According to this line of evidence, if the death receptor-mediated extrinsic pathway of apoptosis is activated in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats, then the inactivation of GSK3 β that we found here may contribute to its progression, because activation of caspase-8 would not be inhibited. This would be consistent with the fact that sustained GSK3 inhibition preferentially increases apoptosis in the striatum, as has been reported by Gómez-Sintes et al. (2007).

Given that the active form of Akt is absent in degenerating neurons located in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats, other kinases may be involved in the inactivation of GSK3. In addition to Akt, several kinases, including protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC), can phosphorylate GSK3 in Ser⁹ (Doble and Woodgett, 2003), in a mechanism that has been related to the promotion of survival of neurons in both cases. cAMP-mediated activation of PKA and subsequent inactivation of GSK3 β promoted survival in cerebellar granule neurons subjected to potassium deprivation independently of Akt activation (Li et al., 2000). Moreover, recent findings showed that activation of PKC through NMDAR-mediated extracellular calcium entry induced a survival response in cerebellar granule neurons that was not suppressed by PI3K/Akt pathway impairment (Ortega et al., 2010). The latter is consistent with the fact that two types of NMDAR are present in neurons, NR2A and NR2B, the activation of which has been linked to the triggering of prosurvival and proapoptotic mechanisms, respectively (Broughton et al., 2009). According to this view, because excitotoxicity mediated by NMDAR activation and cytosolic calcium increase is a key mechanism in 3-NPA-mediated neurotoxicity (Liot et al., 2009), inactivation of GSK3 β on the rim of the striatal lesion of 3-NPA-treated rats may be a survival response induced by prosurvival NMDAR-mediated PKC activation.

CONCLUSIONS

The aim of this study was to establish whether phosphorylation of ATM, p53, Akt, and GSK3 β , which are key signal molecules related to cellular survival and demise processes, were involved in neuronal apoptosis degeneration in the striatal lesion induced by 3-NPA administration. According to our findings, the toxin induced the activation of ATM and phosphorylation of its main target p53 in astrocytes but not in neurons. This would tend to rule out the involvement of this signaling pathway in 3-NPA-induced neuronal degeneration. With respect to Akt and GSK3 β , neurons lost nuclear phospho^{Ser473}-Akt as soon as they started to appear pyknotic, which suggests that the loss of this kinase has a determining role in their degeneration. Although the active form of Akt was lost, the form of GSK3 β phosphorylated in Ser9 was increased and extensively detected in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats, mainly on the rim, in some of the pyknotic neurons. More studies are required to establish whether inactivation of GSK3 β in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats is more likely to contribute to neurodegeneration through the activation of the extrinsic apoptotic pathway or to be part of a survival response against neuronal apoptosis induced by the toxin.

REFERENCES

- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541–6551.
- Allen NJ, Barres BA. 2009. Glia—more than just brain glue. *Nature* 457:675–677.
- Almeida S, Laço M, Cunha-Oliveira T, Oliveira CR, Rego AC. 2009. BDNF regulates BIM expression levels in 3-nitropropionic acid-treated cortical neurons. *Neurobiol Dis* 35:448–456.
- Barzilai A, Biton S, Shiloh Y. 2008. The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair* 7:1010–1027.
- Beurel E, Jope RS. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79:173–189.
- Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Créminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E. 2003a. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23:5020–5030.
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Créminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E. 2003b. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 278:43245–43253.
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40:e331–e339.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59:427–468.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95:1521–1540.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF. 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646–653.
- Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC. 2002. Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277:33791–33798.
- Chen P, Peng C, Luff J, Spring K, Watters D, Bottle S, Furuya S, Lavin MF. 2003. Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice. *J Neurosci* 23:11453–11460.
- Chong MJ, Murray MR, Gosink EC, Russell HR, Srinivasan A, Kapse-taki M, Korsmeyer SJ, McKinnon PJ. 2000. Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:889–894.
- Cohen P, Frame S. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:769–776.
- Colin E, Régulier E, Perrin V, Dürr A, Brice A, Aebischer P, Déglon N, Humbert S, Saudou F. 2005. Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *Eur J Neurosci* 21:1478–1488.
- Doble BW, Woodgett JR. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116:1175–1186.
- Duan W, Guo Z, Mattson MP. 2000. Participation of par-4 in the degeneration of striatal neurons induced by metabolic compromise with 3-nitropropionic acid. *Exp Neurol* 165:1–11.
- Duran-Vilaregut J, del Valle J, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. 2009. Blood-brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Neurotoxicology* 30:136–143.
- Duran-Vilaregut J, Del Valle J, Manich G, Junyent F, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. 2010. Systemic administration of 3-nitropropionic acid points out a different role for active caspase-3 in neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 56:443–450.
- Galas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schifmann SN, Blum D. 2004. Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis* 15:152–159.
- Gómez-Sintes R, Lucas JJ. 2010. NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy. *J Clin Invest* 120:2432–2445.
- Gómez-Sintes R, Hernández F, Bortolozzi A, Artigas F, Avila J, Zaratini P, Gotteland JP, Lucas JJ. 2007. Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *EMBO J* 26:2743–2754.
- Grimes CA, Jope RS. 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391–426.
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39:385–389.
- Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. 2010. ATM activation by oxidative stress. *Science* 330:517–521.
- Jope RS, Johnson GV. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29:95–102.
- Kansler A, Daily D, Hochman A, Stern N, Shiloh Y, Rotman G, Barzilai A. 2001. Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice. *Cancer Res* 61:1849–1854.
- Kim GW, Chan PH. 2002. Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:798–809.
- Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R Jr, Gorospe M, Mattson MP. 2004. Cell cycle activa-

- tion linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41:549–561.
- Lee ST, Chu K, Park JE, Hong NH, Im WS, Kang L, Han Z, Jung KH, Kim MW, Kim M. 2008a. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J Neurochem* 104:1190–1200.
- Lee ST, Park JE, Kim DH, Kim S, Im WS, Kang L, Jung SH, Kim MW, Chu K, Kim M. 2008b. Granulocyte-colony stimulating factor attenuates striatal degeneration with activating survival pathways in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res* 1194:130–137.
- Lee Y, McKinnon PJ. 2000. ATM dependent apoptosis in the nervous system. *Apoptosis* 5:523–529.
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. 2000. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 20:9356–9363.
- Liao Y, Hung MC. 2010. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* 2:19–42.
- Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. 2009. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA-and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 16:899–909.
- Liu N, Stoica G, Yan M, Scofield VL, Qiang W, Lynn WS, Wong PK. 2005. ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes. *Lab Invest* 85:1471–1480.
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18:492–498.
- Macleod MR, Ramage L, McGregor A, Seckl JR. 2003. Reduced NMDA-induced apoptosis in neurons lacking ataxia telangiectasia mutated protein. *Neuroreport* 14:215–217.
- Malagelada C, Jin ZH, Greene LA. 2008. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J Neurosci* 28:14363–14371.
- Mandavilli BS, Boldogh I, Van Houten B. 2005. 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 133:215–223.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274.
- McKinnon PJ. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 5:772–776.
- Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondada V, Lee J, Hadley RW, Geddes JW. 2003. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* 43:89–99.
- Nie N, Yu JC, Fu Y, Cheng HY, Chen FY, Qu Y, Han JX. 2009. Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 378:103–107.
- Ortega F, Pérez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT. 2010. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci* 67:1723–1733.
- Pang Z, Geddes JW. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci* 17:3064–3073.
- Pang Z, Bondada V, Sengoku T, Siman R, Geddes JW. 2003. Calpain facilitates the neuron death induced by 3-nitropropionic acid and contributes to the necrotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:633–643.
- Polager S, Ginsberg D. 2009. p53 and E2f partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 9:738–748.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23:3394–3406.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155–168.
- Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, O'Neill C. 2009. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 467:30–35.
- Travis J. 1994. Glia: the brain's other cells. *Science* 266:970–972.
- Wang KK. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23:20–26.

ARTICLE 5

**BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION IN THE STRIATUM OF RATS TREATED
WITH 3-NITROPROPIONIC ACID**

Joaquim Duran-Vilaregut, Jaume del Valle, Antoni Camins, Mercè Pallàs,
Carme Pelegrí i Jordi Vilaplana

Neurotoxicology 2009; 30: 136-143

RESUM

Objectius: Estudiar la integritat de la BHE dels vasos sanguinis del cos estriat de rates tractades amb 3-NPA, valorant l'efecte de la toxina sobre els diferents components de la BHE com les TJ, les cèl·lules endotelials i la làmina basal. A més a més, analitzar les possibles diferències entre els vasos sanguinis de les zones lesionades del cos estriat enfront a les no lesionades.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates SD de 220-250 g de pes. El model experimental es va induir administrant a les rates una dosi de 3-NPA de 20 mg/kg per via intraperitoneal durant 3 dies (dia 0, 1 i 2). Al mateix temps, un grup control es va injectar amb sèrum fisiològic. El dia 6, es van anestessiar els animals i la meitat de les rates de cada grup es va perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció del seu encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a -80 °C. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos anti-antigen endotelial de barrera (EBA, *Endothelial barrier antigen*), anti-ZO-1 i anti-laminina, per analitzar l'estat de la BHE. L'altra meitat dels animals es van perfondre amb sèrum fisiològic seguit d'una solució de BE a l'1% i p-formaldehid al 4% en solució amortidora de fosfats (PBS, *Phosphate buffered saline*). Es van extreure els encèfals, es van postfixar en p-formaldehid al 4% i es van crioprotegir amb sucrosa al 30% en PBS. L'extravasació de BE es va utilitzar per identificar les zones lesionades del cervell dels animals tractats amb 3-NPA. Totes les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal.

Resultats: Els animals tractats amb 3-NPA van presentar una pèrdua important de pes comparat amb els control i es va observar una correlació positiva entre l'afectació motora i la pèrdua de pes. En els animals tractats amb 3-NPA la part dorsolateral del cos estriat es va trobar especialment afectada i la BHE pràcticament va desaparèixer en el centre de la lesió, com es va evidenciar per una gran extravasació de BE i la incorporació del colorant a algunes cèl·lules d'aquesta zona (Figura 31). Des del centre de la lesió, la intensitat de fluorescència anava disminuint fins a la vora de la lesió, on desapareixia. En els animals control, no s'observava extravasació en l'estriat, indicant que la BHE era funcional.

A les rates control, el marcatge immunohistoquímic amb els anticossos anti-EBA i anti-laminina va mostrar positivitat en tots els vasos sanguinis, amb un patró continu i ben definit (Figura 32). El mateix patró es va observar a les zones no lesionades del cos estriat

dels animals tractats amb 3-NPA. En canvi, a les zones lesionades, es van observar alteracions molt importants respecte als controls. El marcatge amb EBA apareixia de forma discontinua i no es podien identificar fàcilment estructures corresponents a vasos sanguinis. El marcatge corresponent a la laminina de la membrana basal dels vasos sanguinis mostrava el mateix aspecte.

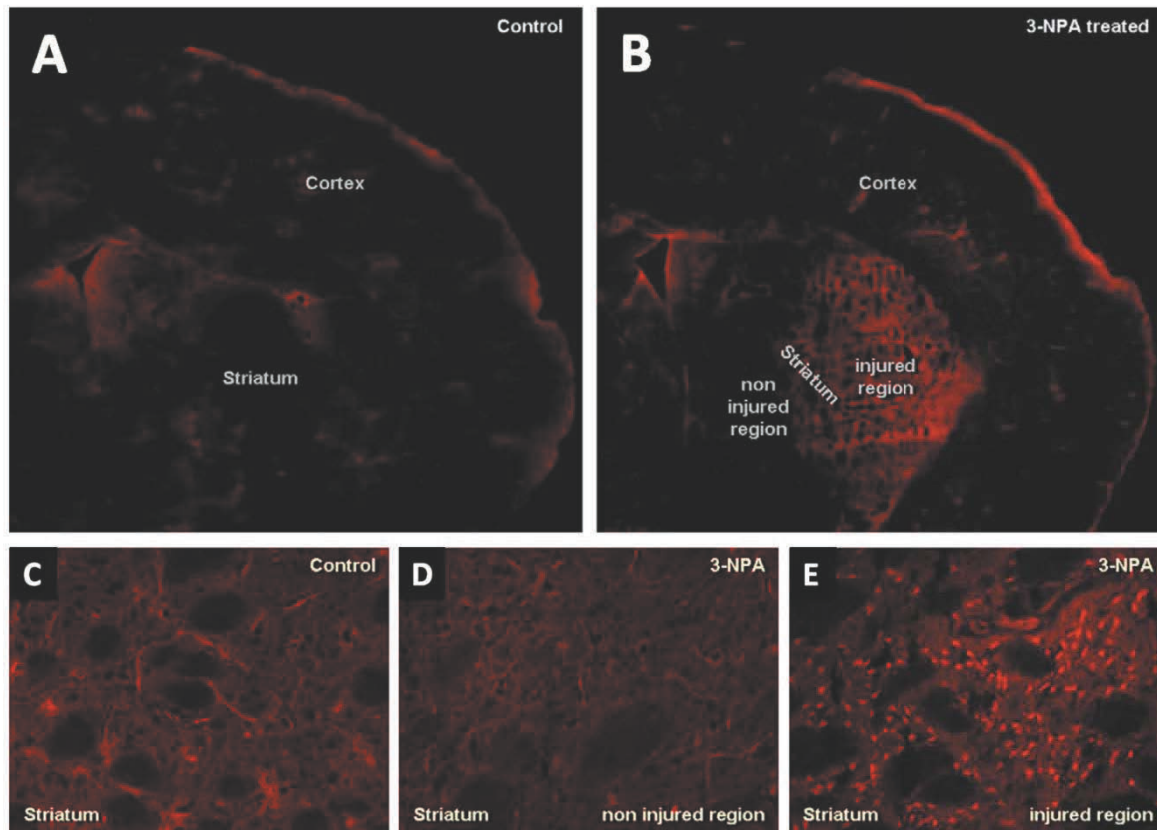


Figura 31. Estudi d'extravasació de BE en una secció de l'encèfal de rates control i tractades amb 3-NPA. Imatges representatives del cos estriat de rates control (A, C) i tractades amb 3-NPA (B, D, E) corresponents a l'estudi d'extravasació de BE. Hemisferis cerebrals complets d'una rata control (A) i una tractada amb 3-NPA (B). Cos estriat d'una rata control (C). Cos estriat d'una rata tractada amb 3-NPA, zona no lesionada (D) i zona lesionada (E).

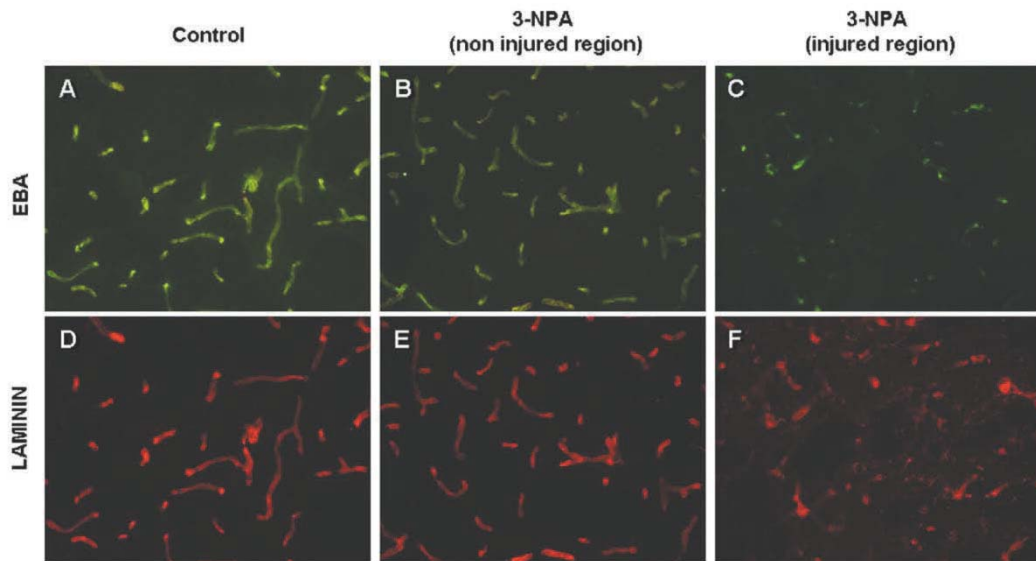


Figura 32. Marcatge d'EBA i laminina en rates control i tractades amb 3-NPA. Marcatge representatiu amb l'anticòs anti-EBA (A, B, C) i anti-laminina (D, E, F) del cos estriat de rates control (A, D) i tractades amb 3-NPA, zona no lesionada (B, E) i lesionada (C, F).

El marcatge amb ZO-1 va mostrar un patró de filaments ben definits al llarg dels vasos sanguinis de l'encèfal de les rates control i de les zones no lesionades del cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA. A les zones lesionades de l'estriat, el marcatge amb ZO-1 era molt dèbil i difús i ja no mostrava un patró de filaments ben definits (Figura 33).

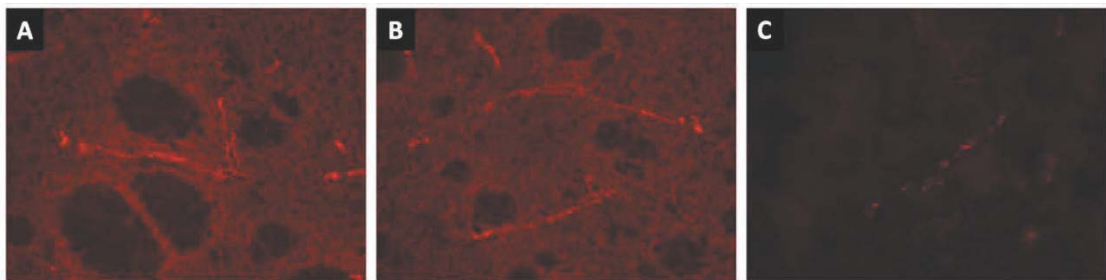
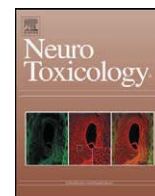


Figura 33. Marcatge de ZO-1 en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA. Marcatge representatiu amb l'anticòs anti-ZO-1 del cos estriat de rates control (A) i tractades amb 3-NPA, zona no lesionada (B) i lesionada (C).

Conclusions: El tractament amb 3-NPA indueix alteracions importants a l'estructura de la BHE del cos estriat dels animals tractats, tant a nivell de les cèl·lules endotelials com a nivell de la membrana basal dels vasos sanguinis i de les TJ.



Blood-brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid

Joaquim Duran-Vilaregut^{a,c}, Jaume del Valle^{a,c}, Antoni Camins^{b,c}, Mercè Pallàs^{b,c}, Carme Pelegrí^{a,c,1}, Jordi Vilaplana^{a,c,1,*}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^c CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2008

Accepted 19 October 2008

Available online 5 November 2008

Keywords:

3-Nitropropionic acid

Blood-brain barrier

Huntington's disease

Evans blue

Striatum

ABSTRACT

3-Nitropropionic acid (3-NPA) is a natural toxin that is used to induce models of Huntington's disease (HD) in experimental animals. Here we injected 3-NPA into Sprague–Dawley rats in order to evaluate its effects on the blood-brain barrier (BBB). Evans blue (EB) extravasation was used to identify injured areas in the brains of the treated animals and immunostainings of endothelial brain barrier antigen (EBA), zona occludens-1 (ZO-1) and laminin were used as markers to characterize the effects of the neurotoxin on the BBB. Treated rats had a significant loss of body weight compared to controls, and a correlation between motor affectation and body weight loss was observed in the former. The lateral part of the striatum was specifically injured in treated animals and the BBB almost disappeared in the core of the injured areas, as evidenced by a high EB extravasation and severe alterations of the immunostainings of the three BBB integrity markers compared to those of control animals. We conclude that the BBB is severely affected in the 3-NPA rat model of HD and that disruption of this barrier is a crucial event during the development of this disease.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant inherited neurodegenerative disorder that is clinically characterized by involuntary choreic movements, psychiatric affectation and dementia. The molecular mechanism behind HD consists of an abnormal polyglutamine extension in the N-terminal region of the huntingtin protein (Walling et al., 1998). Physiopathologically, neurodegeneration of the neostriatum (caudate nucleus and putamen) is the main cerebral alteration observed in HD patients, with medium-sized spiny projection neurons containing γ -aminobutyric acid (GABA), the predominant neostriatal cell type, being selectively affected (Glass et al., 2000). At the biochemical level, studies performed in symptomatic HD patients and postmortem HD brains suggest that oxidative damage of multiple cellular components, such as DNA, proteins and lipids, and metabolic energy impairment caused by alteration of

mitochondrial respiratory chain complex (MC) II–III are the main factors that account for the neurodegeneration observed in the disease (Brouillet et al., 1999; Browne and Beal, 2006).

Present in plants such as *Astragalus* or in fungus such as *Arthrinium*, 3-nitropropionic acid (3-NPA) is a toxin that irreversibly inhibits succinate dehydrogenase (SDH), an enzyme that is the main constituent of MCII (Alston et al., 1977). Inhibition of SDH triggers metabolic energy impairment as a result of decreased mitochondrial ATP production, which causes neuronal death through several mechanisms involving excitotoxicity and oxidative stress (Lee and Chang, 2004). Striatum is the main cerebral region affected by the neurotoxin, although mechanisms underlying this specificity remain unclear (Benchoua et al., 2008). Animals and humans that accidentally ingest 3-NPA develop a neurological syndrome that mimics the clinical and physiopathological features of HD. Thus, since this finding, the toxin has been extensively used to induce animal models of HD in rodents and non-human primates (Brouillet et al., 1999, 2005).

The blood-brain barrier (BBB) is a specialized system comprising a microvascular endothelium, basement membrane, astrocytes, pericytes and microglia that limits the entry of blood components into the brain and is essential for proper central nervous system (CNS) function. Under physiologic conditions, the

* Corresponding author at: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 4024505 fax: +34 93 4035901.

E-mail address: vilaplana@ub.edu (J. Vilaplana).

¹ Contributed equally to this study.

BBB guarantees brain cells constant nutrient supply, the removal of harmful compounds via the bloodstream and protection from toxic substances present in blood (Persidsky et al., 2006). Tight junctions (TJs), formed by integral membrane proteins such as claudins and occludin, which are fixed to the cytoskeleton of endothelial cells by a family of cytoplasmic proteins called *zona occludens* (ZO), are the main structures responsible for preventing the free paracellular exchange of substances between the brain parenchyma and blood since these junctions maintain endothelial cells in close contact (Zlokovic, 2008). Several *in vivo* studies performed in rodents injected with 3-NPA have shown that striatal damage induced by the neurotoxin is associated with an alteration of BBB permeability, since albumin (Hamilton and Gould, 1987), IgG and complement factors (Nishino et al., 1995, 1997), Evans blue (EB) (Kim et al., 2003; Sato et al., 1997) and trypan blue (Reynolds and Morton, 1998) extravasation from blood vessels to cerebral parenchyma has been observed. Quite recently, a mechanism involving the digestion of the endothelial basal lamina by active matrix metalloproteinases (MMPs) has been associated with BBB dysfunction induced by 3-NPA (Kim et al., 2003).

Here we examined blood vessels from injured and non-injured areas of the striata of brains from rats treated with 3-NPA to elucidate whether changes in BBB permeability induced by the neurotoxin are caused by TJs modifications or whether there is a concomitant loss of endothelial cells and basal lamina. A modification of a previously described method based on the administration of the tracer EB on the p-formaldehyde fixative solution (del Valle et al., 2008) was used to identify cerebral injured areas with extravasation. Thereafter, we assessed the integrity of the BBB by means of immunostaining of ZO-1, endothelial barrier antigen (EBA) and laminin. ZO-1 was used as a marker of TJs integrity (Kirk et al., 2003). EBA, a specific rat antigen localized in endothelial cells of the blood vessels in which BBB is present (Sternberger and Sternberger, 1987; Sternberger et al., 1989), was used to characterize endothelial cells after 3-NPA treatment. Finally, we examined the characteristics of the basal lamina by immunostaining laminin, a basic component of all basement membranes of the body, which, in the adult CNS, maintains the BBB (Liebkind et al., 2007), among other functions.

2. Materials and methods

2.1. Animals and 3-NPA treatment

Sprague–Dawley male rats (220–250 g, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) had access to food and water *ad libitum* and were kept in standard conditions of temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and 12:12-h light–dark cycles (300 lx/0 lx). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. One group of rats (treated group) was injected with saline solution containing 3-NPA adjusted to pH 7.4 with NaOH at a dose of 20 mg/kg *i.p.* once a day for 3 days (days 0, 1 and 2). The other group (control group) was injected only with saline solution. All rats were evaluated daily from day 0 until day 6 of experiment for both body weight loss and motor impairment. On day 6, the two groups of animals were sacrificed in order to obtain their brains.

2.2. Analysis of EB extravasation

Half the animals in each group were used for extravasation studies. These studies were performed following a method proposed by del Valle et al. (2008), with some modifications. Thus, rats were anaesthetized with 80 mg/kg *i.p.* of sodium

pentobarbital. They were then intracardially perfused with 50 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) followed by 50 ml of a solution prepared as follows: EB 1% (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) and p-formaldehyde 4% (Scharlau, Barcelona, Spain) in PBS. After perfusion, brains were dissected and post-fixed in 4% p-formaldehyde in PBS for 4 h, cryoprotected by immersion in PBS with 30% sucrose for 24 h, and finally frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80°C until further use. Thereafter, brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA) and 20- μm -thick cryostatic sections containing striatum were obtained at -22°C . Slices were picked up on Superfrost⁺ slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and frozen at -20°C . Sections were visualized on confocal microscopy after being coverslipped on Entellan medium (Merck, Darmstadt, Germany).

2.3. Immunohistochemistry of brain sections

The other half of the animals of each group was used for immunohistochemistry studies. These animals were also anaesthetized with 80 mg/kg *i.p.* of sodium pentobarbital and intracardially perfused with 100 ml of physiological saline. After, brains were dissected and snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80°C . Thereafter, brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA) and 20- μm -thick cryostatic sections containing striatum were obtained. Slices were picked up on common slides, fixed with acetone for 10 min at 4°C , allowed to dry at room temperature and finally frozen at -20°C until immunostaining.

Slides with brain sections from animals perfused with physiological saline were allowed to thaw at room temperature and were rehydrated with PBS for 5 min before being blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma–Aldrich) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma–Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, slides were incubated with the primary antibody (see below) for 90 min at room temperature. They were then washed again and incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). Five minutes before the end of the second incubation, nuclear staining was performed by adding Hoechst reagent at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS to the incubation medium, in such a way that its final concentration was 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finally, slides were washed, mounted using Prolong Gold (Invitrogen) anti-fade medium, allowed to dry for 3 h at room temperature and stored at 4°C in the dark. Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies.

The following primary antibodies against BBB proteins were used: mouse monoclonal anti-rat EBA (SMI 71) from Covance (Emeryville, CA, USA; dilution 1/100); rabbit polyclonal anti-ZO-1 from Zymed (South San Francisco, CA, USA; dilution 1/100); and rabbit anti-laminin from Sigma (Saint Louis, Missouri, USA; dilution 1/200). AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG and AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; dilution 1:250) were used as secondary antibodies.

2.4. Fluorescence microscopy analysis

Slides were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany). For each brain section, several images were digitalized with a number of laser filters for further analysis. AlexaFluor 488 staining was excited with a laser of 488 nm (blue zone) and viewed as green fluorescence. AlexaFluor 555 and EB were excited at 543 nm (green zone) and visualized as red fluorescence. Nuclear staining (Hoechst) was excited at 351 and 364 nm (ultraviolet) and visualized as blue fluorescence.

3. Results

3.1. Body weight loss and motor abnormalities in 3-NPA-treated rats

The body weight curve for 3-NPA-treated animals showed evident disturbances compared to that corresponding to controls (Fig. 1). On day 0, at the beginning of the study, no significant differences in this variable were observed between the two groups. In contrast, on day 1, 24 h after the first administration of the neurotoxin, the mean body weight of treated animals was significantly lower than that of controls. Day-to-day differences became more notable until day 3, 24 h after the final 3-NPA injection. From day 3 onwards, the body weight of treated animals started to increase, although it remained significantly lower than that of the control group (Mann–Whitney *U*-test, $p < 0.05$ on all days except day 0).

In addition, we monitored the motor behaviour of control and 3-NPA-treated rats from day 0 (beginning of 3-NPA administration) until the day the animals were killed. For this purpose, each animal was subjected to a test similar to others described in the literature (Deshpande et al., 2006). The test consisted of forcing the animals to climb a cage grid. During the test, explicit motor abnormalities were observed in 3-NPA-treated rats since they used only their fore limbs. In contrast, control animals climbed the grid with a well coordinated postural control, using both fore and hind limbs.

3.2. EB extravasation in brains of control and 3-NPA-treated rats

No trace of red fluorescence caused by EB leakage to striatal parenchyma was observed in the control animals (Fig. 2A). However, a large injured area with evident extravasation that included the whole lateral part of the striatum was detected in the group treated with 3-NPA (Fig. 2B). The core of the lesion was located in the striatal-most lateral end, where EB staining was more intense and bright. From this point, red fluorescence progressively declined until reaching the perilesional rim of the lesion, where it disappeared. Almost symmetrical injured areas with extravasation were observed in striata from the right and left hemispheres, both being of similar size and placed in the lateral part of this cerebral structure. Fig. 2C–H shows enlarged images of the control (C and F) and 3-NPA-treated (D, E, G and H) rats. In the control animals (Fig. 2F), EB red fluorescence was confined to the

lumen of some blood vessels and did not envelope them, thereby indicating that the BBB was functional. In contrast, magnification of the injured area of the striatum of the treated animals (Fig. 2H) showed high levels of red fluorescence caused by EB extravasation and several cells that incorporated part of the leaked EB, as shown by its strong red fluorescence. The non-affected part of the striata of the treated rats (Fig. 2D and G) showed a similar appearance to that of the control animals, with neither extravasation nor fluorescent stained cells.

Finally, the cerebral cortex of both hemispheres remained free of red fluorescence in both experimental groups, thereby indicating that this cerebral area was not damaged by the 3-NPA treatment.

3.3. Immunostaining of the BBB components used as integrity markers

Two double immunostainings, anti-EBA/anti-ZO-1 and anti-EBA/anti-laminin, were used to analyse the integrity of the BBB in the striata of controls and 3-NPA-treated animals. The immunoreactivity for the anti-EBA antibody in the control rats was confined to blood vessels, all of which showed a well defined and continuous staining (Fig. 3A). In the same animals, ZO-1 (Fig. 3D) appeared as thin well defined filaments that spread out along the vessels. Fig. 3G and J shows magnified images of EBA and ZO-1 stainings corresponding to the same control. The non-injured part of the striata of treated rats showed a pattern of staining similar to that observed in the controls (Fig. 3B and H corresponding to EBA and 3E and K to ZO-1). The striatal injured area of the 3-NPA-treated animals showed dramatic alterations in staining compared to controls and the non-injured area of treated rats. EBA staining (Fig. 3C) had almost disappeared and no structure resembling blood vessels was detected. ZO-1 staining (Fig. 3F) was much weaker and diffuse and it had lost its distribution in thin and well defined filaments. Magnified images from the striatal injured area of treated animals, corresponding to EBA and ZO-1 stainings, respectively, are shown in Fig. 3I and L.

In anti-EBA/anti-laminin staining, EBA showed a staining pattern identical to that described above (Fig. 4A, B, C, G, H and I). Among these figures, it is worth highlighting Fig. 4I, which shows a vessel with its BBB partially disintegrated, as it had been digested. With regard to laminin, the controls (Fig. 4D and J) and the non-injured areas of the striata of 3-NPA-treated rats (Fig. 4E and K) show very similar staining compared to EBA, since laminin was also confined to blood vessels and the staining was well defined and continuous. A great loss of staining was observed in the injured area of the striata of treated rats (Fig. 4F and L), thereby indicating disruption of the basement membrane of blood vessels. Co-localization of the two stainings is shown in Fig. 4M–O. In the latter, it can be clearly appreciated how basement membrane envelopes the endothelial cells of the blood vessel.

4. Discussion

We have shown that in the 3-NPA rat model of HD the BBB loses its integrity not only as a result of punctual TJ alterations but also because of large alterations in the injured areas of the striata. Large extravasation areas where EB had flowed from circulating blood to parenchyma were detected in the lateral part of the striata of the treated animals, thus indicating that the BBB had lost its function there. Later, EBA, ZO-1 and laminin immunostainings confirmed that in lesioned areas with extravasation, BBB was completely disrupted. EBA, a marker of endothelial cells from brain blood vessels, was almost absent in the core of the lesions observed, while areas next to the core revealed blood vessels that appeared to be partially digested. Immunostaining of ZO-1, a marker of TJ

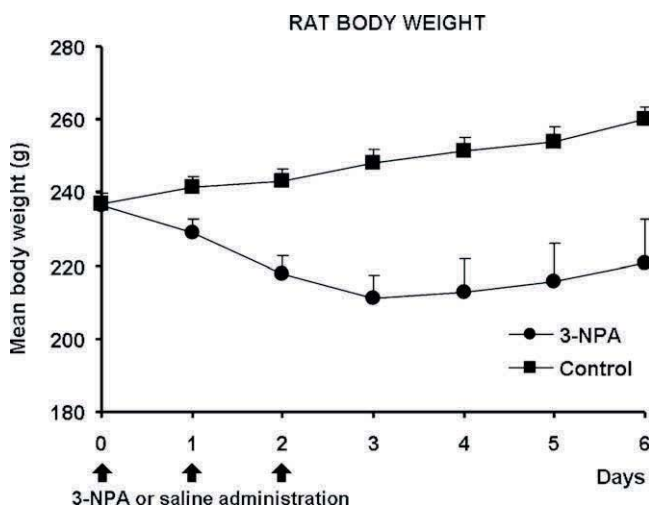


Fig. 1. Body weight of rats treated with 3-NPA and controls throughout the study. Data are expressed as mean \pm S.E.M. On days 0, 1, and 2, treated rats received 3-NPA while controls received saline solution.

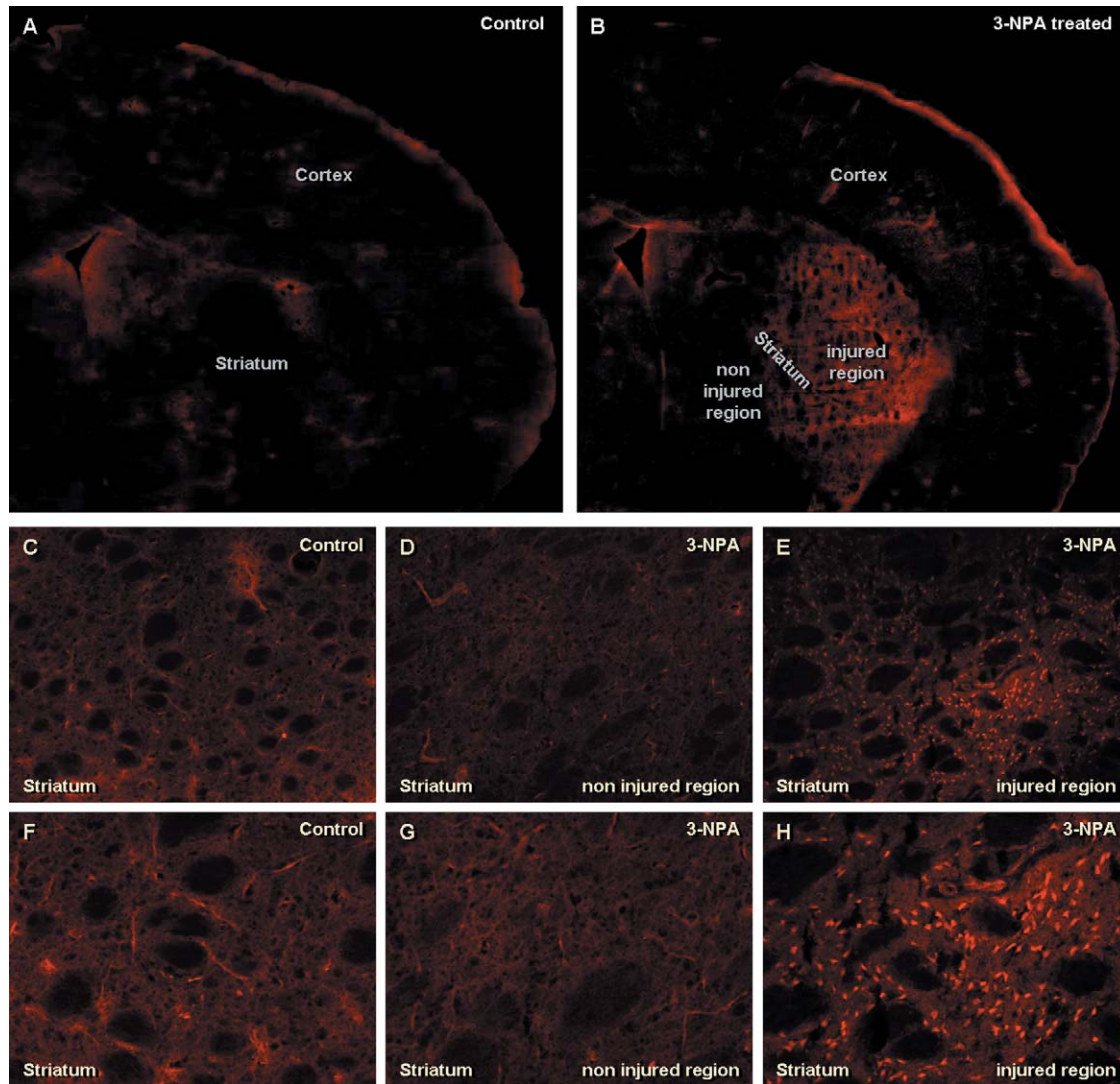


Fig. 2. Representative images of striata from 3-NPA-treated and control rats corresponding to EB extravasation study. (A) Complete cerebral hemisphere from a control animal. (B) Complete cerebral hemisphere from a 3-NPA-treated animal. (C and F) Magnified images of the striatum of a control animal. (D and G) Magnified images of the non-injured part of the striatum of a 3-NPA-treated animal. (E and H) Magnified images of the injured area of the striatum of a 3-NPA-treated animal.

integrity, was weaker and more diffuse in injured areas, and laminin, a component of the basal lamina, had a pattern of staining very similar to that observed for EBA.

EB extravasation showed that the lateral part of the striatum was the most affected cerebral area after 3-NPA treatment. This finding is consistent with reports by other authors who found that in subacute treatments, with an administered amount of neurotoxin ranging from 15 mg/kg to 20 mg/kg for 3–5 days, only some of the animals with striatal affectation presented neurodegeneration in extrastriatal regions, such as the hippocampus (Beal et al., 1993; Guyot et al., 1997). Several regimens of intoxication differing in terms of 3-NPA delivery have been used to induce striatal lesions, and these studies have revealed that *in vivo*, 3-NPA toxicity can vary depending on the protocol of administration (Brouillet et al., 2005). In acute treatments, when 30 mg/kg of the neurotoxin were administered, multiple extrastriatal regions including cortex, hippocampus, thalamus and cerebellum appeared injured (Hamilton and Gould, 1987; Binienda et al., 1995).

The reason for the striatal specificity of 3-NPA remains unknown. When it is systemically administered to rats and mice,

irreversible inhibition of SDH produced by this neurotoxin induces chronic impairment of energy metabolism associated with an ATP deficiency in the whole body. Regarding the brain, although the inhibition of SDH is similar throughout all its regions (Alexi et al., 1998), the lateral part of the striatum is especially damaged. Several mechanisms have been put forward to explain this observation. Among these, mechanisms involving neurotransmission systems found in the striatum, such as glutamatergic, dopaminergic, cannabinoid and adenosine systems, could be the main elements responsible for its vulnerability (Brouillet et al., 2005). With respect to glutamate, which acts in the striatum mainly through *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Centonze et al., 2006; Lee et al., 2002), it has been observed that administration of 3-NPA does not increase the extracellular levels of this compound (Beal et al., 1993). However, surgical removal of glutamatergic cortical projections to the striatum and administration of glutamate release blockers, such as lamotrigine, or NMDA antagonists, such as MK-801 or memantine, protect the striatum against the neurotoxin action (Doble, 1999; Kim et al., 2000; Lee et al., 2006; Schulz et al., 1996; Storgaard et al., 2000).

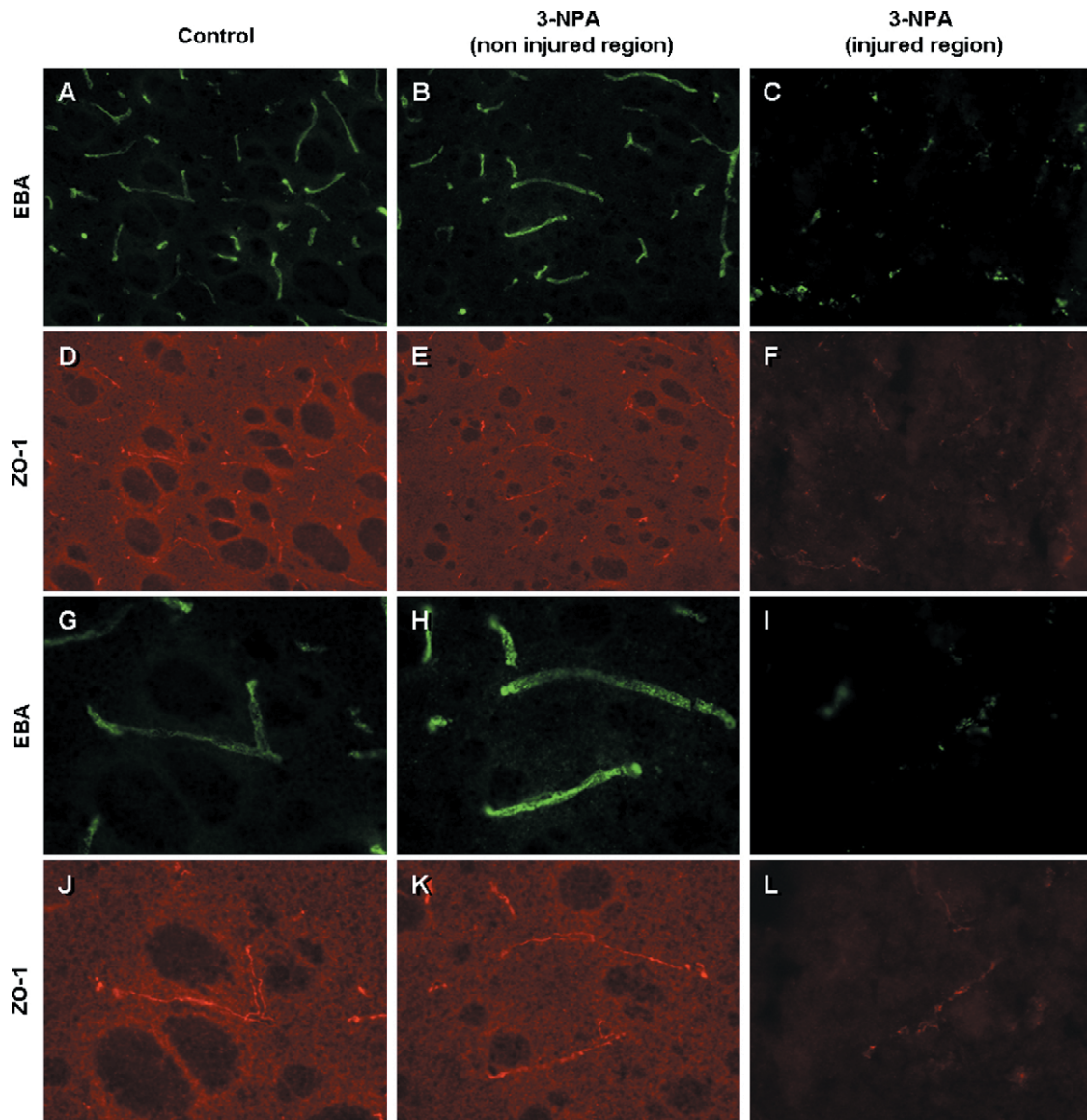


Fig. 3. Representative EBA (A, B, C, G, H and I) and ZO-1 (D, E, F, J, K and L) staining of the striata of control and 3-NPA-treated rats. (A, D, G and J) Striatum from a control animal. (B, E, H and K) Non-injured striatum from a 3-NPA-treated animal. (C, F, I and L) Injured area of the striatum of a 3-NPA-treated animal.

In addition to neurotransmitter systems, in a recent report (Akashiba et al., 2008), a new mechanism involving neuronal cell cycle re-entry has been suggested to play a prominent role in selective vulnerability of the striatum against 3-NPA. In this study, striatal and cortical neurons were exposed to the neurotoxin. Following this, the activation of cell cycle proteins via calpain-mediated p27 down-regulation leading to the induction of cell cycle progression, which was associated to apoptotic cell death, was only observed in striatal neurons. Giving support to this work, we have observed in 3-NPA-treated animals a cell cycle re-entry in the striatal neurons but not in neurons of other cerebral zones (Pelegrí et al., 2008). Finally, selective vulnerability of the striatum to 3-NPA has been also related to a particular sensitivity of the lateral striatal artery to the toxin (Nishino et al., 1995, 1997). As a perforating artery, the lateral striatal artery is especially sensitive to intracerebral hemorrhage. This artery has high intraluminal pressure, its vascular wall is thin compared to its diameter and it is very richly innervated. Because of these features, it is reasonable to hypothesize that in difficult conditions, for instance an assault by a neurotoxin such as 3-NPA, the lateral striatal artery is rapidly

affected. This affection would lead to the dysfunction of the BBB, followed by extravasation of serum proteins as well as lymphocytes and neutrophils.

The patterns of EBA, ZO-1 and laminin staining in the present work showed that BBB practically disappeared in the cores of the striatal lesions of the rats treated with 3-NPA, while it was partially digested in injured areas next to the core. EBA plays a crucial role in maintaining BBB integrity (Ghabriel et al., 2000). Moreover, it is a specific immunohistochemical marker of normal CNS microvessels and its intensity is diminished in pathological brain conditions such as ischemia (Lin and Ginsberg, 2000; Lu et al., 2008), traumatic injury (Lin et al., 2001) and stroke (Gursoy-Ozdemir et al., 2004), thereby suggesting impairment of the BBB. Degradation of ZO-1 and basement membrane has also been detected in ischemia (Asahi et al., 2001; del Zoppo and Mabuchi, 2003), while in multiple sclerosis staining of ZO-1 reveals abnormalities in TJs (Kirk et al., 2003).

Proteases of the serine and MMPs are proteolytic enzymes produced by endothelial cells, neurons, microglia and astrocytes that play a pivotal role in BBB impairment, since they are able to

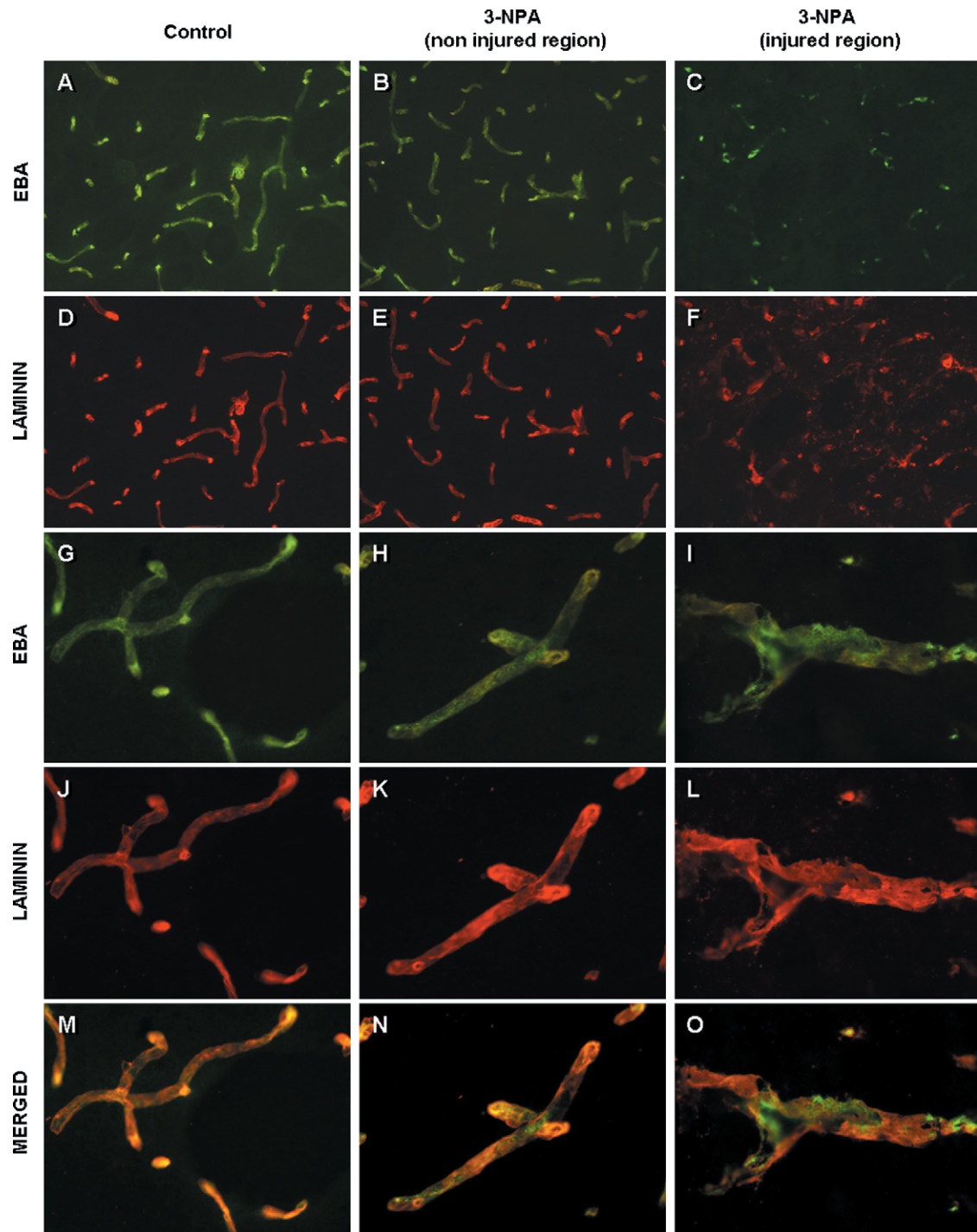


Fig. 4. Representative EBA (A, B, C, G, H and I) and laminin (D, E, F, J, K and L) staining of the striata of control and 3-NPA-treated rats. (A, D, G and J) Striatum of a control animal. (B, E, H and K) Non-injured striatum of a 3-NPA-treated animal. (C, F, I and L) Injured area of the striatum of a 3-NPA-treated animal. (M, N and O) Merged magnified images.

degrade proteins of the basal lamina and TJs (Asahi et al., 2001; Fukuda et al., 2004; Yang et al., 2007). Oxidative stress associated to reactive oxygen species (ROS) production, which is one of the main mechanisms involved in 3-NPA toxicity (Lee and Chang, 2004), has been connected to the increase of MMPs activity in several cerebral pathological conditions such as focal cerebral ischemia and cold injury induced brain trauma (Alexander and Elrod, 2002; Yu et al., 2008). The activation of MMP-9, which was found to be contemporary in space and time to EB extravasation, has also been reported in the 3-NPA model

of HD (Kim et al., 2003). Recently, a novel pathway connecting oxidative stress in endothelial cells and BBB injury has been proposed (Haorah et al., 2007). Its starting point, consisting in the activation of the protein tyrosine kinase (PTK) by ROS, leads to up-regulation of MMPs with concomitant degradation of basal lamina proteins and phosphorylation of TJs proteins at tyrosine residues. As a result of this, the integrity of BBB is lost and its permeability increases. Production of ROS has also been related to brain endothelial cell death following an apoptotic mechanism. In a BBB cell model, exposure to human immuno-

deficiency virus proteins induced oxidative stress on the endothelial cells and activation of caspase-3, a central component of the proteolytic cascade during apoptosis (Price et al., 2006). In another report, mouse cerebral endothelial cells were exposed to oxidized low-density lipoprotein (Chen et al., 2007). This oxidative insult increased the levels of cellular and mitochondrial proapoptotic Bax protein, induced mitochondria dysfunction due to suppression of its membrane potential, augmented the amounts of mitochondria-related apoptotic factors such as cytochrome c, and finally increased intracellular ROS and the activities of caspase-9, -3 and -6. On the basis of all these findings we can hypothesize that the activation of PTK and MMPs and apoptotic cell death processes involving a Bax-mitochondria-caspase protease pathway could be mechanisms implicated on the BBB disruption observed in 3-NPA treatments.

It is well accepted that the excitotoxicity via overstimulation of NMDA receptors is another mechanism that plays an important role in the pathogenesis of 3-NPA-induced neuronal death (Lee and Chang, 2004). Although it has been shown that rat cerebral endothelial cells express various glutamate receptors including NMDA receptors (Krizbai et al., 1998), the fact of whether neurotoxic levels of this compound could be toxic for them or not remains unclear, as recent reports pointing out to both directions can be found. Sharp et al. (2003) suggested that glutamate contributes to the loss of endothelial barrier through NMDA receptors and András et al. (2007) have recently shown that these receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression. However, Domoki et al. (2008) have concluded that cerebral endothelial cells are resistant to glutamatergic stimuli in accordance with their *in vivo* role as regulators of potentially neurotoxic amino acids crossing the BBB.

In conclusion, our study shows that 3-NPA induces dramatic alterations in BBB structure, changes that generally affect endothelial cells as well as basal lamina in striatal blood vessels. In order to design new therapeutic strategies against HD, further studies must address the general mechanisms underlying this phenomenon and their relationship with the neurodegenerative process.

Acknowledgements

Grants: This study was supported by grants BFU/2006-11981, SAF2005-01604 and SAF-2006-13092 from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain); and 2005/SGR00893 from the *Generalitat de Catalunya*. J. del Valle is sponsored by a *Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons 2007* scholarship (Universitat de Barcelona).

References

- Akashiba H, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. Differential involvement of cell cycle reactivation between striatal and cortical neurons in cell death induced by 3-nitropropionic acid. *J Biol Chem* 2008;283:6594–606.
- Alexander JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat* 2002;200:561–74.
- Alexi T, Hughes PE, Knüsel B, Tobin AJ. Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague-Dawley rats but not in BALB/c By J mice. *Exp Neurol* 1998;153:74–93.
- Alston TA, Mela L, Bright HJ. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3767–71.
- András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1431–43.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001;21:7724–32.

- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993;13:4181–92.
- Benchoua A, Trioulier Y, Diguët E, Malgorn C, Gaillard MC, Dufour N, et al. Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum Mol Genet* 2008;17:1446–56.
- Binienda Z, Frederick DL, Ferguson SA, Rountree RL, Paule MG, Schmued L, et al. The effects of perinatal hypoxia on the behavioral, neurochemical, and neurohistological toxicity of the metabolic inhibitor 3-nitropropionic acid. *Metab Brain Dis* 1995;10:269–82.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 1999;59:427–68.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 2005;95:1521–40.
- Browne SE, Beal MF. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:2061–73.
- Centonze D, Prosperetti C, Barone I, Rossi S, Picconi B, Tschertner A, et al. NR2B-containing NMDA receptors promote the neurotoxic effects of 3-nitropropionic acid but not of rotenone in the striatum. *Exp Neurol* 2006;202:470–9.
- Chen TG, Chen TL, Chang HC, Tai YT, Cheng YG, Chang YT, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptotic insults to mouse cerebral endothelial cells via a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;219:42–53.
- del Valle J, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C. A new method for determining blood-brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans blue - highest cocktail. *J Neurosci Methods* 2008;174:42–9.
- del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:879–94.
- Deshpande SB, Hida H, Takei-Lo N, Masuda T, Baba H, Nishino H. Involvement of nitric oxide in 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity in rats. *Brain Res* 2006;1108:205–15.
- Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999;81:163–221.
- Domoki F, Kis B, Gáspár T, Bari F, Busija DW. Cerebrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1099–108.
- Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* 2004;35:998–1004.
- Ghabriel MN, Zhu C, Hermanis G, Allt G. Immunological targeting of the endothelial barrier antigen (EBA) *in vivo* leads to opening of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2000;878:127–35.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 2000;97:505–19.
- Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bermpohl D, Jin H, et al. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest* 2004;113:1447–55.
- Guyot MC, Hantraye P, Dolan R, Palfi S, Mazière M, Brouillet E. Quantifiable bradykinin, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 1997;79:45–56.
- Hamilton BF, Gould DH. Correlation of morphological brain lesions with physiologic alterations and blood-brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol* 1987;74:67–74.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 2007;101:566–76.
- Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT, et al. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:119–29.
- Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* 2003;23:8733–42.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhor M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol* 2003;201:319–27.
- Krizbai IA, Deli MA, Pesténácz A, Siklós L, Szabó CA, András I, et al. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 1998;54:814–9.
- Lee WT, Yin HS, Shen YZ. The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. *Neuroscience* 2002;112:707–16.
- Lee WT, Chang C. Magnetic resonance imaging and spectroscopy in assessing 3-nitropropionic acid-induced brain lesions: an animal model of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2004;72:87–110.
- Lee ST, Chu K, Park JE, Kang L, Ko SY, Jung KH, et al. Memantine reduces striatal cell death with decreasing calpain level in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res* 2006;1118:199–207.
- Liebkind R, Tatlisumak E, Wiksten M, Tatlisumak T. Temporal and spatial expression patterns of laminins in ischemic adult rat brain. *Neuroscience* 2007. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.039.

- Lin B, Ginsberg MD. Quantitative assessment of the normal cerebral microvasculature by endothelial barrier antigen (EBA) immunohistochemistry: application to focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2000;865:237–44.
- Lin B, Ginsberg MD, Zhao W, Alonso OF, Belayev L, Busto R. Quantitative analysis of microvascular alterations in traumatic brain injury by endothelial barrier antigen immunohistochemistry. *J Neurotrauma* 2001;18:389–97.
- Lu A, Clark JF, Broderick JP, Pyne-Geithman GJ, Wagner KR, Ran R, et al. Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury. *Exp Neurol* 2008;210:549–59.
- Nishino H, Shimano Y, Kumazaki M, Sakurai T. Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 1995;186:161–4.
- Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, et al. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci Res* 1997;27:343–55.
- Pelegrí C, Duran-Vilaregut J, Del Valle J, Crespo-Biel N, Ferrer I, Pallàs M, et al. Cell cycle activation in striatal neurons from Huntington's disease patients and rats treated with 3-nitropropionic acid. *Int J Dev Neurosci* 2008;26:665–71.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006;1:223–36.
- Price TO, Uras F, Banks WA, Ercal N. A novel antioxidant N-acetylcysteine amide prevents gp120- and Tat-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Exp Neurol* 2006;201:193–202.
- Reynolds DS, Morton AJ. Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *J Neurosci Methods* 1998;79:115–21.
- Sato S, Gobbel GT, Li Y, Kondo T, Murakami K, Sato M, et al. Blood-brain barrier disruption, HSP70 expression and apoptosis due to 3-nitropropionic acid, a mitochondrial toxin. *Acta Neurochir Suppl* 1997;70:237–9.
- Schulz JB, Matthews RT, Henshaw DR, Beal MF. Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 1996;71:1043–8.
- Sharp CD, Hines I, Houghton J, Warren A, Jackson TH IV, Jawahar A, et al. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2592–8.
- Sternberger NH, Sternberger LA. Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8169–73.
- Sternberger NH, Sternberger LA, Kies MW, Shear CR. Cell surface endothelial proteins altered in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1989;21:241–8.
- Storgaard J, Kornblit BT, Zimmer J, Gramsbergen JB. 3-Nitropropionic acid neurotoxicity in organotypic striatal and corticostriatal slice cultures is dependent on glucose and glutamate. *Exp Neurol* 2000;164:227–35.
- Walling HW, Baldassare JJ, Westfall TC. Molecular aspects of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 1998;54:301–8.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:697–709.
- Yu F, Kamada H, Niizuma K, Endo H, Chan PH. Induction of MMP-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2008;25:184–95.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008;57:178–201.

ARTICLE 6

**ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 (MMP-9) IN STRIATAL
BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION IN A 3-NITROPROPIONIC
ACID MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE**

Joaquim Duran-Vilaregut, Jaume del Valle, Gemma Manich, Antoni Camins,
Mercè Pallàs, Jordi Vilaplana i Carme Pelegrí

Neuropathology and Applied Neurobiology 2011; 37: 525-537

RESUM

Objectius: Estudiar el paper de la MMP-2 i la MMP-9 en les alteracions de la BHE presents en rates tractades amb 3-NPA, que desenvolupen un model experimental de la MH.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates SD de 220-250 g de pes. El model experimental es va induir administrant a les rates una dosi de 3-NPA de 20 mg/kg per via intraperitoneal durant 3 dies (dia 0, 1 i 2). També es va disposar d'un grup control administrat amb sèrum fisiològic. El dia 6, es van anestessiar els animals, es van perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció de l'encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a -80 °C. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-laminina, anti-EBA, anti-NeuN (per detectar neurones), anti-GFAP (per marcar els astròcits) i anti-CD11b (per detectar micròglia). Algunes seccions criostàtiques es van processar per zimografia *in situ* emprant gelatina conjugada a fluoresceïna, per detectar l'activitat gelatinasa present al teixit. A més a més, aquesta tècnica es va combinar amb la immunohistoquímica. Així, l'activitat gelatinasa es va colocalitzar amb els marcatges d'EBA i laminina per estudiar si els vasos sanguinis presentaven aquesta activitat. Finalment, en alguns talls criostàtics es van realitzar estudis d'inhibició de l'activitat gelatinasa utilitzant anticossos dirigits contra el centre catalític de les MMP considerades. Les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal.

Resultats: A les rates tractades amb 3-NPA, la MMP-9 es va detectar al voltant de la majoria de vasos sanguinis degradats de l'àrea lesionada del cos estriat, mentre que era absent als vasos del teixit sa (Figura 34 C i D). D'altra banda, el marcatge positiu de MMP-9 va aparèixer en un gran nombre de cèl·lules de l'estriat de les rates control i de la zona no lesionada de les rates tractades (Figura 34 C i D), cèl·lules que es van identificar com a neurones (no es mostra la figura en aquest resum). En quant a la MMP-2, no es va detectar en els animals control ni en la zona no lesionada dels animals tractats, i només es va detectar de manera molt lleu a prop d'alguns vasos sanguinis de la zona lesionada dels animals tractats (Figura 34 A i B).

Seguidament, la combinació dels marcatges immunohistoquímics d'EBA i laminina amb la zimografia *in situ* van revelar l'existència d'activitat gelatinasa als vasos sanguinis en procés de degradació de l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA (no es mostra la figura en aquest resum). La posterior combinació del marcatge immunohistoquímic

de la MMP-9 realitzat abans i després de la zimografia *in situ* va permetre establir que aquesta proteasa era la principal responsable de l'activitat gelatinasa detectada als vasos degradats de la lesió estriatal. Quan la incubació amb l'anticòs dirigit contra el centre catalític de la MMP-9 era prèvia a la zimografia, l'activitat gelatinasa desapareixia, mentre que quan era posterior, ambdós marcatges colocalitzaven (Figura 35).

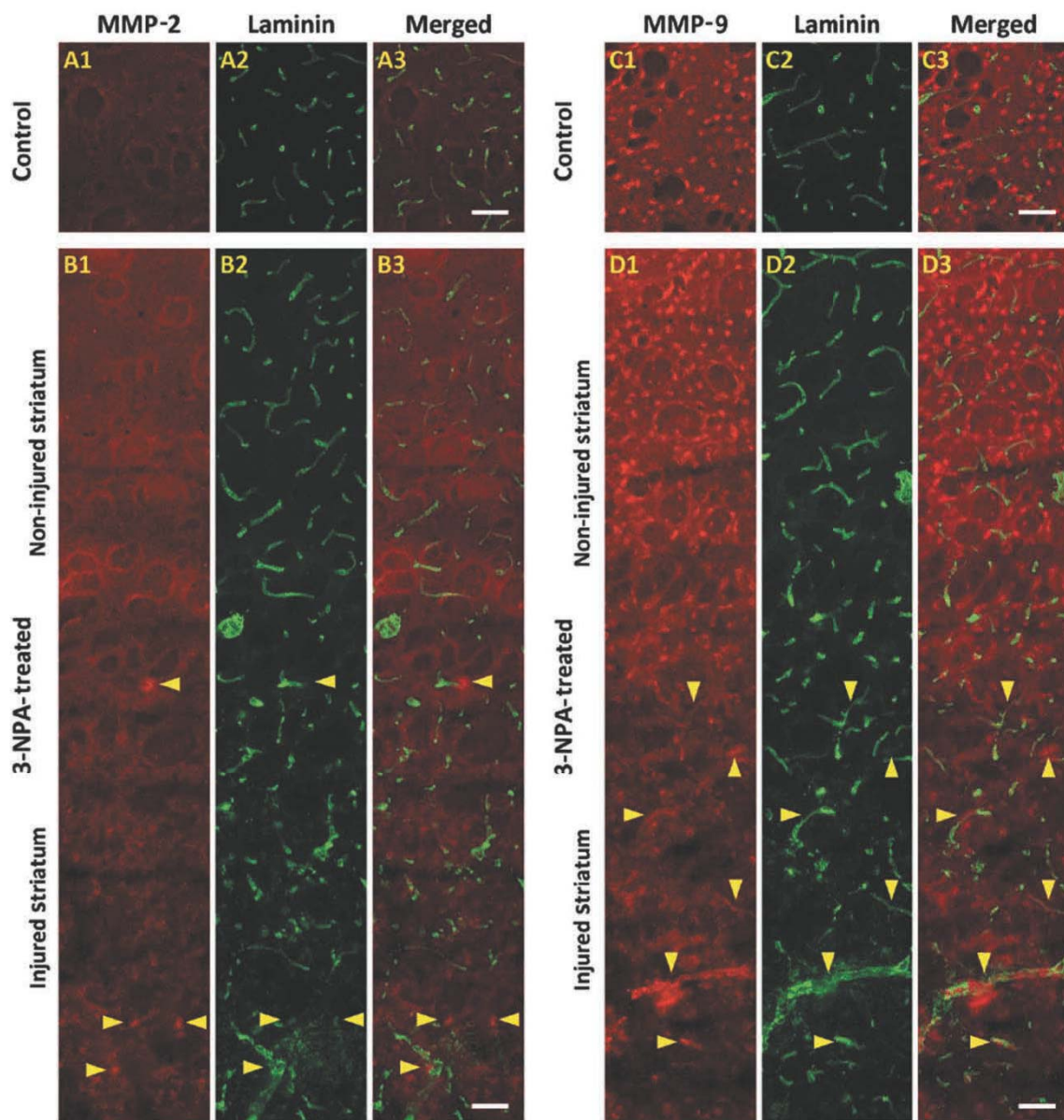


Figura 34. Patró d'expressió de la MMP-2 i la MMP-9 en el cos estriat de rates control i tractades amb 3-NPA. Expressió de la MMP-2 i la MMP-9 en el cos estriat del cervell de rates control (A1-A3 i C1-C3) i tractades amb 3-NPA (B1-B3 i D1-D3). Imatges representatives de la colocalització de marcatges de MMP-2 (A1-B3) i de MMP-9 (C1-D3) amb laminina. Les imatges es van obtenir a partir de la superposició de fotografies seriadades. Les imatges obtingudes d'animals tractats amb 3-NPA inclouen una porció de l'estriat que comprèn zona lesionada i no lesionada. Barres d'escala: 100 μ m.

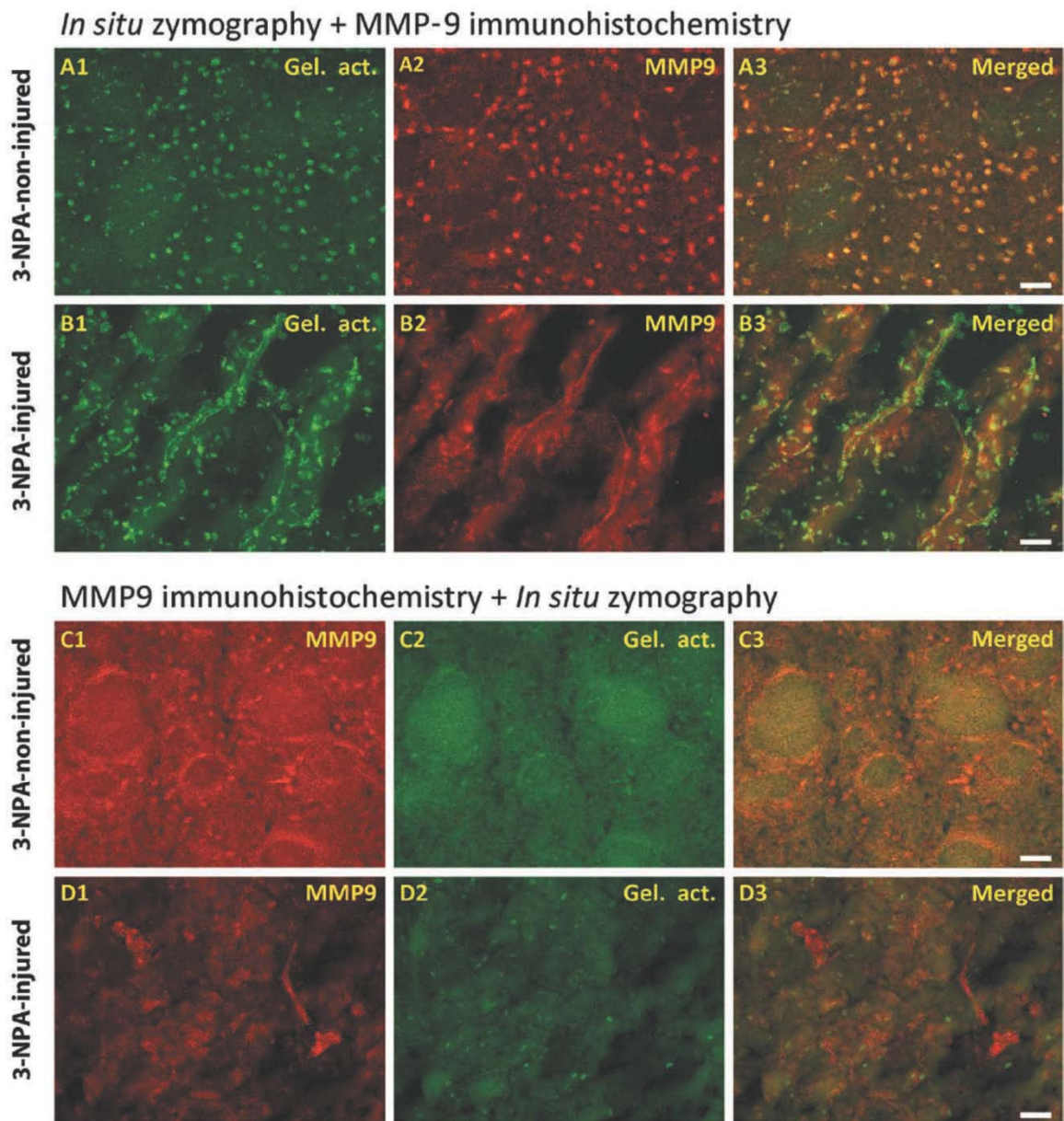


Figura 35. Estudi de l'activitat gelatinasa per zimografia *in situ* realitzat abans i després de l'immunomarcatge de MMP-9. Colocalització d'imatges representatives de marcatge amb MMP-9 (A2, B2, C1 i D1) i activitat gelatinasa (A1, B1, C2 i D2) en rates tractades amb 3-NPA. En A1-B3, la incubació amb l'anticòs anti-MMP-9 es va realitzar després de la zimografia *in situ*. En C1-D3, la incubació amb l'anticòs es va realitzar abans de la zimografia. Es mostren imatges del cos estriat lesionat i no lesionat. Barres d'escala: 50 μ m.

Conclusions: La MMP-9 exerceix un paper rellevant en la degradació dels vasos sanguinis i de la BHE a les zones lesionades del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA.

Role of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in striatal blood–brain barrier disruption in a 3-nitropropionic acid model of Huntington’s disease

J. Duran-Vilaregut*†, J. del Valle*†, G. Manich*†, A. Camins†‡, M. Pallàs†‡, J. Vilaplana*† and C. Pelegrí*†

*Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, †CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, and ‡Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

J. Duran-Vilaregut, J. del Valle, G. Manich, A. Camins, M. Pallàs, J. Vilaplana and C. Pelegrí (2011)

Neuropathology and Applied Neurobiology 37, 525–537

Role of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in striatal blood–brain barrier disruption in a 3-nitropropionic acid model of Huntington’s disease

Aims: 3-Nitropropionic acid (3-NPA) is a natural toxin that, when administered to experimental animals, reproduces the brain lesions observed in Huntington’s disease, which mainly consist of selective neurodegeneration of the striatum. The lesions also include severe alterations to the blood–brain barrier (BBB), which increase its permeability to several substances including blood components and exogenous fluorescent dyes, and the concomitant degradation of some of its constituents such as endothelial cells, tight junction proteins and the basement membrane. We studied here the role of matrix metalloproteinases (MMPs)-2 and -9, also called gelatinases A and B, in the degradation of the BBB in the striatal lesions induced by the systemic administration of 3-NPA to Sprague-Dawley rats. **Methods:** 3-NPA was intraperitoneally administered

at a dose of 20 mg/kg once a day for 3 days. MMPs were studied by means of immunohistochemistry and *in situ* zymography. **Results:** In 3-NPA-treated rats, MMP-9 was present in most of the degraded blood vessels in the injured striatum, while it was absent in vessels from non-injured tissue. In the same animals, MMP-2 staining was barely detected close to degraded blood vessels. The combination of MMP-9 immunostaining, *in situ* zymography and inhibitory studies of MMP-9 confirmed that net gelatinolytic activity detected in the degraded striatal blood vessels could be attributed almost exclusively to the active form of MMP-9. **Conclusion:** Our results highlight the prominent role of MMP-9 in BBB disruption in the striatal injured areas of this experimental model of Huntington’s disease.

Keywords: 3-nitropropionic acid, blood–brain barrier, Huntington’s disease, immunohistochemistry, matrix metalloproteinase, striatum

Correspondence: Carme Pelegrí, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avenue Joan XXIII s/n., E-08028 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 4024505; Fax: +34 93 4035901; E-mail: carmepelegri@ub.edu

J. Vilaplana and C. Pelegrí contributed equally to this study.

Conflict of interests: the authors declare that there are no conflicts of interests.

Introduction

3-Nitropropionic acid (3-NPA) is a natural toxin widely used to induce experimental models of Huntington’s disease (HD) in rodents and non-human primates [1]. The molecule is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase, the main constituent of the mitochondrial respiratory chain complex II [2]. When systemically

administered to the aforementioned experimental animals, it reproduces the brain lesions observed in HD patients, including selective neurodegeneration of the main subpopulation of striatal neurones, the gabaergic medium-sized spiny projection neurones [3]. Inhibition of succinate dehydrogenase reduces mitochondrial production of adenosine triphosphate, with concomitant neuronal death through several mechanisms involving excitotoxicity and oxidative stress [4]. Studies in *post-mortem* tissue from HD patients revealed metabolic energy impairment related to mitochondrial dysfunction in terms of, among others, a significant decrease in the activity of mitochondrial respiratory chain complexes II, III and IV. This justifies the use of 3-NPA as an approach to study HD [5]. What remains to be explained, however, is the specific involvement of the striatum by the toxin, as the decrease in succinate dehydrogenase activity for a given dose of 3-NPA is homogeneously distributed throughout the brain [6,7].

The blood–brain barrier (BBB) is a specialized system that comprises brain microvascular endothelial cells, basement membrane and various types of cells, including astrocytes, pericytes and neurones located close to the endothelium. The BBB is a key element for the central nervous system (CNS), as it shields the brain from toxic substances in the blood, supplies brain tissues with nutrients and filters harmful compounds from the brain back to the bloodstream [8]. Free exchange of solutes between blood and brain is prevented by tight sealing of endothelial cells by a junctional complex formed by several integral transmembrane proteins grouped in two families, tight junctions and adherent junctions [9]. An increase in BBB permeability has been detected in the lesions in the 3-NPA model of HD, as revealed by extravasation of blood components such as albumin, IgG and complement factors [10–12] or fluorescent dyes such as Evans blue previously injected into the bloodstream [13,14]. In a prior study performed in our laboratory, we detected Evans blue extravasation and severe alterations in the pattern of staining of vascular endothelial cells and laminin, in the striatal lesions induced in rat brains by 3-NPA, thus linking increase in BBB permeability with its disruption [15].

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a family of Zn²⁺-dependent endopeptidases including gelatinases, collagenases, stromelysins and membrane-type MMPs. They are synthesized as zymogens that are activated by proteolysis, and their main function is to cleave

protein components of the extracellular matrix [16]. Among them, MMP-9, also called gelatinase B, seems to play a key role in neuronal physiology and pathology. Under normal conditions, it is produced by neurones in the adult brain, and is involved in neuronal plasticity. On the other hand, in stroke or brain trauma MMP-9 is detrimental to the brain tissue, probably because of its excessive activity [17]. Oxidative stress is an important activator of MMP-9 and MMP-2, also called gelatinase A [18]. When activated, they degrade endothelial basal lamina and tight junction proteins such as claudin, occludin and zona occludens (ZO) [19,20]. They are both prominently involved in oxidative stress-related disruption of the BBB during cerebral ischaemia [21,22], and *in vitro* studies have also found correlation between an increase in MMP-9 and BBB dysfunction [23,24]. Activation of MMP-9 has been observed after striatal administration of 3-NPA in CD-1 mice [13].

In the present study, we examined whether the BBB alterations detected in the brains of our experimental HD model, induced in rats by intraperitoneal administration of 3-NPA, was attributable to MMP-2 or MMP-9 or both. To this end, immunostaining of MMP-2 and MMP-9 combined with antibodies directed against laminin, a basic component of all basement membranes of the body [25], neuronal antigen nuclei (NeuN), used to identify neurones [26], glial fibrillary acidic protein (GFAP), used to identify astrocytes [27], and CD11b, used to identify activated microglia [28], was first performed in order to discern the pattern of expression of both gelatinases in the brains of control and 3-NPA-treated rats. Then, as antibodies used to stain MMP-2 and MMP-9 detected both proactive and active forms of each one, *in situ* zymography was performed to locate net gelatinolytic activity in the animal brains. In some *in situ* zymography experiments, brain sections were previously incubated with antibodies against MMPs to study gelatinase activity inhibition and to discern whether this activity could be attributed exclusively to the action of MMPs, or whether the role of other proteases should be considered. Finally, *in situ* zymography was combined with immunostaining with antibodies against MMP-9, endothelial barrier antigen (EBA), which is a specific rat antigen localized in endothelial cells of the blood vessels in which BBB is present [29,30], and laminin in order to link gelatinolytic activity with the presence of MMP-9 in striatal blood vessels.

Materials and methods

Animals and 3-NPA treatment

Male Sprague-Dawley rats (220–250 g, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) had access to food and water *ad libitum* and were kept in standard conditions of temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and 12:12-h light–dark cycles (300 lx/0 lx). Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. One group of 10 rats (treated group) was injected with saline solution containing 3-NPA adjusted to pH 7.4 with NaOH at a dose of 20 mg/kg *i.p.* once a day for 3 days (days 0, 1 and 2). The control group, which included five animals, was injected only with saline solution. On day 6, both groups of animals were sacrificed in order to obtain their brains. All rats were evaluated daily from day 0 until day 6 of experiment for both body weight loss and motor impairment, and the evolution observed was similar to that described in previous studies performed in our laboratory [15].

Brain processing

Brains for immunohistochemistry and *in situ* zymography were obtained as follows. Rats were anaesthetized with 80 mg/kg *i.p.* of sodium pentobarbital and intracardially perfused with 100 ml of physiological saline. Brains were then excised and snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80°C . Thereafter, brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA, USA) and 20- μm -thick cryostatic sections containing striatum were obtained. Slices were picked up on common slides, fixed with acetone for 10 min at 4°C , allowed to dry at room temperature and finally frozen at -20°C until immunostaining or *in situ* zymography.

Immunohistochemistry of brain sections

Slides with brain sections were allowed to thaw at room temperature and were then rehydrated with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min before being blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, slides were incubated with the primary antibody (see below) for 90 min at room tempera-

ture. They were then washed again and incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). Five minutes before the end of the second incubation, nuclear staining was performed by adding Hoechst reagent at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS to the incubation medium to a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finally, slides were washed in PBS, mounted using Prolong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) anti-fade medium, allowed to dry overnight at room temperature and stored at 4°C in the dark. Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-MMP-2 directed against the whole molecule from Millipore (Billerica, MA, USA; dilution 1:100), rabbit polyclonal anti-MMP-9 directed against its catalytic site from Millipore (dilution 1:100), chicken polyclonal anti-laminin from Abcam (Cambridge, UK; dilution 1:100), mouse monoclonal anti-EBA from Covance (Emeryville, CA, USA; dilution 1:100), mouse monoclonal anti-NeuN from Millipore (dilution 1:100), chicken polyclonal anti-GEAP from Millipore (dilution 1:100) and mouse monoclonal anti-CD11b from Abcam (dilution 1:100). AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 488 goat anti-chicken IgG and AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; dilution 1:250) were used as secondary antibodies.

In situ zymography

Slides with brain sections were allowed to thaw at room temperature and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton-X-100 for 20 min. After two 5-min washes in PBS, they were incubated for 2 h at 37°C with PBS containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled DQ-gelatin (EnzCheck Collagenase Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Gelatin-FITC is cleaved by gelatinases, yielding peptides whose fluorescence is representative of net proteolytic activity. Following this, nuclear staining was performed as described above. Sections were then rinsed five times for 1 min in PBS and mounted in Prolong Gold for fluorescence microscopy.

Combined immunohistochemistry of EBA and laminin and *in situ* zymography

Slides with brain sections were permeabilized and incubated with the corresponding primary antibody as

described above. Afterwards, sections were incubated for 2 h at 37°C in PBS containing 2 µg/ml of fluorescein-labelled gelatin and the corresponding secondary antibody diluted 1:500. Subsequently, nuclear stain was performed and finally sections were rinsed five times for 1 min in PBS and mounted in Prolong Gold.

Inhibition of gelatinolytic activity

Inhibition of gelatinolytic activity was studied as follows. Brain sections were permeabilized and incubated with the primary antibody directed against MMP-9 as described above. Afterwards, sections were incubated for 2 h at 37°C in PBS containing 2 µg/ml of fluorescein-labelled gelatin and the corresponding secondary antibody diluted 1:500. Subsequently, nuclear stain was performed and finally sections were rinsed five times for 1 min in PBS and mounted in Prolong Gold. As the antibody used to detect MMP-9 recognizes its catalytic site, the gelatinolytic activity due to this gelatinase was expected to disappear.

In order to confirm that the lost gelatinolytic activity was due to MMP-9 activity, immunostaining with the anti-MMP-9 antibody was also performed after *in situ* zymography. In this case, the protease was not blocked during the zymography, so both stains could be observed simultaneously. To this end, once *in situ* zymography had been performed as described above, slices were washed five times for 1 min in PBS and immunostained with the corresponding antibody as described above.

Fluorescent microscopy analysis

Brain slices from 3-NPA-treated and control rats were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in order to collect representative images of the various stains. In some cases, series of consecutive images were collected and later reconstructed into a single image. All images were merged using Image J (National Institute of Mental Health, North Bethesda, MD, USA) and Photoshop software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

Results

We first attempted to detect MMP-2 and MMP-9 in the striata of control and 3-NPA-treated rats, paying special attention to whether their expression was associated with blood vessels, which were identified by laminin immunostaining.

Significant staining for MMP-2 was not seen in control rats (Figure 1A1) or in the uninjured area of the striatum of 3-NPA-treated ones (Figure 1B1, upper half). The loss of the characteristic structure and the presence of digested blood vessels revealed by laminin staining showed areas of striatal lesion in the 3-NPA-treated rats (Figure 1B2, bottom half). Occasional MMP-2 staining (Figure 1B1, arrowheads) that in some cases appeared relatively close to digested blood vessels was detected (Figure 1B3, arrowheads). In contrast, immunostaining for MMP-9 revealed that it was present in a significant proportion of the striatal cells of control rats (Figure 1C1), which, according to their structure and distribution, appeared to be neurones. Colocalization with laminin staining showed that MMP-9 was not found in healthy blood vessels (Figure 1C3). An identical pattern of MMP-9 expression to that observed in control rats was found in the non-injured area of the striatum of 3-NPA-treated rats (Figure 1D1, upper half), with healthy blood vessels again showing no remarkable staining for MMP-9 (Figure 1D3, upper half). In contrast, in the striatal lesion of the 3-NPA-treated rats, MMP-9 staining lost its cellular profile and acquired an appearance reminiscent of blood vessels (Figure 1D1, bottom half). Colocalization with laminin staining confirmed that many of the partially digested blood vessels that still remained in the lesion were associated with positive staining for MMP-9 (Figure 1D3, arrowheads). These results suggest a prominent role for MMP-9 rather than MMP-2 in the degradation of striatal blood vessels after administration of 3-NPA.

We next examined the nature of the cells expressing MMP-9. To this end, immunostaining for MMP-9 was performed together with NeuN, GFAP and CD11b staining in order to study whether MMP-9 was expressed by neurones, astrocytes or microglia respectively. These experiments revealed that, in control rats and healthy striatal tissue from 3-NPA-treated animals, MMP-9 was mainly expressed in neurones, as its staining colocalized almost completely with NeuN staining (Figure 2A3,B3 respectively). Insets in Figure 2A1–A3 show that MMP-9 and NeuN colocalized almost exactly, and that both stains included the nuclear Hoechst staining, indicating that MMP-9 was present in the nucleus and part of the neuronal soma. Arrowheads in Figure 2A3,B3 indicate some of the few cells that were positive for MMP-9 but not for NeuN. In the striatal lesion the pattern of staining of MMP-9 detected in healthy tissue had been lost (Figure 2C1), and degenerating neurones still remaining

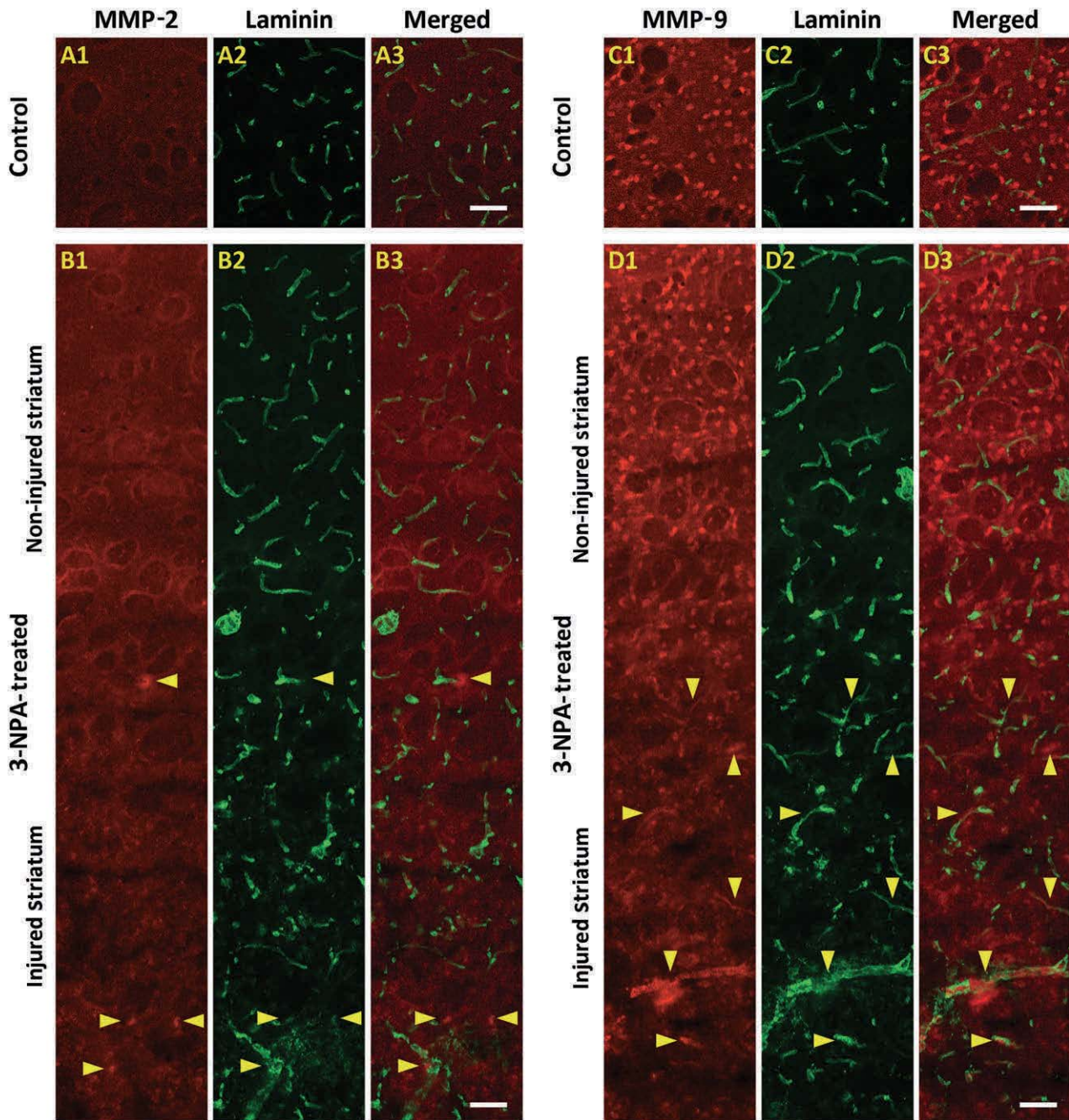


Figure 1. Expression of MMP-2 and MMP-9 in striata from brains of control and 3-NPA-treated rats. Representative images of colocalization of MMP-2 (A1–B3) and MMP-9 (C1–D3) stains with laminin stain of striata from brains of control (A1–A3 and C1–C3) and 3-NPA-treated rats (B1–B3 and D1–D3). In all cases, images were obtained from overlapping serial photographs. Images of 3-NPA-treated animals include a portion of the striatum in which non-injured and injured areas can be observed. MMP, matrix metalloproteinase; 3-NPA, 3-nitropropionic acid. Scale bars: 100 μ m.

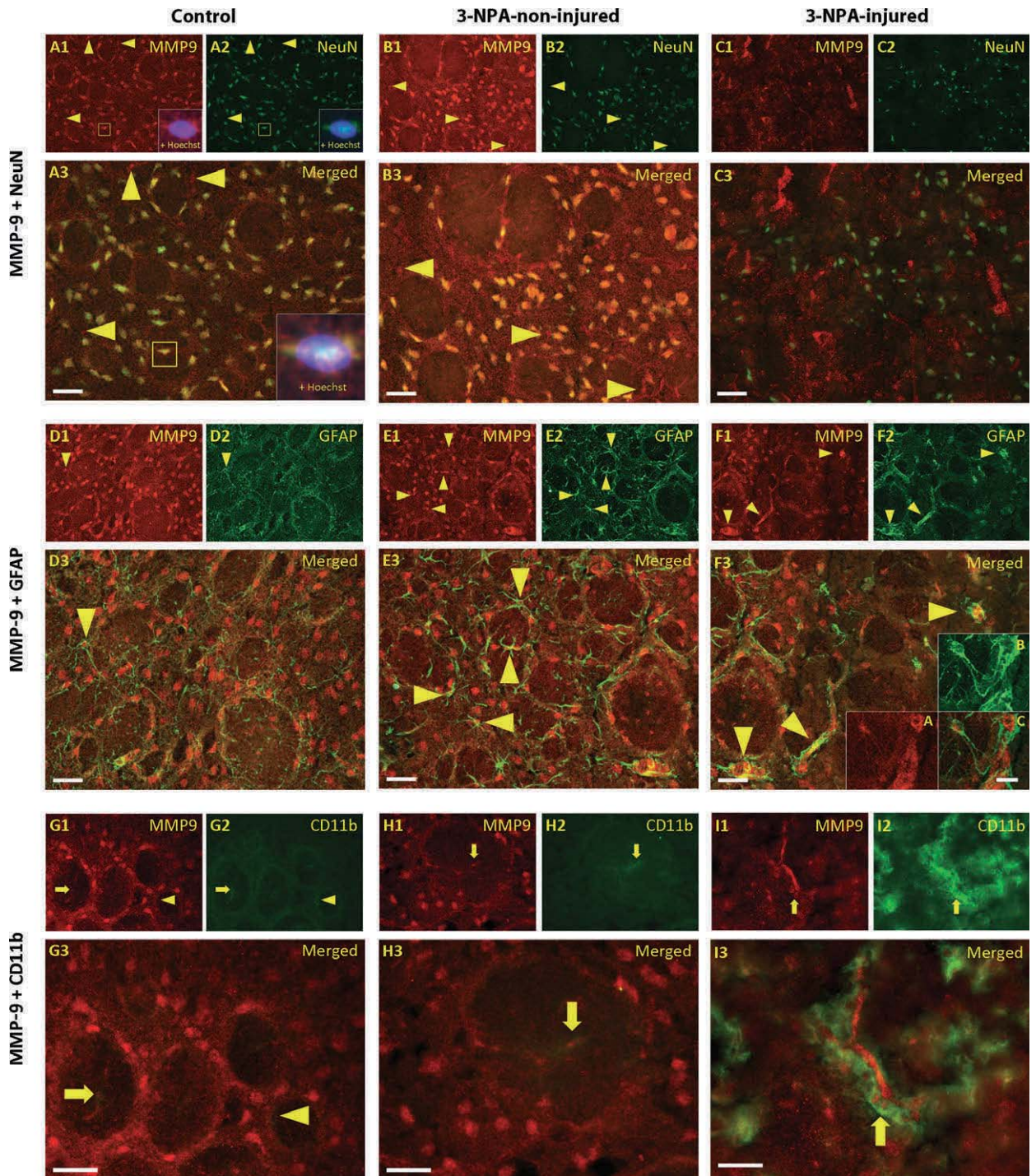


Figure 2. Expression of MMP-9 in neurons, astrocytes and microglia in striata from brains of control and 3-NPA-treated rats. Colocalization of MMP-9 and NeuN (A1–C3), GFAP (D1–F3) or CD11b (G1–I3) staining in striata with striata from representative brains of control (A1–A3, D1–D3 and G1–G3) and 3-NPA-treated rats (B1–C3, E1–F3 and H1–I3). Images corresponding to non-injured and injured areas of their striata are presented for 3-NPA-treated rats. Insets in A1–A3 show magnifications of an individual cell, which include Hoechst staining. Insets in F3 show the colocalization (C) of MMP-9 (A) and GFAP (B) staining of a region placed at the rim of the striatal lesion of a 3-NPA-treated rat, in which a MMP-9-positive astrocyte can be seen projecting towards a degraded blood vessel. MMP, matrix metalloproteinase; NeuN, neuronal antigen nuclei; GFAP, glial fibrillary acidic protein; 3-NPA, 3-nitropropionic acid. Scale bars: 50 μ m. Scale bar in inset C in F3: 10 μ m.

in the injured area were only weakly positive for MMP-9 (Figure 2C3). GFAP staining revealed a few astrocytes that were positive for MMP-9 in control rats (Figure 2D3, arrowhead). As shown in Figure 2E3, MMP-9-positive astrocytes were more abundant in the area of astrogliosis surrounding the striatal lesion of 3-NPA-treated animals (Figure 2E3, arrowheads). Finally, the digested blood vessels with MMP-9 staining located in the striatal injured area had residual GFAP staining that did not resemble astrocytes (Figure 2F3, arrowheads). Inset in Figure 2F3 shows an MMP-9-positive astrocyte located at the rim of the lesion, which appears to project towards a nearby degenerating MMP-9-positive blood vessel surrounded by GFAP staining. Microglial marker CD11b was poorly detected in control and in the non-injured areas of 3-NPA-treated rats (Figure 2G2,H2 respectively, arrows and arrowheads). In these areas, microglia had a morphology characterized by thin processes and small cell bodies, indicating that it was in a resting, inactivated state. Colocalization with MMP-9 staining showed that some of these microglial cells were slightly positive for MMP-9 in both areas (Figure 2G3,H3, arrows). In contrast, CD11b staining was strongly detected around the whole striatal lesion of 3-NPA-treated rats (Figure 2I2). In this area, microglial had short processes and evidence of cytoplasmic swelling, indicating that it was in a highly activated or reactive state. Colocalization with MMP-9 staining showed that many of the partially digested blood vessels with positive staining for the gelatinase that still remained in the lesion were abundantly surrounded by reactive microglia (Figure 2I3). Some of the microglial cells were positive for MMP-9 (Figure 2I3, arrows).

Once the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression had been studied, we subsequently performed *in situ* zymography in order to detect net gelatinolytic activity linked to active gelatinases in our samples. Gelatinolytic activity was observed as green fluorescence that resulted from the cleavage of gelatin, so heavily labelled with fluorescein that its fluorescence was quenched, into smaller highly fluorescent peptides. In control rats, gelatinolytic activity was found in a significant portion of striatal cells (Figure 3A). In 3-NPA-treated rats, the non-injured part of the striatum showed the same appearance as controls (Figure 3B) while, in the lesion, some structures that were reminiscent of blood vessels were positive for gelatinolytic activity (Figure 3C, arrowheads). Thus, to confirm that gelatinolytic activity was associated with digested blood vessels located in the striatal lesion, *in situ* zymography

was combined with laminin and EBA immunostaining. These experiments revealed that blood vessels in the striatum of control rats and those vessels located in the non-injured striatum of 3-NPA-treated animals did not exhibit gelatinolytic activity (Figure 3D3,F3). In contrast, most of the digested blood vessels in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats were associated with green fluorescence corresponding to gelatinolytic activity (Figure 3E3,G3). Gelatinolytic activity colocalized almost exactly with laminin staining (Figure 3E3, arrowheads), while it surrounded EBA staining (Figure 3G3, arrowheads), which suggests that the basal lamina of blood vessels was digested by gelatinolytic enzymes. These results established a direct link between the activity of gelatinolytic enzymes and the degradation of blood vessels in the injured striatal area of 3-NPA-treated rats.

Finally, the last set of experiments attempted to link gelatinolytic activity with the expression of MMP-9. To this end, on the one hand, we previously incubated our samples with the antibody used to detect MMP-9 in the immunohistochemical procedures, which recognizes the catalytic site of the protease, before performing *in situ* zymography in order to check whether gelatinolytic activity was inhibited. On the other hand, incubation with the antibody was performed after *in situ* zymography in order to colocalize gelatinolytic activity with MMP-9 expression. When immunohistochemistry of MMP-9 was performed after *in situ* zymography, gelatinolytic activity colocalized almost completely with MMP-9 immunostaining in cells located in the non-injured area of striatum of 3-NPA-treated rats (Figure 4A3). Moreover, in the striatal lesion, MMP-9 staining resembling blood vessels also colocalized with degraded gelatin (Figure 4B3). Both results suggested that the MMP-9 we had detected in our samples, or at least part of it, was in its active form. When incubation with anti-MMP-9 was performed prior to *in situ* zymography, gelatinolytic activity of cells located in the non-injured striatal area of 3-NPA-treated rats was partially inhibited (Figure 4C2). In the striatal lesion, gelatinolytic activity that resembled blood vessels was almost completely abolished (Figure 4D2) and thus, MMP-9 staining did not colocalize with green fluorescence due to digested gelatin in this case (Figure 4D3). One possible explanation for this would be that prior incubation with the anti-MMP-9 antibody is incompatible with *in situ* zymography, leading to the observed lack of gelatinolytic activity. However, it is shown in Figure 3E1,G1 that prior incubation with anti-EBA and anti-laminin antibodies did not

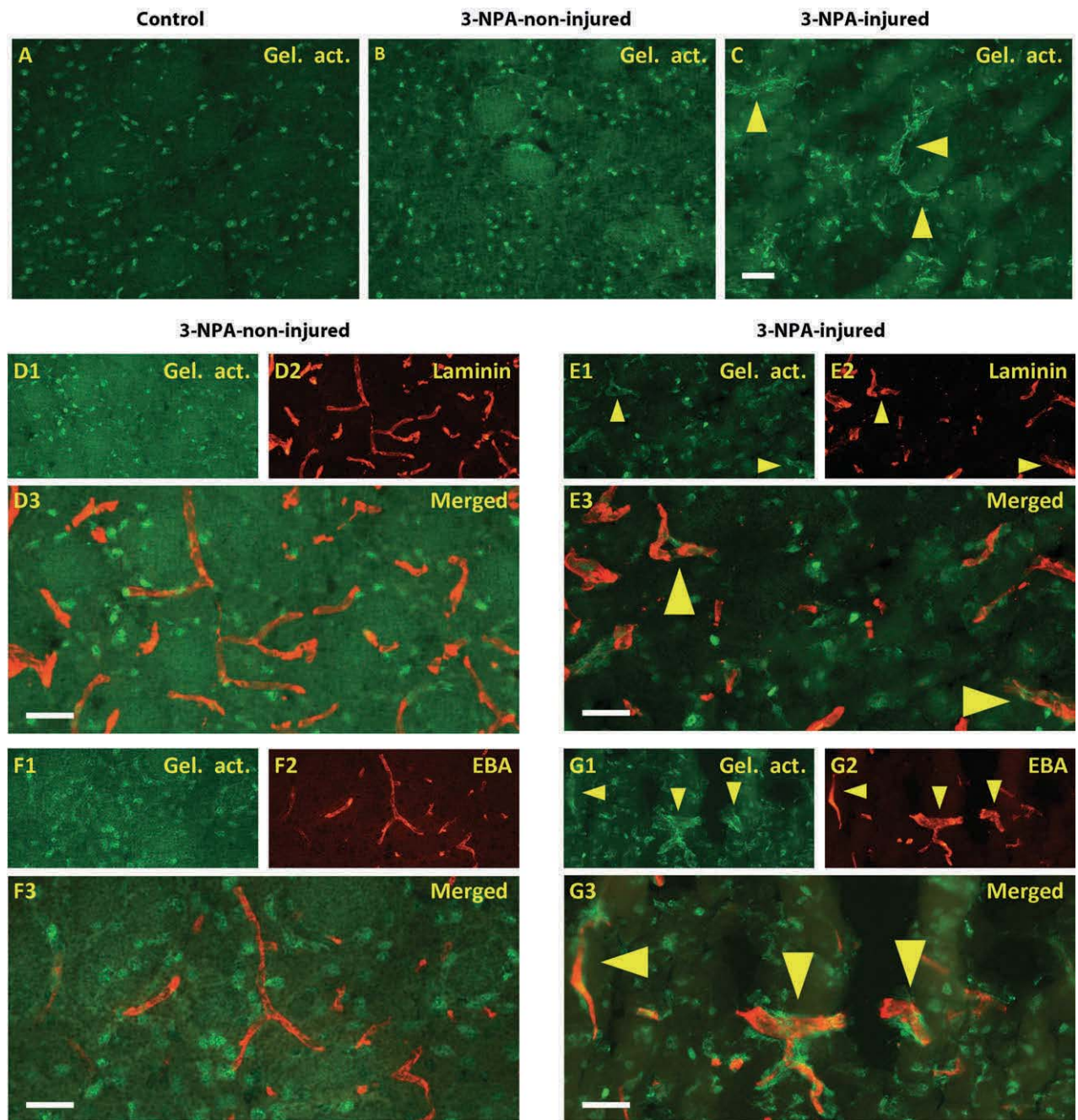


Figure 3. Detection of gelatinolytic activity by the *in situ* zymography study in striatal blood vessels identified by EBA and laminin stains. Representative images of gelatinolytic activity in striata from control (A) and 3-NPA-treated rats (B and C). In 3-NPA-treated animals, gelatinolytic activity was colocalized with laminin (D1–E3) and EBA (F1–G3) staining. Images corresponding to non-injured and injured areas of their striata are presented for 3-NPA-treated rats. 3-NPA, 3-nitropropionic acid; Gel. act., gelatinolytic activity; EBA, endothelial barrier antigen. Scale bars: 50 μ m.

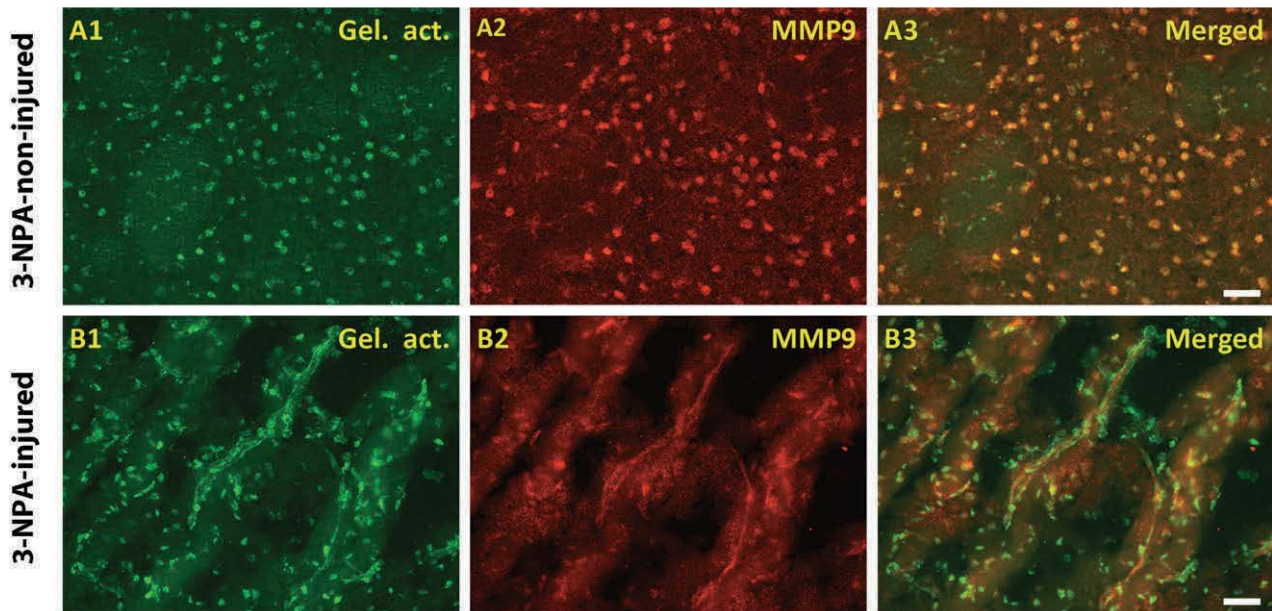
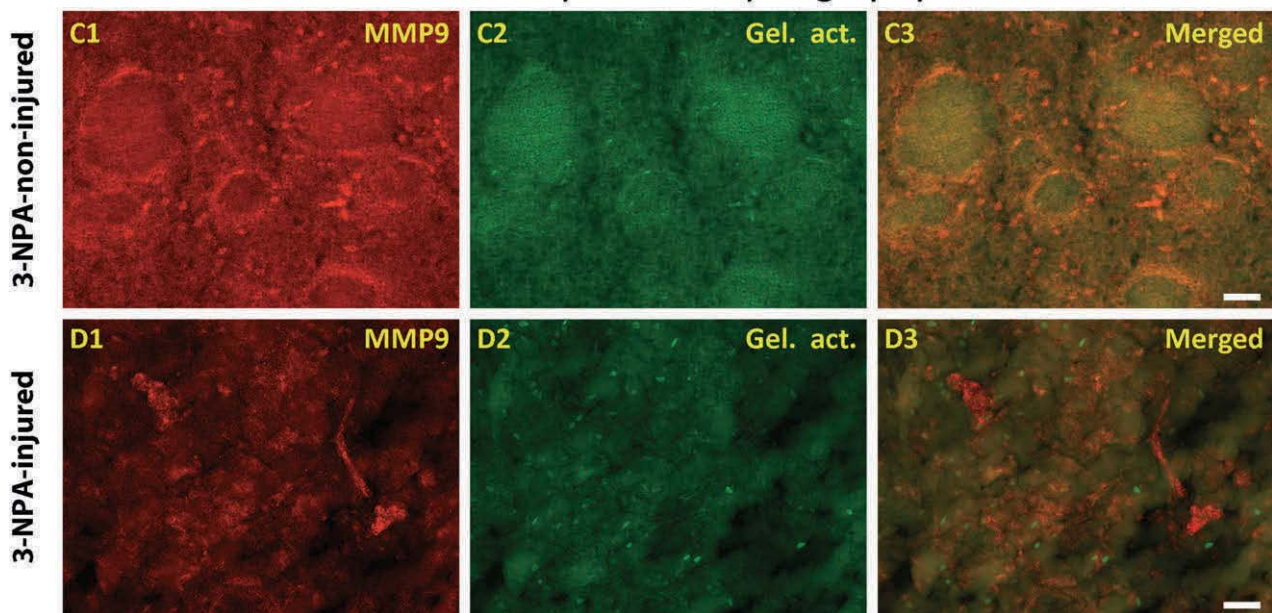
In situ zymography + MMP-9 immunohistochemistryMMP9 immunohistochemistry + *In situ* zymography

Figure 4. Study of gelatinolytic activity by *in situ* zymography performed before and after MMP-9 immunostaining. Colocalization of representative images of MMP-9 staining (A2, B2, C1 and D1) and gelatinolytic activity detected in the *in situ* zymography study (A1, B1, C2 and D2) in 3-NPA-treated rats. In A1–B3, incubation with anti-MMP-9 antibody was performed after *in situ* zymography. In C1–D3, incubation with the antibody was prior to gelatinolytic activity detection. In both cases, images corresponding to non-injured and injured striatal areas are presented. MMP, matrix metalloproteinase; 3-NPA, 3-nitropropionic acid; Gel. act., gelatinolytic activity. Scale bars: 50 μ m.

affect this technique, indicating that inhibition of gelatinolysis was due to the specific interaction of the antibody with the catalytic site of MMP-9. Thus, these results indicate that MMP-9 was mainly responsible for degradation of blood vessels in the striatal lesion of 3-NPA-treated rats.

Discussion

Matrix metalloproteinase-2 and MMP-9 have been extensively studied in the CNS because of their role in neurological disorders and the fact that they are relatively easily to detect and measure by zymography. We examined their possible involvement in the increase of BBB permeability associated with the degradation of striatal blood vessels induced by 3-NPA in rats. The injury includes severe alterations of the basal lamina, ZO-1, a constituent protein of tight junctions, and epithelium, which was described in our previous study [15]. The results of the present study show that MMP-9 was constitutively expressed in neurones and some astrocytes of the striatum of control rats, but not in blood vessels. In contrast, MMP-2 was hardly detected in the same animals. This result is inconsistent with other reports in which zymographic studies indicate that, in brains from mice [21] and rats [31,32], MMP-2 is more abundant than MMP-9. We found only one report in which activation of MMPs after 3-NPA administration was examined [13]. In that study, in which CD-1 mice were used and 3-NPA was administered intrastrially, low levels of both MMPs were also detected by zymography in control animals, but MMP-2 was again more abundant than MMP-9. Nevertheless, other studies in which basal levels of both proteases were analysed in control rats by immunohistochemistry support our findings, as MMP-9 was detected in hippocampal neurones [16] and very low levels of MMP-2 were detected in the non-ischaemic hemisphere of a model of focal ischaemia [19]. Besides, MMP-9 is expressed in physiological conditions by adult brain neurones and is involved in neuronal plasticity [17] and tissue repair [33], which could explain the constitutive MMP-9 we detected in striatal neurones of our control rats.

Matrix metalloproteinase-9 was abundant in degraded blood vessels in the injured area of the striatum of 3-NPA-treated rats. MMP-9 staining colocalized with laminin staining, suggesting that the protease was mainly located in the basal lamina of blood vessels. *In situ* zymography experiments revealed net gelatinolytic activity in injured blood vessels that colocalized with laminin and surrounded EBA stains, suggesting that active gelatinases

accumulated in their basal lamina rather than in their epithelium. This gelatinolytic activity was almost completely inhibited when brain sections subjected to *in situ* zymography were previously incubated with the anti-MMP-9 antibody, which blocked the catalytic site of the protease. If the same antibody was incubated after the zymography, both stains were colocalized. These findings indicate that MMP-9 was the main protease responsible for the degradation of the basal lamina of blood vessels affected by 3-NPA treatment. It could thus play a prominent role in BBB disruption. However, as this study was based on immunohistochemistry, we could not establish whether the degradation of blood vessels was linked to a net increase in the amount of the active, inactive or both forms of MMP-9. In spite of this limitation, our results are consistent with the findings reported in several models of CNS pathologies such as focal ischaemia with reperfusion [19,21,31,34], global forebrain ischaemia [16], spinal cord injury [20] and neurodegeneration linked to excitotoxicity induced by the systemic administration of kainic acid [32], in which, after the cerebral insult, a significant increase in MMP-9 activity was detected. Moreover, the use of MMP inhibitors together with the determination of MMP-9 levels allowed some of these authors to establish correlations between the expression of the protease and increases in vascular permeability, measured by Evans blue extravasation, which is indicative of BBB disruption [19–21]. The increase in BBB permeability associated with the activity of MMP-9 may be mediated by its ability to concomitantly digest basal lamina and proteins of the tight junctions between endothelial cells such as claudin-5 and occludin [19] and ZO-1 [35]. Indeed, it has been hypothesized that whenever BBB is affected, MMP-9 is a key factor in the injury [36]. In models of focal transient ischaemia, an early reversible and a later irreversible opening of BBB have been described [19]. The former may be mediated by the activation of constituent MMP-2, while the latter may be related to the activity of MMP-9, as prior activation of MMP-2 had ceased. In our case, the rats were killed 4 days after the administration of 3-NPA, when a large lesion in the striatum can be detected. According to what is reported for transient focal ischaemia, we would expect to find activation of MMP-2 along the rim of the lesion, where it is starting to develop. As no positive staining for MMP-2 was detected there, we conclude that MMP-2 does not play a significant role in the vascular pathology induced by 3-NPA, a role that seems to belong basically to MMP-9. In any case, we can

only speculate as to whether MMP-2 contributes in the process of degradation later, as it has also been described in focal ischaemia by others [31]. Moreover, our results are consistent with what was reported by [13]. In their 3-NPA model, they detected the active form of MMP-9 after the administration of the toxin, and concluded that it was responsible for the BBB disruption and subsequent damage in their model. However, they also detected increases in proforms of both proteases, which is inconsistent with the poor detection of MMP-2 obtained in our samples.

Constitutive expression of MMP-9 detected in striatal neurones from control rats suggests a neuronal origin for the MMP-9 found in the injured blood vessels of the lesion induced by 3-NPA. Supporting this, it has been reported that MMP-9 is mainly secreted by neurones in the CNS, as they are the main source of the gelatinase [31,37]. Furthermore, MMP-9 production in neurones may be induced by stress, for instance, in response to excitotoxins such as kainic acid [32]. In 3-NPA-treated rats, we detected MMP-9-positive reactive astrocytes in the area of astrogliosis surrounding the striatal lesion, which in some cases seemed to interact with the degenerate vessels. MMP-9 secretion from these astrocytes may contribute to the vascular degradation, but the opposite cannot be ruled out, as it has been postulated that the glial scar formed mainly by reactive astrocytes after brain injury may play an active role in repairing the BBB [38,39]. MMP-9-positive partially digested blood vessels that still remained in the lesion induced by 3-NPA administration were abundantly surrounded by reactive microglia. In their reactive state, microglia secrete a wide range of products involved in immunologic and inflammatory processes, among which MMP-9 is found [40]. In our case, some of the microglial cells located next to MMP-9-positive degraded blood vessels had, although slightly, positive staining for the gelatinase, a fact that makes us attribute to them a limited role in MMP-9 secretion. In partially digested blood vessels in the injured area of the striatum, endothelial cells, stained with anti-EBA antibody, showed gelatinolytic activity. As in partially digested blood vessels gelatinolytic activity colocalized with MMP-9 staining, we assume that endothelial cells are another source of MMP-9. Supporting this, it has been reported that endothelial cells secrete MMP-9 in response to angiogenic factors or inflammatory mediators, but not constitutively [41,42]. In our case, the fact that degrading blood vessels were sur-

rounded by reactive microglia, which releases angiogenic and inflammatory substances such as cytokines [40], reinforces this possibility.

In conclusion, our results highlight the prominent role played by MMP-9 in the BBB disruption linked to degradation of blood vessels in the striatal injury induced by 3-NPA. Growing evidence implicates MMPs in the main neurodegenerative disorders [36] and also in HD, in which MMP-9 has been found to be upregulated in *post-mortem* brains of patients [43]. Thus, a more detailed examination of the relative contribution of MMPs may provide a deeper understanding of these diseases and lead to the development of new therapeutic strategies for their treatment.

Acknowledgements

This study was supported by grants BFU/2009-08352 and SAF2009-13093 from Spain's 'Ministerio de Educación y Ciencia', PIO80400 from the Spain's 'Instituto de Salud Carlos III' (FEDERFOUND) and 610RT0405 from the 'Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo' (CYTED). We would like to thank the 'Generalitat de Catalunya' for supporting the research group (2009/SGR00853).

References

- 1 Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 2005; **95**: 1521–40
- 2 Alston TA, Mela L, Bright HJ. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 3767–71
- 3 Glass M, Dragunow M, Faull RL. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 2000; **97**: 505–19
- 4 Lee WT, Chang C. Magnetic resonance imaging and spectroscopy in assessing 3-nitropropionic acid-induced brain lesions: an animal model of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2004; **72**: 87–110
- 5 Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 2008; **27**: 2803–20
- 6 Benchoua A, Trioulier Y, Diguet E, Malgorn C, Gaillard MC, Dufour N, Elalouf JM, Krajewski S, Hantraye P, Déglon N, Brouillet E. Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 1446–56

- 7 Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 1999; **59**: 427–68
- 8 Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; **1**: 223–36
- 9 Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008; **57**: 178–201
- 10 Hamilton BF, Gould DH. Correlation of morphologic brain lesions with physiologic alterations and blood-brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol* 1987; **74**: 67–74
- 11 Nishino H, Shimano Y, Kumazaki M, Sakurai T. Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 1995; **186**: 161–4
- 12 Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawa S, Inubushi T. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci Res* 1997; **27**: 343–55
- 13 Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* 2003; **23**: 8733–42
- 14 Sato S, Gobbel GT, Li Y, Kondo T, Murakami K, Sato M, Hasegawa K, Copin JC, Honkaniemi J, Sharp FR, Chan PH. Blood-brain barrier disruption, HSP70 expression and apoptosis due to 3-nitropropionic acid, a mitochondrial toxin. *Acta Neurochir Suppl* 1997; **70**: 237–9
- 15 Duran-Vilaregut J, del Valle J, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. Blood-brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Neurotoxicology* 2009; **30**: 136–43
- 16 Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatisky M. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 19–32
- 17 Michaluk P, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 1255–8
- 18 Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2572–9
- 19 Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; **27**: 697–709
- 20 Yu F, Kamada H, Niizuma K, Endo H, Chan PH. Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2008; **25**: 184–95
- 21 Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 1393–400
- 22 Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, Martínez N, López-Costa JJ, González E. Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the fetoplacental unit of diabetic rats. *Free Radic Res* 2005; **39**: 1285–93
- 23 Cucullo L, Couraud PO, Weksler B, Romero IA, Hossain M, Rapp E, Janigro D. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; **28**: 312–28
- 24 Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 2007; **101**: 566–76
- 25 Páez MC, González MJ, Serrano NC, Shoenfeld Y, Anaya JM. Physiological and pathological implications of laminins: from the gene to the protein. *Autoimmunity* 2007; **40**: 83–94
- 26 Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992; **116**: 201–11
- 27 Bignami A, Dahl D. Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J Histochem Cytochem* 1977; **25**: 466–9
- 28 Roy A, Fung YK, Liu X, Pahan K. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem* 2006; **281**: 14971–80
- 29 Sternberger NH, Sternberger LA. Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 8169–73
- 30 Sternberger NH, Sternberger LA, Kies MW, Shear CR. Cell surface endothelial proteins altered in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1989; **21**: 241–8
- 31 Planas AM, Solé S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2001; **8**: 834–46
- 32 Zhang JW, Deb S, Gottschall PE. Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur J Neurosci* 1998; **10**: 3358–68

- 33 Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**: 931–44
- 34 Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 1020–8
- 35 Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; **21**: 7724–32
- 36 Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 2009; **8**: 205–16
- 37 Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, Miller CA, Atkinson RD, Tökés ZA. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurochem* 1996; **67**: 251–9
- 38 Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostensfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999; **23**: 297–308
- 39 Copin JC, Gasche Y. Matrix metalloproteinase-9 deficiency has no effect on glial scar formation after transient focal cerebral ischemia in mouse. *Brain Res* 2007; **1150**: 167–73
- 40 Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 942–64
- 41 Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 1993; **296**: 803–9
- 42 Jackson CJ, Nguyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 1167–77
- 43 Silvestroni A, Faull RL, Strand AD, Möller T. Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *Neuroreport* 2009; **20**: 1098–103

Received 21 September 2010

Accepted after revision 13 December 2010

Published online Article Accepted on 22 December 2010

IV. DISCUSSIÓ

1. REACTIVACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR EN EL MODEL DEL 3-NPA.

Les neurones postmitòtiques diferenciades no experimenten divisió cel·lular al llarg de la seva vida. Tot i això, un gran nombre d'estudis han posat de manifest que aquestes cèl·lules retenen la capacitat de reactivar el seu cicle cel·lular en situacions de patologia del SNC, fet que s'ha vist que no és mitogènic, sinó que porta a la mort de la neurona afectada (Yang i Herrup, 2007). Aquests estudis han detectat l'expressió anormal de proteïnes del cicle cel·lular en diverses malalties neurodegeneratives com la MA, la MP o l'ELA (Nunomura i col., 2007; Wang i col., 2009; Woods i col., 2007) i altres desordres neurològics com la malaltia de Pick, la síndrome de Down i l'AVC (Camins i col., 2006). D'aquesta manera, l'activació a les neurones dels complexos de les CDK amb les seves corresponents ciclines activadores i l'expressió del factor de transcripció E2F1 fan pensar en la reactivació del seu cicle cel·lular com a possible mecanisme involucrat a la neurodegeneració observada en aquestes malalties (Krantic i col., 2005). La reactivació del cicle cel·lular associada a la mort neuronal també s'ha detectat en diversos models de malalties neurodegeneratives induïts per l'administració de neurotoxines com l'àcid kaïníc, models d'AVC, el model de la MP induït mitjançant l'administració de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o el model superòxid dismutasa-1 d'ELA en ratolí (Höglinger i col., 2007; Nguyen i col., 2003; Verdaguer i col., 2003), així com en neurones sotmeses a estímuls apoptòtics com la privació de potassi (Yeste-Velasco i col., 2007) i el tractament amb el pèptid A β (Majd i col., 2008) o amb camptotecina (Park i col., 2000a).

D'acord amb les evidències que relacionen la reactivació del cicle cel·lular amb la mort neuronal, en el primer objectiu d'aquest treball s'ha volgut estudiar la implicació d'aquest procés en la neurodegeneració estriatal associada a l'acció del 3-NPA. El model experimental utilitzat es va desenvolupar en rates SD mitjançant una pauta d'administració, recollida a la bibliografia i classificada com a subaguda (Brouillet i col., 2005), consistent en la injecció per via intraperitoneal d'una dosi de 20 mg/kg de 3-NPA durant tres dies consecutius, amb sacrifici quatre dies després de l'última administració. D'acord amb el que ja s'havia publicat anteriorment (Brouillet i col., 1999), aquest tractament va produir una lesió severa a la part dorsolateral del cos estriat dels animals tractats. Està descrit, a més a més, que aquesta lesió s'origina de forma focalitzada i s'extén progressivament per tot l'estriat (Nishino i col., 1995, 1997). A partir d'això, des d'un bon principi es va assumir que, tot i que la grandària de la lesió depenia del temps, les neurones de la vora de la lesió eren aquelles que estaven patint el procés de neurodegeneració, mentre que en el centre de la lesió hi havia les que es trobaven en els estadis finals del procés. A partir d'aquí, en el cos estriat de

les rates tractades amb 3-NPA es van definir tres zones: la zona estriatal no lesionada, en la qual les neurones presentaven la mateixa morfologia que l'observada en els animals control; la vora de la lesió, en la qual les neurones començaven a mostrar alteracions morfològiques; i finalment el centre de la lesió, en el qual les neurones estaven en el seu estadi final de degeneració.

Inicialment, la primera tasca que es va dur a terme dins d'aquest objectiu va ser la d'avaluar l'expressió de les proteïnes de la fase G1 del cicle, en concret els complexos CyD-CDK4 i CyE-CDK2, juntament amb la del factor de transcripció E2F1, en el cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA, donat que hom pensa que l'entrada a la fase G1-S del cicle cel·lular té un paper destacat a l'apoptosi neuronal (Becker i Bonni, 2004; Wang i col., 2009). L'estudi immunohistoquímic d'aquestes proteïnes va mostrar un augment de la seva expressió principalment al centre de l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA, augment que va ser especialment destacable en el cas de la CDK4. Seguidament, el marcatge de CDK4 es va superposar amb el corresponent al de NeuN, que s'utilitza per identificar les neurones, i es va comprovar que totes les cèl·lules que expressaven CDK4 eren a la vegada positives per NeuN. A la lesió, com ja ha estat descrit per altres autors (Túnez i col., 2006) les neurones presentaven picnosi, ja que exhibien un marcatge de NeuN més intens, un encongiment i una morfologia irregular. Finalment, el marcatge de CDK4 es va superposar amb el de CyD, la seva ciclina activadora, i es va veure que totes les cèl·lules positives per a la CDK4 ho eren també per a la CyD. Així, aquests resultats van permetre concloure que l'activació de cicle cel·lular en forma d'augment en l'expressió de les proteïnes reguladores de la seva fase G1 podia ser un mecanisme desencadenant de la degeneració de les neurones estriatals induïda per l'administració de 3-NPA. L'augment de l'expressió de proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular, en concret la CyD i l'E2F1, també es va detectar en mostres *post mortem* de cervells de pacients afectats per la MH, de manera que es va suggerir que aquest mecanisme podia estar implicat en el desenvolupament de la neurodegeneració observada a l'esmentada malaltia. Cal remarcar que tant a l'escorça de les rates control i tractades com al cos estriat de les controls i a les zones no lesionades del cos estriat de les tractades es va detectar un lleuger marcatge de totes les proteïnes estudiades excepte l'E2F1, que en tots els casos era molt menys intens que l'observat a la lesió estriatal. Aquest fet ja ha estat descrit en altres treballs (Schmetsdorf i col., 2007), i indica que aquestes proteïnes podrien tenir funcions diferents a les de regular el cicle cel·lular que podrien estar relacionades amb la plasticitat i l'estabilitat neuronals (Schmetsdorf i col., 2007) o amb la reparació de l'ADN (Schwartz i col., 2007).

La conclusió a la que es va arribar amb aquest primer treball estava d'acord amb el que havien afirmat altres estudis en els que s'havia investigat el paper del cicle cel·lular en la neurotoxicitat associada al 3-NPA. En un d'ells, es va comprovar que el flavopiridol, que és una molècula inhibidora de les CDK, bloquejava, a nivell de cultiu cel·lular, la mort de neurones corticals exposades a la toxina (Park i col., 2000b). Més recentment, es va veure en neurones estriatals que, tant a nivell *in vitro* com *in vivo*, el 3-NPA reduïa el nivell de p27, proteïna que inhibeix les CDK de la fase G1-S, i induïa la fosforilació de pRb, fet que feia pensar que hi havia una activació del cicle cel·lular en aquestes neurones (Akashiba i col., 2008). Un aspecte a tenir en compte d'aquests dos treballs, però, és que no van estudiar directament les proteïnes reguladores del cicle cel·lular, sinó que van considerar o bé inhibidors de la progressió del cicle, o bé dianes d'aquestes com la pRb, proteïna que és fosforilada pels complexos actius CyD-CDK4 o CyD-CDK6 però que també pot ser-ho per altres quinases (Inoue i col., 2007). A més a més, cal destacar que el flavopiridol no és específic de les CDK mitòtiques, sinó que també en pot inhibir d'altres no mitòtiques com la CDK5 i, a més a més, altres quinases que no estan relacionades amb les primeres, com la GSK3 β (Leclerc i col., 2001; Rashidian i col., 2007).

El primer treball d'aquesta tesi, doncs, va permetre establir que l'administració de 3-NPA provocava la presència de proteïnes de la fase G1-S del cicle cel·lular a l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades, i que per tant hi podia haver una activació del cicle que podria estar relacionada amb la degeneració neuronal produïda per la toxina.

A continuació, en el següent treball, es va estudiar la degeneració experimentada per les neurones estriatals després del tractament amb 3-NPA. Dins dels diversos mecanismes que condueixen a la mort cel·lular, es va considerar el d'apoptosi, donat que es creu que és el procés que la reactivació del cicle cel·lular posaria en marxa en neurones (Becker i Bonni, 2004; Wang i col., 2009). L'apoptosi es va estudiar mitjançant el marcatge de la forma activa de la caspasa-3, proteasa efectora que intervé a la fase final del procés, i el TUNEL. Aquest últim és un marcatge que s'ha utilitzat àmpliament per detectar l'apoptosi (Gavrieli i col., 1992) donat que detecta dany irreversible de l'ADN, el qual es produeix a les etapes finals del procés degeneratiu. Els resultats van mostrar que, pel que feia a neurones, les úniques que expressaven la forma activa de la caspasa-3 eren les que estaven en procés de degeneració a la lesió estriatal induïda pel 3-NPA. Dins de la lesió, aquestes neurones es trobaven principalment a la seva vora en contacte amb la zona no lesionada de l'estriat, i al centre de la lesió pràcticament no se'n detectaven. D'altra banda, els astròcits de l'àrea no lesionada del cos estriat i de l'escorça de les rates tractades, així com els del cos estriat i l'escorça de les control, presentaven marcatge positiu de caspasa-3 activa als seus cossos

cel·lulars. Pel que fa al marcatge TUNEL, aquest només es va detectar a l'àrea lesionada del cos estriat dels animals tractats amb 3-NPA, sobretot en neurones en procés de degeneració situades a la vora de la lesió. No es va observar marcatge TUNEL a l'escorça o al cos estriat de les rates control, ni tampoc a l'escorça i a l'àrea del cos estriat no afectada per la toxina dels animals tractats.

S'ha de considerar que el model del 3-NPA *in vivo* s'ha desenvolupat utilitzant dos tipus d'administració sistèmica, els quals han donat lloc a l'existència de models experimentals aguts o subaguts i crònics (Brouillet i col., 2005). Els primers s'obtenen per injecció intraperitoneal de diverses quantitats de toxina, mentre que pels segons s'utilitzen bombes implantades a nivell subcutani. En ambdós casos, s'ha descrit que les lesions produïdes al cos estriat dels animals tractats eren similars a les observades en els pacients de la MH (Brouillet i col., 1999; Yang i col., 2004). Ara bé, s'han trobat diferències a nivell dels mecanismes moleculars implicats en la neurodegeneració induïda per la toxina segons el mètode d'administració utilitzat. Així, dins dels models aguts o subaguts, en els que la inhibició del CCRM II és transitòria, hi ha activació de la caspasa-3, fet que no passa en els models crònics, en els que la inhibició del CCRM II és sostinguda en el temps. L'administració intraperitoneal d'una dosi de 30 mg/kg de 3-NPA a rates SD (Duan i col., 2000) o dues dosis de 50 mg/kg separades per 90 minuts a rates Lewis (Bizat i col., 2003a), va comportar, en ambdós casos, un augment dels nivells de la forma activa de la caspasa-3 i l'aparició de fragmentació de l'ADN al cos estriat dels cervells de les rates tractades respecte de les control. A més a més, l'administració intraperitoneal a rates Wistar de dues dosis de 15 mg/kg en dos dies consecutius va induir un augment lleuger i transitori de la forma activa de la proteasa onze hores després de la segona administració (Del Río i Massieu, 2008). D'altra banda, es va veure que l'administració crònica del 3-NPA mitjançant bombes implantades mantenia a nivells basals l'activació de la caspasa-3 (Bizat i col., 2003a) o fins i tot la feia disminuir (Bizat i col., 2003b), i induïa l'activació de la calpaïna (Bizat i col., 2003a, 2003b), proteasa que s'associa amb processos de necrosi (Wang, 2000). Tot això, juntament amb el posterior descobriment de la capacitat que té la calpaïna de degradar la forma activa de la caspasa-3, van fer pensar que aquesta última proteasa no jugava cap paper a la neurotoxicitat induïda per 3-NPA administrat de forma crònica. Més endavant es va veure, però, que l'administració sistèmica d'un inhibidor de caspases actives d'ampli espectre era capaç d'atenuar la toxicitat del 3-NPA en un model d'administració crònica similar als anteriors (Yang i col., 2004).

Els estudis *in vivo* comentats anteriorment es van dur a terme mitjançant tècniques com el Western-blot o l'assaig de l'activitat proteolítica, de manera que no es va investigar quines

cèl·lules eren les que experimentaven l'increment dels nivells de caspasa-3 activa o de calpaïna. Pel que fa al present treball, els resultats confirmen, en neurones del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA, l'activació de la caspasa-3 associada a la inhibició transitòria del CCRM II, fet que ja havia estat descrit en altres models en els que el 3-NPA s'havia administrat de forma intraperitoneal (Bizat i col., 2003a; Duan i col., 2000). A més a més, en aquest treball també s'ha vist que els astròcits expressen de forma constitutiva la forma activa de la caspasa-3. Els astròcits també es veuen afectats per la toxina, ja que el marcatge de GFAP amb el que es van identificar només es detectava de forma residual a la zona central de la lesió del cos estriat dels animals tractats, fet que feia palesa la seva degradació. Cal destacar que aquesta degradació anava acompanyada de la pèrdua del marcatge de la forma activa de la caspasa-3. Això podria explicar en part el fet que, en els models en els que el 3-NPA és administrat de forma crònica, s'hagi trobat, mitjançant Western-blot o assaigs d'activitat proteolítica, que la caspasa-3 activa es manté al nivell de la detectada als animals control o fins i tot per sota. Així, aquestes tècniques no podrien detectar l'augment de caspasa-3 activa en neurones, ja que aquest augment es veuria contrarestat per la disminució de la forma activa de la proteasa associada a la degradació dels astròcits. Per tant, no es podria descartar que en els models amb administració crònica del 3-NPA, l'activació de la caspasa-3 jugui un paper en la neurodegeneració estriatal que s'hi observa.

Un aspecte a destacar és que les neurones en procés de degradació a l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA mostraven diversos patrons de marcatge. Les més abundants eren les positives per a la caspasa-3 activa i amb marcatge TUNEL a la vegada, les quals estarien experimentant un procés d'apoptosi clàssica, donat que està establert que aquests dos marcatges, realitzats de forma simultània, són una eina adequada per identificar aquest procés de mort cel·lular programada (Lei i col., 2004). A zones més centrals de la lesió, també es van detectar neurones amb caspasa-3 activa però que no mostraven marcatge TUNEL. Una possibilitat era que, en aquestes cèl·lules, el procés apoptòtic s'hagués aturat abans de que hi hagués la fragmentació de l'ADN. Així, per exemple, s'ha vist que la survivina, que és una proteïna que té la capacitat d'inhibir l'activitat, però no l'activació, de la caspasa-3 (Tamm i col., 1998), exhibia un patró d'expressió paral·lel a aquesta al cervell de rates sotmeses a un traumatisme cerebral (Johnson i col., 2005). Una altra possibilitat era que en aquestes neurones ja s'hagués culminat la degradació de l'ADN, i que la caspasa-3 activa estigués intervenint en l'etapa final de l'apoptosi, en la que es formen els cossos apoptòtics que seran degradats per fagocitosi (Taylor i col., 2008). Finalment, un altre grup de neurones situades sobretot a la vora de la lesió estriatal només tenien marcatge TUNEL, i això semblava indicar que podien estar

experimentant un procés d'apoptosi independent de caspases. Anteriorment, en un treball realitzat amb un cultiu de neurones corticals (Almeida i col., 2006), es va veure que part de la mort ocasionada per l'exposició al 3-NPA era mediada per l'alliberació d'AIF.

Pel que fa als astròcits, els de l'escorça i el cos estriat de les rates control i els de l'escorça i les àrees no lesionades del cos estriat de les tractades amb 3-NPA mostraven marcatge de la forma activa de la caspasa-3 als seus cossos cel·lulars. Tot i que habitualment se la relaciona amb l'apoptosi, cada vegada hi ha més evidències que relacionen la caspasa-3 amb processos que no tenen res a veure amb aquesta, com la remodelació sinàptica o la neuroprotecció (McLaughlin, 2004; Schwerk i Schulze-Osthoff, 2003). A més a més, sembla que hi ha una relació entre aquesta proteasa i la glia constitutiva. La forma activa de la caspasa-3 s'ha detectat al nucli de la glia de Bergmann i a altres poblacions d'astròcits de l'hipocamp i de la medulla espinal de rates adultes de diferents soques, sense que aparentment hi estigués desenvolupant cap funció relacionada amb l'apoptosi (Noyan-Ashraf i col., 2005). Aquests autors van suggerir que la proteasa podria tenir la funció de processar factors de transcripció com algun dels membres de la família FOXO, els quals tenen un punt de tall conservat per a la caspasa-3 (Charvet i col., 2003). Un estudi posterior realitzat amb cultius de glia de Bergmann va suggerir la possibilitat que la caspasa-3 actués com a inductor i factor de manteniment de la diferenciació d'aquest tipus de cèl·lules (Oomman i col., 2006). D'altra banda, un paradigma de dany excitotòxic cortical aplicat a rates nounades va posar de manifest que la caspasa-3 detectada era en gran part astrocítica (Acarin i col., 2007). A la vegada, els astròcits eren TUNEL negatius, i es va suggerir que la proteasa participava a la remodelació del seu citoesquelet. Cal destacar que als cervells dels animals control i dels perfosos amb solució salina també es van detectar astròcits amb caspasa-3 activa, en concret al cingol del seu cos callós. D'acord amb aquesta evidència, els resultats obtinguts en el present treball indicaven que la forma activa de la caspasa-3 es troba present de forma constitutiva als astròcits del cos estriat i a l'escorça del cervell de les rates sense que tingui una funció apoptòtica.

Després de comprovar que el tractament amb 3-NPA induïa el procés d'apoptosi en algunes de les neurones situades a l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades, al tercer treball es va investigar si les neurones apoptòtiques eren les que, a la vegada, expressaven marcadors de la fase G1 del cicle cel·lular. Com a marcador de l'apoptosi neuronal es va utilitzar el marcatge de TUNEL, mentre que els marcadors de la fase G1 considerats van ser la CDK4 i la CyD. A més a més, es va analitzar el perfil d'expressió de dues proteïnes addicionals, la pRb i la Ki67, relacionades amb la progressió del cicle cel·lular. La primera és una proteïna nuclear regulada per fosforilació dependent de CDK que intervé en la regulació

de gens necessaris per a la progressió del cicle, mentre que la Ki67 és una proteïna que s'utilitza com a marcador de la proliferació cel·lular, donat que s'expressa en totes les etapes actives del cicle i no es troba a les cèl·lules en repòs (Schlüter i col., 1993).

La CDK4 i la CyD han rebut una atenció especial com a elements relacionats amb el procés apoptòtic. L'augment dels seus nivells s'ha detectat en nombrosos models *in vitro* de mort neuronal com el de retirada de factors tròfics (Freeman i col., 1994), el de privació de glucosa i oxigen (Katchanov i col., 2001), el d'excitotoxicitat mediada per àcid kaïníc (Giardina i col., 1998; Ino i Chiba, 2001; Verdaguer i col., 2002) i el de neurotoxicitat mediada per agregats de pèptid A β (Copani i col., 1999); a nivell *in vivo* també s'ha detectat en models d'isquèmia i de dany de la medul·la espinal (Rashidian i col., 2007). A més a més, diverses estratègies com la utilització de inhibidors de CDK com la olomucina, la roscovitina o el flavopiridol, formes dominants negatives de la CDK4 o oligonucleòtids antisentit contra CDK4 i CyD, entre d'altres, han demostrat ser protectores a diversos paradigmes de mort neuronal, i han aportat, per tant, evidència indirecta de la relació d'ambdues proteïnes amb la mort neuronal (Greene i col., 2007; Rashidian i col., 2007). Per contra, els resultats obtinguts en aquest treball mostren que les neurones en procés de degeneració presents al cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA positives pel marcatge de TUNEL, que principalment es troben a la vora de la lesió, no expressaven ni CDK4 ni CyD. Les neurones positives per aquestes dues proteïnes del cicle cel·lular es trobaven, en general, a les àrees més internes de la lesió estriatal. Cal destacar que el seu marcatge de NeuN era més dèbil que el de les neurones positives per a TUNEL i que, a diferència d'aquestes últimes, que en major o menor grau sempre tenien marcatge de Hoechst, les neurones de les zones més internes de la lesió amb marcatge de CDK4 o CyD havien perdut completament aquest marcatge, fet que volia dir que ja no tenien ADN. Aquests fets, considerats conjuntament, feien pensar que les neurones amb marcadors de la fase G1 estaven en un estadi de degeneració més avançat que les neurones TUNEL positives, i que l'activació de CDK4 i CyD era un esdeveniment posterior al procés d'apoptosi. Prèviament, Ino i Chiba (2001) observaren la immunoreactivitat de CDK4 i CyD a l'escorça piriforme de rates tractades amb àcid kaïníc, obtenint uns resultats similars als aquí exposats. Van veure que alguna de les cèl·lules TUNEL positives, que bàsicament eren neurones, expressaven, tot i que de manera molt dèbil, CyD, mentre que pràcticament no mostraven marcatge de CDK4. Altres estudis fets en models d'isquèmia i traumatisme cortical també han mostrat resultats consistents amb el present treball. La CyD va ser detectada en neurones intactes i lesionades, però no en neurones apoptòtiques positives per a marcatge de TUNEL al cervell de rates sotmeses a una lesió per contusió cortical (Kaya i col., 1999). L'expressió de CyD i CDK4 també es va detectar en neurones normals i lesionades de forma reversible situades a les vores de

lesions cerebrals induïdes en rates mitjançant un procés d'isquèmia focalitzada (Li i col., 1997). Ambdós treballs van concloure que l'expressió d'elements del cicle cel·lular anava lligada a una resposta de supervivència relacionada amb la reparació de l'ADN. Un treball posterior (Schwartz i col., 2007) va concloure, de manera anàloga, que l'activació dels marcadors de fase G1 en neurones postmitòtiques exposades a concentracions subtòxiques de peròxid d'hidrogen constituïa una resposta de supervivència relacionada amb la reparació de l'ADN. Tot i això, Li i col. (1997) van mencionar que l'expressió de proteïnes del cicle cel·lular es podria haver donat amb anterioritat al moment del sacrifici, de manera que haurien pogut tenir a veure amb la posada en funcionament de l'apoptosi neuronal tot i que posteriorment no les van detectar a les seves mostres. Finalment, un estudi fet en un model d'isquèmia transitòria en rates va descriure que les cèl·lules amb marcatge positiu de TUNEL apareixien tres hores després de la reperfusió, mentre que el marcatge de CDK4 ho feia un dia després (Hayashi i col., 1999). A partir d'aquestes observacions, es va concloure que, tal com els resultats obtinguts en el present treball indiquen, l'expressió aberrant dels marcadors del cicle cel·lular no està relacionada amb l'apoptosi neuronal associada al tractament amb 3-NPA.

Agafant en conjunt tot allò exposat anteriorment, es podia especular amb la possibilitat que l'activació de CDK4 i CyD a les neurones situades a l'àrea interna de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA estigués associada a una resposta de supervivència encaminada a restablir a aquestes cèl·lules del dany sofert. De tota manera, es tractaria d'una resposta aberrant, donat que aquestes neurones ja no mostraven marcatge de Hoechst i, per tant, caldria suposar que ja no tindrien ADN. Una possibilitat era que aquestes neurones estiguessin a l'estadi final de la seva degeneració, a l'espera de ser fagocitades. També es podria pensar que el seu procés de mort hauria pogut quedar retardat o interromput en un punt previ a la seva lisi. En aquest sentit, s'ha publicat que, a nivell *in vivo*, els defectes en el metabolisme energètic podien provocar que l'apoptosi no es completés i les cèl·lules persistissin al teixit fins acabar lisant-se (Nicotera, 2002). Per altra banda, en cervells de ratolins transgènics utilitzats com a models de la MA o de l'atàxia telangiectàsica s'han detectat neurones en les que semblava que l'apoptosi s'havia aturat. Aquestes neurones podien activar el seu cicle cel·lular, fet que les portava a expressar proteïnes reguladores del cicle i a replicar el seu ADN sense experimentar divisió cel·lular, de manera que esdevenien hiperdiploides. Ja en aquest estat, les neurones podien romandre al cervell durant llargs períodes de temps, i semblava que podien contribuir a la progressió de les esmentades malalties (Herrup i Yang, 2007).

Adicionalment a l'expressió de CDK4 i CyD, en aquest tercer treball es va estudiar l'expressió de la pRb i la Ki67. Es va observar que la pRb estava present de forma constitutiva a les neurones del cos estriat de les rates control, mentre que no es trobava a les que estaven en procés de degeneració a la lesió dels animals tractats amb 3-NPA, fossin positives per TUNEL o no. Les neurones estriatals també mostraven un lleuger marcatge constitutiu de Ki67, el qual perdien tan bon punt experimentaven el procés degeneratiu a la lesió estriatal. Cal destacar que a la lesió estriatal hi havia cèl·lules amb una expressió intensa de Ki67, que en cap cas es va detectar que fossin neurones. Ambdós resultats, per tant, donaven suport a la hipòtesi que l'activació del cicle no estava involucrada en la posada en marxa de l'apoptosi neuronal detectada al cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA. Donat que la Ki67 és una proteïna que s'expressa en totes les fases de la divisió cel·lular, la seva absència a les neurones de l'àrea estriatal lesionada indicava que aquestes no estaven reactivant el cicle. La pRb juga un paper fonamental a la regulació de gens fonamentals per a la progressió del cicle cel·lular a través de la seva interacció amb els factors de transcripció E2F. La regulació de la pRb es produeix principalment per fosforilació mediada pels complexos actius CyD-CDK4/6, tot i que hi poden haver altres quinases involucrades (Inoue i col., 2007). La fosforilació de la pRb s'ha detectat en diversos models de neurodegeneració tant a nivell *in vitro* (Becker i Bonni, 2004) com *in vivo* (Malik i col., 2008; Wang i col., 2002; Wen i col., 2005), així com associada a la neurotoxicitat induïda pel 3-NPA (Akashiba i col., 2008). En contrast amb les conclusions a les que van arribar Akashiba i col., en les que implicaven la fosforilació de la pRb i, per tant, la reactivació del cicle cel·lular, en la promoció de la neurodegeneració associada al 3-NPA, la pèrdua de la pRb a les neurones en procés de degeneració de la lesió estriatal detectada en aquest treball era consistent amb un creixent gruix d'evidència que atribueix a la proteïna funcions diferents de la regulació del cicle cel·lular, les quals tindrien a veure amb processos fonamentals per a la supervivència cel·lular (Goodrich, 2006; McClellan i col., 2007). A més a més, s'ha vist que la pRb pot ser degradada per la caspasa-3 (Fattman i col., 2001), mentre que una forma mutant de la proteïna resistent a l'escissió atenua la mort cel·lular (Tan i col., 1997; Tan i Wang, 1998). Així, la caspasa-3 podria ser la responsable de la pèrdua de pRb observada a les neurones de l'àrea lesionada del cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA.

Fins al moment, els resultats obtinguts semblaven indicar que l'apoptosi neuronal detectada al cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA no era provocada per la reactivació del seu cicle cel·lular. D'altra banda, s'ha publicat que la reactivació del cicle cel·lular acompanya a la mort neuronal causada per inductors de l'apoptosi si aquests provoquen dany de l'ADN (Barzilai i col., 2008), i que el 3-NPA pot induir dany a l'ADN mitocondrial però no al nuclear

(Mandavilli i col., 2005), de manera que no es pot considerar que sigui un compost genotòxic. En cas de dany de l'ADN en forma de DSB, que són el tipus de lesions més letals i que provoquen una major activació del sistema de reparació de l'ADN, l'ATM és la proteïna que actua com a transductor primari del senyal. Un cop activa, l'ATM fosforila diversos substrats responsables de la reparació de l'ADN danyat (Shiloh, 2003). En neurones, s'havia vist que els compostos genotòxics provocaven la seva apoptosi associada a la reactivació del seu cicle cel·lular. A més a més, es va detectar que el pretractament amb inhibidors de l'ATM com la cafeïna o la wortmanina evitava els dos processos anteriors, de manera que es posava de manifest l'existència d'una relació entre l'activació de l'ATM associada al dany de l'ADN i la del cicle cel·lular (Kruman i col., 2004). D'acord amb això, el següent pas va ser estudiar l'activació de l'ATM, així com la de p53, un dels seus principals substrats i que és fosforilada per l'ATM a la serina 15, al cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA, amb l'objectiu de poder corroborar el fet que l'apoptosi de les neurones estriatals provocada per la toxina no era induïda per la reactivació del seu cicle cel·lular. La forma activa de l'ATM, fosforilada a la serina 1981, es va detectar en els astròcits reactius que envoltaven la lesió estriatal de les rates tractades, però no en neurones. Així mateix, el p53 fosforilat a la serina 15 només es va trobar associat al marcatge residual d'astròcits situat a la lesió estriatal. D'aquesta manera, l'absència d'activació d'ATM observada en neurones era consistent amb la manca de genotoxicitat del 3-NPA.

A diferència del que succeïa en neurones, l'administració de 3-NPA va induir l'activació de l'ATM en els astròcits reactius en procés de degeneració de la zona d'astrogliosi que envoltava la lesió estriatal de les rates tractades. Els astròcits interaccionen estretament amb les neurones, realitzant funcions de protecció, modulació del seu creixement i de la seva funció sinàptica, i proporcionant energia i substrats necessaris per a la neurotransmissió (Allen i Barres, 2009; Travis, 1994). Les neurones són especialment vulnerables a l'estrès oxidatiu i, per combatre'l, depenen de la seva interacció amb els astròcits, donat que aquests tenen més capacitat antioxidant (Liu i col., 2005; Shih i col., 2003). Es pensa que l'ATM juga un paper destacat com a regulador de l'estrès oxidatiu al cervell, ja que s'ha vist que ratolins *KO* per aquesta proteïna presenten un augment de les ROS cerebrals que es manifesta inicialment al cerebel (Kamsler i col., 2001). Recentment s'ha vist, a més a més, que l'activació de l'ATM induïda per l'estrès oxidatiu es pot produir en absència de dany de l'ADN (Guo i col., 2010). D'acord amb això, es va considerar que l'activació de l'ATM als astròcits reactius que envoltaven la lesió constituïa una resposta per protegir a les neurones de l'estrès oxidatiu induït per l'administració del 3-NPA.

Cap de les dues vies de senyalització considerades, la del cycle cel·lular i la de l'ATM, semblaven ser responsables de l'activació de l'apoptosi a les neurones del cos estriat després de l'administració del 3-NPA. Per finalitzar aquest estudi, es va avaluar la possible relació de la proteïna Akt, donat el paper determinant que juga a nivell de la supervivència de la cèl·lula a l'inhibir, mitjançant un procés de fosforilació, diverses proteïnes proapoptòtiques com la Bad i la caspasa-9 i factors de transcripció com els de la família FOXO, que a la vegada promouen la síntesi d'altres proteïnes apoptòtiques com la Bim i el FasL (Manning i Cantley, 2007). Es va observar que la forma plenament activa de l'Akt, que està fosforilada a la serina 473, era expressada de manera constitutiva per les neurones del teixit estriatal sa de les rates control i les tractades amb 3-NPA, mentre que les neurones en procés de degeneració situades a la lesió estriatal dels animals tractats perdien completament la seva expressió. Aquests resultats estaven d'acord amb d'altres treballs realitzats amb el model del 3-NPA, en els que l'administració de diferents tractaments protectors induïen un augment de la forma fosforilada de l'Akt, indicant que la seva pèrdua podia estar implicada a la neurotoxicitat del 3-NPA. En concret, s'havia vist que l'administració conjunta d'atorvastatina (Lee i col., 2008a) o del factor estimulant de colònies de granulòcits (Lee i col., 2008b) protegia a les neurones de la degeneració induïda per la toxina. A més a més, es va comprovar *in vitro* que el factor neurotròfic derivat del cervell prevenia l'apoptosi neuronal induïda pel 3-NPA reduint l'activació de la caspasa-3 i la fragmentació/condensació de l'ADN (Almeida i col., 2009). Anteriorment, també s'havia vist que l'administració a rates de vectors lentivirals que expressaven els primers 171 aminoàcids N-terminal de la Htt amb una cadena poliglutamínica de 82 unitats induïa una neuropatologia estriatal del tipus de la de la MH que anava acompanyada d'una disminució dels nivells d'Akt fosforilada a la serina 473 en neurones (Colin i col., 2005). Aquesta disminució d'Akt fosforilada era prèvia a la degeneració de les neurones, fet que indicava que la degradació de la proteïna podia tenir a veure amb la posada en marxa de l'apoptosi. Finalment, destacar que la pèrdua de la forma fosforilada de l'Akt s'ha detectat en neurones dopaminèrgiques en degeneració de la substància negra *pars compacta* de cervells *post mortem* d'afectats per la MP (Timmons i col., 2009), i també en ratolins amb envelliment accelerat utilitzats com a model de demències neurodegeneratives (Nie i col., 2009). D'acord amb tots aquests treballs i els resultats obtinguts, es va concloure que la pèrdua de la forma activa de l'Akt podia jugar un paper destacat a l'apoptosi induïda pel 3-NPA.

En paral·lel a l'estudi de la forma activa de l'Akt, es va analitzar l'expressió d'una de les isoformes d'un dels seus substrats principals, la proteïna GSK3 β , la qual està implicada en nombroses vies de senyalització i relacionada estretament amb el procés d'apoptosi. A les rates tractades amb 3-NPA es va detectar una elevada expressió de la forma inhibida de la

GSK3 β , la qual té la serina 9 fosforilada, a la lesió estriatal. Dins de la lesió, el marcatge es concentrava principalment a la vora de la lesió, formant cúmuls densos que englobaven o envoltaven estretament algunes de les neurones en procés de degeneració. Es pensa que la GSK3 actua més com a modulador del llinar a partir del qual es pot produir l'apoptosi que no pas com a inductora directa d'aquesta (Beurel i Jope, 2006). A més a més, pels papers contraris que juga a les dues vies apoptòtiques més conegudes, la intrínseca i l'extrínseca, la forma activa de la GSK3 pot potenciar el desenvolupament de la primera, mentre que la seva inhibició facilita el progrés de la segona (Beurel i Jope, 2006). En relació a aquesta segona possibilitat, s'ha vist que la inhibició de l'activitat de la GSK3 β en ratolins mitjançant l'expressió d'una forma negativa dominant de l'enzim produïa un augment de l'apoptosi en neurones, essent el cos estriat l'àrea cerebral preferentment afectada (Gómez-Sintes i col., 2007; Gómez-Sintes i Lucas, 2010). Des d'aquest punt de vista, es podia pensar que la inhibició de la GSK3 β a la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA podia contribuir a l'apoptosi neuronal a través de la via extrínseca.

Donat que les neurones en procés de degeneració de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA havien perdut l'expressió d'Akt activa, calia suposar que hi havia altres quinases relacionades amb la fosforilació de GSK3 β . A més a més de l'Akt, altres quinases com la PKA o la PKC poden fosforilar GSK3 β a la serina 9 (Doble i Woodgett, 2003), fet que s'ha vist que promou la supervivència neuronal sense que calgui l'activació de l'Akt (Li i col., 2000a; Ortega i col., 2010). Ortega i col. (2010) van mostrar que l'activació de la PKC mitjançant Ca²⁺ extracel·lular incorporat a través de receptors NMDAR induïa una resposta de supervivència en neurones granulars del cerebel que no era suprimida per l'alteració de la via de senyalització de l'Akt. Això és consistent amb el fet que les neurones presenten dos tipus de NMDAR, NR2A i NR2B, l'activació dels quals s'ha relacionat amb la posada en funcionament de respostes de supervivència i apoptosi respectivament (Broughton i col., 2009). D'acord amb això, donat que l'activació dels NMDAR i la posterior entrada de Ca²⁺ són mecanismes que intervenen a la neurotoxicitat mediada per 3-NPA (Liot i col., 2009), la inactivació de GSK3 β a la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA podia estar relacionada amb aquest mecanisme de supervivència mediat per l'activació de la PKC per Ca²⁺. Que la inactivació de la GSK3 β potenciï l'apoptosi a través de la via extrínseca o estigui englobada en un mecanisme de supervivència és un fet que requereix més investigació.

A manera de resum, el primer objectiu d'aquest treball consistia en comprovar si la reactivació del cicle cel·lular estava relacionada amb la neurodegeneració del cos estriat de

les rates tractades amb 3-NPA. Per això es va estudiar l'expressió de marcadors de la fase G1 del cicle cel·lular com la CDK4, la CDK2, la CyD, la CyE i l'E2F1, en el cos estriat dels animals tractats. Es va veure que la lesió estriatal provocada per la toxina es podia dividir en dues zones, la vora i el centre. La vora abastava la porció perifèrica de la lesió, en la qual es trobaven majoritàriament les neurones que mostraven els marcadors de degeneració utilitzats en aquest treball, en concret la forma activa de la caspasa-3 i el TUNEL. A més a més, dins de la vora també es va incloure l'àrea d'astrogliosi que envoltava la lesió estriatal. Al centre de la lesió hi havia neurones que pràcticament no mostraven marcatge de caspasa-3 activa o TUNEL i, a més a més, també s'hi podia trobar marcatge residual corresponent a astròcits. Els marcadors de la fase G1 es van detectar principalment al centre de la lesió, essent la CDK4 la que es va detectar més intensament. L'estudi conjunt en neurones del marcatge de TUNEL i el de la CDK4 i la CyD va mostrar que les neurones en procés de degeneració positives per a TUNEL no expressaven ni la CDK4 ni la CyD, sinó que ambdues proteïnes es trobaven a les neurones del centre de la lesió que, per no tenir marcatge positiu de Hoechst i presentar un marcatge de NeuN més dèbil, es va suposar que estaven en estat avançat de degeneració. Així, es va concloure que l'activació del cicle cel·lular no era responsable de la posada en marxa del procés de mort neuronal programada i que, en canvi, podia formar part d'una resposta de supervivència tardana. A partir d'aquí, es van analitzar altres proteïnes que poguessin tenir a veure amb la mort neuronal com l'ATM, el p53, l'Akt i la GSK3 β . Les formes fosforilades de l'ATM i el p53 no es van detectar en neurones, de manera que es va descartar que estiguessin relacionades en el seu procés de degeneració. Per altra banda, es va veure que les neurones expressaven de manera constitutiva la forma activa de l'Akt, i que perdien aquesta proteïna tan bon punt començaven a degenerar. Així, semblava que la pèrdua d'aquesta quinasa sí que podia estar implicada en el procés de neurodegeneració. Finalment, la forma inhibida de la GSK3 β es va detectar de forma intensa a la vora de la lesió, en forma de cúmuls que en alguns casos englobaven les neurones en degeneració. En aquest cas, es va especular amb que la proteïna podia contribuir a la progressió de la forma extrínseca de l'apoptosi o que, d'altra banda, podia formar part d'una resposta de supervivència.

2. ALTERACIONS DE LA BHE EN EL MODEL DEL 3-NPA.

La BHE és un sistema especialitzat que permet limitar l'entrada al cervell de substàncies presents al flux sanguini i resulta essencial pel bon funcionament del SNC. En condicions fisiològiques, la BHE assegura a les cèl·lules cerebrals l'aportació constant de nutrients,

l'eliminació dels productes de rebuig a través del flux sanguini i la protecció davant de productes tòxics presents a la sang. Les TJ, formades entre d'altres per les claudines i l'occludina, són proteïnes integrals de membrana que es troben unint les CECC, limitant d'aquesta manera la lliure circulació de substàncies entre l'interior del SNC i la circulació sanguínia per via paracel·lular. Estudis recents suggereixen que la funció de la BHE està alterada en la majoria de processos degeneratius del SNC (Carvey i col., 2009). Aquest fet també s'ha demostrat en el model del 3-NPA, ja que diversos estudis *in vivo* realitzats en rosegadors han posat de manifest que el dany estriatal induït per la toxina porta associat una alteració de la permeabilitat de la BHE, que s'ha detectat mitjançant l'extravasació de diferents substàncies, entre les que n'hi ha d'endògenes com l'albumina, l'IgG i factors del complement (Hamilton i Gould, 1987a; Nishino i col., 1995, 1997) i exògenes com colorants injectats sistèmicament (Kim i col., 2003; Reynolds i Morton, 1998).

Per desenvolupar el segon objectiu d'aquesta tesi, la primera tasca que es va plantejar va ser la d'estudiar la integritat dels vasos sanguinis i de les TJ presents al cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA, que no s'havia abordat anteriorment en aquest model. L'estudi va mostrar que a la zona lesionada del cos estriat del cervell dels animals tractats amb 3-NPA hi havia una pèrdua severa de la integritat de la BHE, que era conseqüència del deteriorament dels capil·lars d'aquesta zona. Aquest fet era el responsable de que, després de l'administració per via intravenosa de BE, a la lesió estriatal s'observés una elevada fluorescència vermella deguda al pas del BE lligat a proteïnes des de la circulació sanguínia cap al parènquima cerebral. A més a més, es podia observar que les neurones en procés de degeneració havien captat part del colorant, donat que també exhibien fluorescència vermella. La part dorsolateral del cos estriat era la més afectada per la toxina, la qual cosa estava en concordança amb els resultats dels experiments d'extravasació recollits en els treballs fets amb el model del 3-NPA anteriorment citats. El motiu de l'especificitat del 3-NPA pel cos estriat segueix essent desconegut. Quan la toxina s'administra sistèmicament a rosegadors, la inhibició irreversible de la SDH que produeix provoca un deteriorament del metabolisme energètic associat a una deficiència de la producció d'ATP que afecta a tot l'organisme de l'animal intoxicat. Pel que fa al cervell, tot i que la inhibició de la SDH és semblant en totes les seves regions (Alexi i col., 1998), la part lateral del cos estriat és la que resulta especialment afectada. Així, en els tractaments subaguts amb 3-NPA com el que s'ha utilitzat en aquest treball, en els que s'administra una dosi d'entre 15 i 20 mg/kg de la toxina durant 3 - 5 dies, s'ha vist que només alguns dels animals amb lesió estriatal presenten alteracions fora d'aquesta regió, especialment a l'hipocamp (Beal i col., 1993; Guyot i col., 1997). Diversos mecanismes han estat proposats com a possibles responsables d'aquesta especificitat. S'ha suggerit que els diversos sistemes de neurotransmissió que es

troben al cos estriat, com el glutamatèrgic, el dopaminèrgic, el cannabinoid i l'adenosínic, hi poden estar implicats (Brouillet i col., 2005). Recentment, també s'ha vist que les neurones estriatals i corticals responien de manera diferent davant del 3-NPA, ja que només les primeres experimentaven una disminució de la proteïna p27 mediada per l'activitat de la proteasa calpaïna que s'associava a la reactivació del seu cicle cel·lular i posterior apoptosi (Akashiba i col., 2008). Finalment, l'especificitat del 3-NPA pel cos estriat també s'ha relacionat amb la particular sensibilitat a la toxina de l'artèria lateral estriatal (Nishino i col., 1995, 1997). Aquesta artèria és especialment sensible, donat que té una pressió intraluminal elevada, una paret vascular prima en comparació amb el seu diàmetre i una abundant innervació. En base a aquests fets, es pot hipotetitzar amb la possibilitat que, en una situació de compromís com la induïda per l'administració de 3-NPA, aquesta artèria pugui resultar afectada ràpidament, fet que provocaria una alteració de la funcionalitat de la BHE i una extravasació associada d'elements del flux sanguini com proteïnes plasmàtiques, limfòcits i neutròfils.

Després de determinar l'àrea estriatal afectada pel 3-NPA a partir de l'observació de l'extravasació del BE, es va continuar estudiant la integritat dels vasos sanguinis a la mateixa àrea cerebral en les rates tractades amb la toxina mitjançant els marcatges immunohistoquímics amb anticossos dirigits contra diferents proteïnes presents a la BHE: l'EBA, el qual és específic de rata i es troba a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis que tenen BHE (Sternberger i Sternberger, 1987, Sternberger i col., 1989); la laminina, proteïna que és un component bàsic de totes les membranes basals de l'organisme (Páez i col., 2007); i, finalment, la ZO-1, proteïna citoplasmàtica de les CECC que serveix d'ancoratge a les claudines i l'occludina i que es va utilitzar com a marcadora de la integritat de les TJ (Kirk i col., 2003). El patró de marcatge observat en els tres casos va revelar la ruptura dels vasos sanguinis, i per tant de la BHE, a les àrees amb extravasació del cos estriat de les rates intoxicades. D'acord amb allò observat amb els marcatges d'EBA i laminina, a la part més interna de les lesions estriatals no hi havia rastre de vasos sanguinis, mentre que a la vora de la lesió es podien observar parcialment digerits. Pel que fa al marcatge de ZO-1, aquest apareixia més dèbil i desestructurat a l'àrea estriatal lesionada de les rates tractades en comparació amb l'observat als animals control o a les àrees no lesionades del cos estriat dels animals tractats. Les alteracions en aquests tres marcadors també s'han trobat en altres situacions de dany cerebral. L'EBA juga un paper destacat en el manteniment de la integritat de la BHE (Ghabriel i col., 2000), i s'ha vist que la seva intensitat de marcatge disminueix en situacions de patologia cerebral com la isquèmia (Lin i Ginsberg, 2000; Lu i col., 2008), el traumatisme (Lin i col., 2001) i l'AVC (Gursoy-Ozdemir i col., 2004). La degradació de la ZO-1 i la membrana basal també s'ha detectat en

condicions d'isquèmia (Asahi i col., 2001; del Zoppo i Mabuchi, 2003), mentre que en l'EM s'han detectat alteracions a les TJ (Kirk i col., 2003).

Dins del model del 3-NPA, diferents mecanismes poden estar involucrats en el deteriorament de la BHE. L'excitotoxicitat mediada per la sobreestimulació dels NMDAR és un mecanisme que desenvolupa un paper important a la patologia neuronal induïda per la toxina. Les cèl·lules endotelials del cervell de les rates també expressen aquests receptors (Krizbai i col., 1998), però no queda clar si es veuen afectades pels nivells neurotòxics de glutamat. Per una banda, s'ha suggerit que el glutamat contribueix a la pèrdua de la barrera endotelial mitjançant l'activació dels NMDAR (Sharp i col., 2003) i que l'activació d'aquests receptors pot estar involucrada en l'alteració de l'expressió de l'occludina (András i col., 2007). D'altra banda, altres estudis han arribat a la conclusió de que les cèl·lules endotelials han de ser resistents a l'estimulació per glutamat, donat que *in vivo* actuen com a reguladores a nivell de la BHE del pas al cervell dels aminoàcids potencialment neurotòxics (Domoki i col., 2008). L'estrès oxidatiu lligat a la producció de ROS també s'associa estretament a la neurotoxicitat del 3-NPA, i pot ser responsable de la posada en marxa d'altres vies que poden contribuir a l'efecte pernicios de la toxina. S'ha descrit que les MMP, enzims proteolítics que poden ser produïts per les cèl·lules endotelials, les neurones, la micròglia i els astròcits, poden degradar les proteïnes de la membrana basal i les TJ, i per tant alterar la BHE (Asahi i col., 2001; Fukuda i col., 2004; Yang i col., 2007). L'estrès oxidatiu associat a la producció de ROS s'ha associat a l'augment de l'activitat de les MMP en diversos models de patologies cerebrals com la isquèmia focal o el traumatisme cerebral induït per fred (Alexander i Elrod, 2002; Yu i col., 2008). S'ha proposat que l'activació de la tirosina quinasa seria la responsable de l'activació de les MMP, les quals induirien l'augment de la permeabilitat de la BHE per degradació de la membrana basal i per fosforilació dels residus de tirosina de les TJ (Haorah i col., 2007). Finalment, també s'ha vist que, en resposta a l'estrès oxidatiu, les cèl·lules endotelials poden experimentar un procés d'apoptosi mediat per l'activació de Bax en el que hi acaba havent activació de caspases (Chen i col., 2007).

Després de reflexionar sobre alguns dels mecanismes que podien estar implicats en les alteracions de la BHE causades per l'administració del 3-NPA, es va continuar estudiant la possible relació entre l'activació de les MMP i el dany vascular detectat al cos estriat de les rates intoxicades. Entre les MMP conegudes, es van considerar la MMP-2 i la MMP-9, que son les que han estat més àmpliament estudiades a nivell del SNC a causa del paper destacat que juguen en diverses alteracions neurològiques. Es va veure que, al cos estriat de les rates control, la MMP-9 s'expressava constitutivament en les neurones i en alguns

astròcits, mentre que la MMP-2 pràcticament no es detectava. Aquests resultats no es corresponien amb altres treballs que, mitjançant estudis zimogràfics, havien descrit que la MMP-2 era més abundant que la MMP-9 als cervells de ratolins (Gasche i col., 2001) i de rates (Planas i col., 2001; Zhang i col., 1998). En l'únic treball trobat a la bibliografia en el que s'havia estudiat l'activació de les MMP en el model del 3-NPA, en els ratolins control es van trobar nivells baixos, mesurats per zimografia, de les dues MMP, tot i que els corresponents a la MMP-2 eren de nou més alts. De tota manera, altres estudis immunohistoquímics havien detectat la MMP-9 (Rivera i col., 2002) i pràcticament l'absència de la MMP-2 (Yang i col., 2007) en els animals control. A més a més, l'expressió fisiològica de la MMP-9 a les neurones del cervell adult, la qual s'ha relacionat amb la plasticitat neuronal (Michaluk i Kaczmarek, 2007) i la reparació tissular (Yong, 2005), està ben documentada.

Pel que fa a les rates tractades amb 3-NPA, la MMP-9 es va detectar de forma abundant als vasos sanguinis degradats de l'àrea lesionada del seu cos estriat, i el seu marcatge colocalitzava amb el de la laminina. D'altra banda, la zimografia *in situ* va revelar que, en els vasos sanguinis degradats, hi havia una activitat gelatinolítica que colocalitzava amb el marcatge de la laminina i envoltava el marcatge de l'EBA. A més a més, l'activitat gelatinolítica era pràcticament inhibida quan el teixit sotmès a la zimografia *in situ* era prèviament incubat amb un anticòs dirigit contra el centre catalític de la MMP-9, mentre que l'activitat gelatinolítica colocalitzava amb el marcatge de la MMP-9 quan la incubació amb l'anticòs es feia posteriorment a la zimografia. Vist en conjunt, això feia pensar que la MMP-9 era la principal gelatinasa implicada en la degradació de la membrana basal dels vasos sanguinis afectats pel tractament amb el 3-NPA, i que jugava un paper destacat al deteriorament de la BHE. El que no es va poder determinar, però, va ser si el tractament amb el 3-NPA provocava únicament un augment de l'activació de la MMP-9, o si també hi havia un augment de l'expressió de la gelatinasa. Tot i aquesta limitació, els resultats obtinguts estaven d'acord amb els exposats a d'altres treballs desenvolupats en models de patologia del SNC com els d'isquèmia focal (Gasche i col., 1999, 2001; Planas i col., 2001; Yang i col., 2007), d'isquèmia global (Rivera i col., 2002), de dany medullar (Yu i col., 2008) i el d'excitotoxicitat induïda per l'administració sistèmica de kaïnàt (Zhang i col., 1998), en els quals, després d'induir el dany cerebral, es va detectar un augment de la MMP-9. Alguns d'aquests treballs, a més a més, van establir una correlació entre l'expressió de la gelatinasa i l'augment de la permeabilitat vascular associada al deteriorament de la BHE (Gasche i col., 2001; Yang i col., 2007; Yu i col., 2008). En els models d'isquèmia transitòria s'ha descrit que hi ha una primera obertura reversible de la BHE, que estaria mediada per l'activitat de la MMP-2 constitutiva, i una de més tardana irreversible, mediada per l'activació de la MMP-9

quan disminueix l'activació de la MMP-2 (Yang i col., 2007). D'acord amb això, es podia pensar que si la MMP-2 estava intervenint en la degradació dels vasos sanguinis a les primeres etapes de la intoxicació, el seu marcatge es podria detectar a la vora de la lesió estriatal. Com que aquest no va ser el cas, es va concloure que la MMP-2 no estava jugant un paper significant a la patologia vascular del cos estriat de les rates intoxicades, sinó que la patologia era deguda bàsicament a l'acció de la MMP-9. Aquesta afirmació està d'acord amb les conclusions a les que van arribar Kim i col. (2003) en el seu model del 3-NPA, que assenyalaven a la forma activa de la MMP-9 com a responsable de la degradació de la BHE concomitant a la patologia vascular estriatal associada a l'administració de la toxina.

Un cop establert el paper determinant de la MMP-9 en la degradació vascular estriatal associada a l'administració de 3-NPA, al mateix treball es va analitzar la presència de la gelatinasa en les neurones, els astròcits, la micròglia i les cèl·lules endotelials. L'expressió constitutiva de la MMP-9 detectada a les neurones de les rates control feia pensar que la MMP-9 present als vasos sanguinis afectats pel 3-NPA era d'origen neuronal. Donant suport a aquest resultat, s'ha publicat que, al SNC, aquesta gelatinasa és secretada principalment per les neurones (Lim i col., 1996; Planas i col., 2001). A més a més, l'estrès pot induir la producció de la MMP-9 a les neurones, tal com succeeix en resposta a excitotoxines com el kaïnàt (Zhang i col., 1998). A les rates tractades amb 3-NPA també es van trobar astròcits reactius presents a la zona d'astrogliosi que envoltava la lesió estriatal que expressaven MMP-9 i en alguns casos semblava que interaccionaven amb els vasos sanguinis danyats. Així, semblava que els astròcits podien contribuir a la degradació vascular, tot i que tampoc es podia descartar l'opció contrària, ja que s'ha postulat que la cicatriu glial formada principalment per astròcits reactius pot contribuir a la reparació de la BHE (Bush i col., 1999; Copin i Gasche, 2007). Pel que fa a la micròglia, els vasos degradats de la lesió estriatal apareixien profusament envoltats per la seva forma reactiva. La micròglia reactiva secreta un gran ventall de substàncies involucrades en la resposta immunitària i inflamatòria entre les que hi ha la MMP-9 (Rock i col., 2004). Tot i això, els resultats obtinguts suggerien que la micròglia jugava un paper limitat a la secreció de la MMP-9, ja que només en alguns casos mostrava un marcatge lleuger corresponent a la gelatinasa. Finalment, es va trobar que el marcatge d'EBA, utilitzat per identificar les cèl·lules endotelials, apareixia superposat a l'activitat gelatinolítica. Com que aquesta última apareixia superposada a la vegada amb el marcatge de la MMP-9, es podia assumir que les cèl·lules endotelials podien ser una altra font de la gelatinasa. En aquesta línia, s'ha vist que les cèl·lules endotelials secreten MMP-9 en resposta a factors angiogènics o mediadors de la inflamació, però no de forma constitutiva (Hanemaaijer i col., 1993; Jackson i Nguyen, 1997). El fet que la micròglia reactiva pugui secretar aquestes substàncies mediadores de la inflamació (Rock i col., 2004)

i que estigués present al voltant dels vasos degradats reforçava la possibilitat que les cèl·lules endotelials estiguessin secretant MMP-9 després del tractament amb el 3-NPA.

Com a resum, el segon objectiu d'aquest treball consistia en avaluar les alteracions de la BHE al cos estriat de les rates tractades amb 3-NPA. L'extravasació de BE va permetre detectar un augment de la permeabilitat vascular a la part dorsolateral del cos estriat dels animals tractats, la qual cosa indicava que, a aquella zona, la BHE resultava severament afectada per la toxina. Els marcatges de les cèl·lules endotelials, de la membrana basal i de la proteïna ZO-1 van confirmar el deteriorament de la BHE a la zona estriatal lesionada dels animals tractats. Seguidament es va estudiar el paper de la MMP-2 i la MMP-9 en la degradació de la BHE associada a l'administració de 3-NPA. Es va veure que els vasos sanguinis de l'àrea estriatal lesionada presentaven activitat gelatinasa, la qual era deguda principalment a l'acció de la MMP-9. Això feia pensar que la MMP-9 era la principal implicada en la seva degradació. A més a més, als vasos lesionats hi havia una presència elevada de micròglia reactiva, la qual també podia contribuir a la degradació dels vasos sanguinis de la lesió estriatal de les rates tractades amb 3-NPA.

V. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS.

- 1. L'administració intraperitoneal de 3-NPA a rates SD a dosi de 20 mg/kg/dia durant tres dies els produeix una lesió a la regió dorsolateral de cada nucli estriat de l'encèfal.**
- 2. A la zona perifèrica de la lesió s'hi produeix astrogliosi i les neurones adquireixen formes picnòtiques, mentre que al centre de la lesió s'hi troben restes astrocítiques i neurones picnòtiques residuals.**
- 3. En aquest model de neurodegeneració per 3-NPA, la MCP neuronal es produeix principalment a la vora de la lesió estriatal, però no al seu centre.**

Aquest fet es posa de manifest perquè, en les neurones, els marcatges de la forma activa de la caspasa-3 i de TUNEL apareixen principalment a la vora de la lesió i no es troben en les restes neuronals del centre de la lesió. El fet que es trobin diferents combinacions d'ambdós marcadors en les neurones de la vora de la lesió suggereix que es poden estar activant diferents formes de MCP.

- 4. La caspasa-3 no desenvolupa funcions apoptòtiques en els astròcits.**

Aquest fet es posa de manifest perquè els astròcits del cos estriat i de l'escorça de les rates sanes mostren expressió constitutiva de la forma activa de la caspasa-3, mentre que es perd en els astròcits situats a la vora i al centre de la lesió.

- 5. En aquest model, la reactivació del cicle cel·lular no és el responsable de l'activació dels processos de mort neuronal.**

Aquest fet es posa de manifest perquè, tot i que es detecta un augment de l'expressió dels marcadors de la fase G1 del cicle cel·lular, principalment de la CDK4 i la CyD, s'observa que aquests dos marcadors es troben principalment en les restes neuronals del centre de la lesió que es troben en un estadi molt avançat de degeneració (no mostren marcatge de Hoechst), i no es detecten

a les neurones de la vora de la lesió que mostren marcatge TUNEL i encara tenen marcatge de Hoechst. A més a més, les neurones tant de la vora com del centre de la lesió perden el marcatge constitutiu de pRb i Ki67, que sí mostren les neurones dels animals control i de les zones estriatals no afectades dels animals tractats. L'expressió dels marcadors/elements de la fase G1 es pot atribuir a una possible resposta de supervivència tardana.

6. L'anàlisi de mostres humanes de cervells de pacients de MH per tècniques de Western-blot mostra la presència de marcadors de reactivació del cicle cel·lular.

Aquest fet es posa de manifest per la sobreexpressió de la CyD i l'E2F1. No s'ha determinat si aquesta reactivació de cicle cel·lular és la causant de la mort neuronal o una resposta de supervivència.

7. En els animals tractats amb 3-NPA, s'ha detectat l'expressió de la forma activa de l'ATM en els astròcits reactius que envolten la lesió.

Aquest fet pot constituir una resposta encaminada a protegir les neurones de l'estrès oxidatiu induït pel 3-NPA.

8. En el model estudiat, la pèrdua de la forma activa de l'Akt està relacionada amb els processos de mort neuronal.

Aquest fet es posa de manifest perquè les neurones de la lesió estriatal perden l'expressió constitutiva de la forma activa de l'Akt, la qual s'observa en les neurones dels animals control i en les de les zones estriatals no lesionades dels animals tractats.

9. En les rates tractades amb la toxina, la forma inactiva de la GSK3 β es troba de forma abundant en algunes neurones de la vora de la lesió i es va perdent a l'avançar cap al centre de la lesió.

Aquest fet pot indicar que la GSK3 β inactiva pot estar involucrada o bé en la progressió de la via apoptòtica extrínseca o bé en una resposta de supervivència associada a l'activació dels NMDAR.

10. En el model estudiat, la funció de la BHE es veu severament alterada a la zona lesionada.

Aquest fet es posa de manifest perquè a la zona lesionada hi ha una extravasació elevada de BE. A més a més, s'observa que tant les CECC, les TJ que uneixen les CECC entre elles, com la membrana basal dels vasos sanguinis de la zona lesionada mostren grans alteracions.

11. En les rates tractades amb 3-NPA, l'activitat gelatinasa de la MMP-9 exerceix un paper determinant en la degradació de la BHE a la lesió estriatal.

Aquest fet es posa de manifest perquè a la lesió estriatal els vasos sanguinis mostren, a la vegada, marcatge de MMP-9 i activitat gelatinasa, i aquesta activitat gelatinasa pràcticament deixa de detectar-se quan, prèviament a la zimografia *in situ*, es bloqueja l'activitat de la MMP-9 mitjançant la incubació amb un anticòs dirigit contra el seu centre catalític.

12. En aquest model, al voltant de gran part dels vasos sanguinis de la lesió estriatal hi ha una presència elevada de micròglia reactiva.

Aquest fet suggereix que la micròglia reactiva participa en la degradació de la BHE a la zona estriatal lesionada.

VI. BIBLIOGRAFIA

A

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 2010; 37:13-25

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7:41-53

Acarin L, Villapol S, Faiz M, Rohn TT, Castellano B, González B. Caspase-3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation. *Glia* 2007; 55:954-965

Akashiba H, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. Differential involvement of cell cycle reactivation between striatal and cortical neurons in cell death induced by 3-nitropropionic acid. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:6594-6606

Alexander JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J. Anat.* 2002; 200:561-574

Alexi T, Hughes PE, Knüsel B, Tobin AJ. Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague-Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp. Neurol.* 1998; 153:74-93

Allen NJ, Barres BA. Glia - more than just brain glue. *Nature* 2009; 457:675-677

Almeida S, Brett AC, Góis IN, Oliveira CR, Rego AC. Caspase-dependent and -independent cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat cortical neurons. *J. Cell. Biochem.* 2006; 98:93-101

Almeida S, Laço M, Cunha-Oliveira T, Oliveira CR, Rego AC. BDNF regulates BIM expression levels in 3-nitropropionic acid-treated cortical neurons. *Neurobiol. Dis.* 2009; 35:448-456

Alston TA, Mela L, Bright HJ. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; 74:3767-3771

András IE, Deli MA, Veszeka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27:1431-1443

Andreeva AY, Krause E, Müller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:38480-38486

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 2005; 97:512-523

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 2003; 22:4385-4399

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 2001; 21:7724-7732

B

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421:499-506

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 2004; 16:1-13

Barzilai A, Biton S, Shiloh Y. The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair (Amst)* 2008; 7:1010-1027

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of functional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:20520-20526

Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 1993; 13:4181-4192

Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 1995; 38:357-366

Beal MF, Ferrante RJ. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5:373-384

Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007; 28:5-11

Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simbürger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J.* 2005; 19:647-649

Becker EB, Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog. Neurobiol.* 2004; 72:1-25

Begley DJ. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10:1295-1312

Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118:103-113

Bendayan R, Ronaldson PT, Gingras D, Bendayan M. In situ localization of Pglycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* 2006; 54:1159-1167

Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Małecki A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep.* 2008; 60:600-622

Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 2006; 79:173-189

Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Suffys P, Van Roy F, Fiers W. Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; 86:9494-9498

Biedl A, Kraus R. Über einer bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäuren auf das Zentral-nervensystem. *Zentralblatt Innere Medizin* 1898; 19:1185-1200

Bijur GN, Jope RS. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:37436-37442

Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Créminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Krajewski S, Brouillet E. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J. Neurosci.* 2003a; 23:5020-5030

Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Créminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E. In vivo calpain/caspase crosstalk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J. Biol. Chem.* 2003b; 278:43245-43253

Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 2009; 57:1251-1264

Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 2007; 6:2612-2619

Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 2006; 25:4744-4756

Broadwell RD, Balin BJ, Salzman M, Kaplan RS. Brain–blood barrier? Yes and no. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80:7352-7356

Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009; 40:e331-e339

Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 1999; 59:427-468

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 2005; 95:1521-1540

Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Srivastava R, Roy DS, Rosen BR, Beal MF. Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 1993; 60:356-359

Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999; 23:297-308

C

Calabresi P, Gubellini P, Picconi B, Centonze D, Pisani A, Bonsi P, Greengard P, Hipskind RA, Borrelli E, Bernardi G. Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 2001; 21:5110-5120

Camins A, Verdager E, Folch J, Pallàs M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev.* 2006; 12:135-148

Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC. Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:33791-33798

Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J. Neurochem.* 2009; 111:291-314

Charvet C, Alberti I, Luciano F, Jacquel A, Bernard A, Auburger P, Deckert M. Proteolytic regulation of Forkhead transcription factor FOXO3a by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 2003; 22:4557-4568

Chávez JC, LaManna JC. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. *J. Neurosci.* 2002; 22:8922-8931

Chen N, Luo T, Wellington C, Metzler M, McCutcheon K, Hayden MR, Raymond LA. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J. Neurochem.* 1999; 72:1890-1898

Chen TG, Chen TL, Chang HC, Tai YT, Cherng YG, Chang YT, Chen RM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptotic insults to mouse cerebral endothelial cells via a Bax mitochondria-caspase protease pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 219:42-53

Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell. Signal.* 2009; 21:470-476

Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11:143-149

Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2:769-776

Coles CJ, Edmondson DE, Singer TP. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 1979; 254:5161-5167

Colin E, Régulier E, Perrin V, Dürr A, Brice A, Aebischer P, Déglon N, Humbert S, Saudou F. Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 21:1478-1488

Copani A, Condorelli F, Caruso A, Vancheri C, Sala A, Giuffrida Stella AM, Canonico PL, Nicoletti F, Sortino MA. Mitotic signaling by beta-amyloid causes neuronal death. *FASEB J.* 1999; 13:2225-2234

Copin JC, Gasche Y. Matrix metalloproteinase-9 deficiency has no effect on glial scar formation after transient focal cerebral ischemia in mouse. *Brain Res.* 2007; 1150:167-173

Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J. Cell Biol.* 1999; 147:1569-1582

Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004; 23:2785-2796

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 1999; 341:233-249

D

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell.* 2000; 6:41-51

deAlmeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Déglon N. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J. Neurosci.* 2002; 22:3473-3483

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001; 11:1156-1166

Deeken JF, Löscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13:1663-1674

DeGregori J. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1602:131-150

Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* 2008; 121:2115-2122

Del Río P, Massieu L. Mild mitochondrial inhibition in vivo enhances glutamate-induced neuronal damage through calpain but not caspase activation: role of ionotropic glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 2008; 212:179-188

del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003; 23:879-894

del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34:1261-1266

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997; 277:1990-1993

Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 2003; 116:1175-1186

Domoki F, Kis B, Gáspár T, Bari F, Busija DW. Cerebromicrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 295:R1099-1108

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 2009; 30:379-387

Dore-Duffy P, LaManna JC. Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 2007; 9:1363-1371

Double KL, Reyes S, Werry EL, Halliday GM. Selective cell death in neurodegeneration: why are some neurons spared in vulnerable regions? *Prog. Neurobiol.* 2010; 92:316-329

Duan W, Guo Z, Mattson MP. Participation of par-4 in the degeneration of striatal neurons induced by metabolic compromise with 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 2000; 165:1-11

E

Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J. Cell Sci.* 2003; 116:3879-3891

Ehrlich P. Das Sauerstoffbeduerfnis des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie. Hirschwald 1885; 8:167

el-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol.* 1999; 45:15-23

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 1980; 107:519-527

Estrada Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch. Med. Res.* 2008; 39:265-276

E

Fan MM, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 2007; 81:272-293

Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:29745-29753

Farrer LA. Diabetes mellitus in Huntington disease. *Clin. Genet.* 1985; 27:62-67

Fattman CL, Delach SM, Dou QP, Johnson DE. Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20:2918-2926

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2004; 24:2143-2155

Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57:883-917

Freeman RS, Estus S, Johnson EM Jr. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 1994; 12:343-355

Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348:1365-1375

Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* 2004; 35:998-1004

G

Gafni J, Ellerby LM. Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 2002; 22:4842-4849

Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21:1393-1400

Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999; 19:1020-1028

Gasche Y, Soccia PM, Kanemitsu M, Copin JC. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front. Biosci.* 2006; 11:1289-1301

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 1992; 119:493-501

Ghabriel MN, Zhu C, Hermanis G, Allt G. Immunological targeting of the endothelial barrier antigen (EBA) in vivo leads to opening of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2000; 878:127-135

Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 2007; 14:1267-1274

Giardina SF, Cheung NS, Reid MT, Beart PM. Kainate-induced apoptosis in cultured murine cerebellar granule cells elevates expression of the cell cycle gene cyclin D1. *J. Neurochem.* 1998; 71:1325-1328

Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27:2803-2820

Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in β -amyloid-induced neuronal death. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:19011-19016

Glass M, Dragunow M, Faull RL. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 2000; 97:505-519

Goldmann EE. Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Färbung'. *Beitr. klin. Chir.* 1909; 64:192-265

Goldmann EE. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. preuss. Akad. Wiss. Phys.-Math* 1913; 1:1-60

Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 2007; 32:37-43

Gómez-Sintes R, Hernández F, Bortolozzi A, Artigas F, Avila J, Zaratin P, Gotteland JP, Lucas JJ. Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *EMBO J.* 2007; 26:2743-2754

Gómez-Sintes R, Lucas JJ. NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy. *J. Clin. Invest.* 2010; 120:2432-2445

Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006; 25:5233-5243

Gould DH, Gustine DL. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, enzyme inhibition induced in ice by the plant toxin 3-nitropropionic acid. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1982; 8:377-393

Gould DH, Wilson MP, Hamar DW. Brain enzyme and clinical alterations induced in rats and mice by nitroaliphatic toxicants. *Toxicol. Lett.* 1985; 27:83-89

Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* 1998; 84:503-510

Greene LA, Liu DX, Troy CM, Biswas SC. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1772:392-401

Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, Pape PC. O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator dilution technique. *J. Appl. Physiol.* 1985; 58:1929-1941

Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 2001; 65:391-426

Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23:2881-2890

Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. ATM activation by oxidative stress. *Science* 2010; 330:517-521

Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Berrmohl D, Jin H, Wang X, Rosenberg GA, Lo EH, Moskowitz MA. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J. Clin. Invest.* 2004; 113:1447-1455

Guyot MC, Palfi S, Stutzmann JM, Mazière M, Hantraye P, Brouillet E. Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats. *Neuroscience* 1997; 81:141-149

H

Hamilton BF, Gould DH. Correlation of morphologic brain lesions with physiologic alterations and blood-brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol.* (Berlin) 1987a; 74:67-74

Hamilton BF, Gould DH. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol.* (Berlin) 1987b; 72:286-297

Han Z, Yang L, MacLellan WR, Weiss JN, Qu Z. Hysteresis and cell cycle transitions: how crucial is it? *Biophys. J.* 2005; 88:1626-1634

Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem. J.* 1993; 296:803-809

Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J. Neurochem.* 2007; 101:566-576

Harik N, Harik SI, Kuo NT, Sakai K, Przybylski RJ, LaManna JC. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain Res.* 1996; 737:335-338

Hawkins B, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57:173-185

Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J. Nutr.* 2006; 136:218S-226S

Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y. DNA fragmentation precedes aberrant expression of cell cycle-related protein in rat brain after MCA occlusion. *Neurol. Res.* 1999; 21:695-698

He F, Zhang S, Qian F, Zhang C. Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology* 1995; 45:2178-2183

Hermann DM, Bassetti CL. Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends Pharmacol. Sci.* 2007; 28:128-134

Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8:368-378

Higgins GC, Beart PM, Nagley P. Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66:2773-2787

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 2000; 406:86-90

Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104:3585-3590

Honda M, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Niwa M. Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5. *Cell Mol. Neurobiol.* 2006; 26:109-118

Huntington G. On chorea. George Huntington, M.D. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2003; 15:109-112

Husseman JW, Nochlin D, Vincent I. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 2000; 21:815-828

I

Ino H, Chiba T. Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J. Neurosci.* 2001; 21:6086-6094

Inoue Y, Kitagawa M, Taya Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F1 after DNA damage. *EMBO J.* 2007; 26:2083-2093

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 1999; 147:1351-1363

J

Jackson CJ, Nguyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29:1167-1177

Jian Liu K, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39:71-80

Joel D. Open interconnected model of basal ganglia-thalamocortical circuitry and its relevance to the clinical syndrome of Huntington's disease. *Mov. Disord.* 2001; 16:407-423

Johanson C, Stopa E, McMillan P, Roth D, Funk J, Krinke G. The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain: toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread. *Toxicol. Pathol.* 2011; 39:186-212

Johnson EA, Svetlov SI, Wang KK, Hayes RL, Pineda JA. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats. *Exp. Brain Res.* 2005, 167:17-26

Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29:95-102

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 2007; 32:577-595

K

Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 339:1197-1203

Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302:324-329

Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, Sekine Y, Uchida Y, Ito S, Terasaki T. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res.* 2008; 25:1469-1483

Kamsler A, Daily D, Hochman A, Stern N, Shiloh Y, Rotman G, Barzilai A. Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice. *Cancer Res.* 2001; 61:1849-1854

Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10:381-391

Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J. Neurosci.* 2001; 21:5045-5053

Kaya SS, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Chopp M. Expression of cell cycle proteins (cyclin D1 and cdk4) after controlled cortical impact in rat brain. *J. Neurotrauma* 1999; 16:1187-1196

Ke C, Poon WS, Ng HK, Pang JC, Chan Y. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci. Lett.* 2001; 301:21-24

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-257

Kiechle T, Dedeoglu A, Kubilus J, Kowall NW, Beal MF, Friedlander RM, Hersch SM, Ferrante RJ. Cytochrome C and caspase-9 expression in Huntington's disease. *Neuromolecular Med.* 2002; 1:183-195

Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT, Chan PH. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; 20:119-129

Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J. Neurosci.* 2003; 23:8733-8742

Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood brain barrier leakage and active demyelination. *J. Pathol.* 2003; 201:319-327

Kirkwood SC, Su JL, Conneally P, Foroud T. Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Arch. Neurol.* 2001; 58:273-278

Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid. Redox Signal.* 2007; 9:233-244

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93:8455-8459

Klepper J, Leiendecker B. GLUT1 deficiency syndrome--2007 update. *Dev. Med. Child Neurol.* 2007; 49:707-716

Konishi Y, Bonni A. The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J. Neurosci.* 2003; 23:1649-1658

Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N, Bonni A. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol. Cell* 2002; 9:1005-1016

Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005; 28:670-676

Krizbai IA, Deli MA, Pestenacz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I, Joo F. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* 1998; 54:814-819

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 2007; 87:99-163

Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R Jr, Gorospe M, Mattson MP. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 2004; 41:549-561

Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ. Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 1999; 46:842-849

L

Lai CH, Kuo KH, Leo JM. Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005; 50:7-13

Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* 2006; 174:593-604

Leblhuber F, Peichl M, Neubauer C, Reisecker F, Steinparz FX, Windhager E, Maschek W. Serum dehydroepiandrosterone and cortisol measurements in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* 1995; 132:76-79

Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 2001; 276:251-260

Lee ST, Chu K, Park JE, Hong NH, Im WS, Kang L, Han Z, Jung KH, Kim MW, Kim M. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J. Neurochem.* 2008a; 104:1190-1200

Lee ST, Park JE, Kim DH, Kim S, Im WS, Kang L, Jung SH, Kim MW, Chu K, Kim M. Granulocyte-colony stimulating factor attenuates striatal degeneration with activating survival pathways in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res.* 2008b; 1194:130-137

Lei B, Popp S, Capuano-Waters C, Cottrell JE, Kass IS. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 2004; 125:691-701

Lewandowsky M. Zur lehre der cerebrospinalflussigkeit. *Zeitschrift Klinische Medizin* 1900; 40:480-494

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412:95-99

Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol. Cell Biol.* 2000a; 20:9356-9363

Li W, Yuan X, Nordgren G, Dalen H, Dubowchik GM, Firestone RA, Brunk UT. Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett.* 2000b; 470:35-39

Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* 1997; 765:301-312

Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2003; 2:339-345

Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, Miller CA, Atkinso RD, Tökés ZA. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neurochem.* 1996; 67:251-259

Lin B, Ginsberg MD. Quantitative assessment of the normal cerebral microvasculature by endothelial barrier antigen (EBA) immunohistochemistry: application to focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2000; 865:237-244

Lin B, Ginsberg MD, Zhao W, Alonso OF, Belayev L, Busto R. Quantitative analysis of microvascular alterations in traumatic brain injury by endothelial barrier antigen immunohistochemistry. *J. Neurotrauma* 2001; 18:389-397

Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* 2009; 16:899-909

Lipton SA. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr. Alzheimer Res.* 2005; 2:155-165

Liu DX, Greene LA. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res.* 2001a; 305:217-228

Liu DX, Greene LA. Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* 2001b; 32:425-438

Liu N, Stoica G, Yan M, Scofield VL, Qiang W, Lynn WS, Wong PK. ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes. *Lab. Invest.* 2005; 85:1471-1480

Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 2000; 113:2363-2374

Loberg RD, Vesely E, Brosius FC 3rd. Enhanced glycogen synthase kinase-3beta activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:41667-41673

Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J.* 2001; 15:758-767

Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6:591-602

Love S. Neuronal expression of cell cycle-related proteins after brain ischaemia in man. *Neurosci. Lett.* 2003; 353:29-32

Lu A, Clark JF, Broderick JP, Pyne-Geithman GJ, Wagner KR, Ran R, Khatri P, Tomsick T, Sharp FR. Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury. *Exp. Neurol.* 2008; 210:549-559

Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* 1991; 18:492-498

M

Macaluso M, Montanari M, Giordano A. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* 2006; 25:5263-5267

Majd S, Zarifkar A, Rastegar K, Takhshid MA. Different fibrillar Abeta 1-42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain Res.* 2008; 1218:224-229

Malik B, Currais A, Andres A, Towlson C, Pitsi D, Nunes A, Niblock M, Cooper J, Hortobágyi T, Soriano S. Loss of neuronal cell cycle control as a mechanism of neurodegeneration in the presenilin-1 Alzheimer's disease brain. *Cell Cycle* 2008; 7:637-646

Mandavilli BS, Boldogh I, Van Houten B. 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005; 133:215-223

Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA. Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:16254-16262

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 129:1261-1274

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Plasma testosterone in male patients with Huntington's disease: relations to severity of illness and dementia. *Ann. Neurol.* 2005; 57:520-525

Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Ognibene A, McCubrey JA. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1803:991-1002

Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L, Elling F, Norman AW, Jäättelä M. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:30738-30745

Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7:278-294

Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 2008; 60:748-766

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98:11598-11603

McClellan KA, Ruzhynsky VA, Douda DN, Vanderluit JL, Ferguson KL, Chen D, Bremner R, Park DS, Leone G, Slack RS. Unique requirement for Rb/E2F3 in neuronal migration: evidence for cell cycle-independent functions. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27:4825-4843

McLaughlin B. The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling. *Apoptosis* 2004; 9:111-121

McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J.* 2005; 24:1571-1583

Mi H, Haeberle H, Barres BA. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci.* 2001; 21:1538-1547

Michaluk P, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ.* 2007; 14:1255-1258

Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 1998; 60:121-142

Mochel F, Charles P, Seguin F, Barritault J, Coussieu C, Perin L, Le Bouc Y, Gervais C, Carcelain G, Vassault A, Feingold J, Rabier D, Durr A. Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One* 2007; 2:e647

Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.* 2006; 16:264-272

N

Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol.* 1997; 93:294-300

Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1998; 87:731-739

Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1802:167-185

Ndountse LT, Chan HM. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2009; 184:50-55

Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Després S, Kaplan DR, Julien JP. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J. Neurosci.* 2003; 23:2131-2140

Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 2003; 42:235-251

Nicotera P. Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Toxicol. Lett.* 2002; 127:189-95

Nie N, Yu JC, Fu Y, Cheng HY, Chen FY, Qu Y, Han JX. Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 378:103-107

Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawa S, Inubushi T. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci. Res.* 1997; 27:343-355

Nishino H, Nakajima K, Kumazaki M, Fukuda A, Muramatsu K, Deshpande SB, Inubushi T, Morikawa S, Borlongan CV, Sanberg PR. Estrogen protects against while testosterone exacerbates vulnerability of the lateral striatal artery to chemical hypoxia by 3-nitropropionic acid. *Neurosci. Res.* 1998; 30:303-312

Nishino H, Shimano Y, Kumazaki M, Sakurai T. Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 1995; 186:161-164

Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and betacatenin/plakoglobin. *J. Cell Sci.* 1997; 110:1013-1022

Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 2003; 161:653-660

Noyan-Ashraf MH, Brandizzi F, Juurlink BH. Constitutive nuclear localization of activated caspase 3 in subpopulations of the astroglial family of cells. *Glia* 2005; 49:588-593

Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2007; 6:411-423

Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 2000; 113:1771-1781

O

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2008; 23 Suppl 3:S548-S559

O'Donnell ME, Lam TI, Tran LQ, Foroutan S, Anderson SE. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006; 26:1234-1249

Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* 2007; 24:1745-1758

Oliveira JM. Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *J. Neurochem.* 2010; 114:1-12

Oomman S, Strahlendorf H, Dertien J, Strahlendorf J. Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. *Brain Res.* 2006; 1078:19-34

Ortega F, Pérez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2010; 67:1723-1733

Ouary S, Bizat N, Altairac S, Ménétrat H, Mittoux V, Condé F, Hantraye P, Brouillet E. Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies. *Neuroscience* 2000; 97:521-530

P

Padmanabhan J, Park DS, Greene LA, Shelanski ML. Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurosci.* 1999; 19:8747-8756

Páez MC, González MJ, Serrano NC, Shoenfeld Y, Anaya JM. Physiological and pathological implications of laminins: from the gene to the protein. *Autoimmunity* 2007; 40:83-94

Pang Z, Geddes JW. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.* 1997; 17:3064-3073

Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 2002; 5:731-736

Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:19929-19932

Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol. Biotechnol.* 2005; 30:57-70

Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1995; 20:91-127

Park DS, Levine B, Ferrari G, Greene LA. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 1997; 17:8975-8983

Park DS, Morris EJ, Bremner R, Keramaris E, Padmanabhan J, Rosenbaum M, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Involvement of retinoblastoma family members and E2F/DP complexes in the death of neurons evoked by DNA damage. *J. Neurosci.* 2000a; 20:3104-3114

Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J. Cell Biol.* 1998; 143:457-467

Park DS, Obeidat A, Giovanni A, Greene LA. Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol. Aging* 2000b; 21:771-781

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006; 443:700-704

Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 2008; 22:146-158

Planas AM, Solé S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 2001; 8:834-846

Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9:738-748

Puchowicz MA, Xu K, Sun X, Ivy A, Emancipator D, LaManna JC. Diet-induced ketosis increases capillary density without altered blood flow in rat brain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 292:E1607-1615

Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, Martínez N, López-Costa JJ, González E. Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the feto-placental unit of diabetic rats. *Free Radic. Res.* 2005; 39:1285-1293

R

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:2572-2579

Rascher G, Fishmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H. Extracellular matrix and the blood-brain-barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol.* 2002; 104:85-91

Rashidian J, Iyirhiaro GO, Park DS. Cell cycle machinery and stroke. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1772:484-493

Reynolds DS, Morton AJ. Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *J. Neurosci. Methods* 1998; 79:115-121

Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatsky M. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15:19-32

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:942-964

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* 2006; 12:440-450

S

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* 2000; 11:4131-4142

Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* 1997; 137:1393-1401

Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* 2008; 32:200-219

Sapp E, Penney J, Young A, Aronin N, Vonsattel JP, DiFiglia M. Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999; 58:165-173

Satoh H, Zhong Y, Isomura H, Saitoh M, Enomoto K, Sawada N, Mori M. Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp. Cell Res.* 1996; 222:269-274

Sawa A, Wiegand GW, Cooper J, Margolis RL, Sharp AH, Lawler JF Jr, Greenamyre JT, Snyder SH, Ross CA. Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat. Med.* 1999; 5:1194-1198

Sawa A. Mechanisms for neuronal cell death and dysfunction in Huntington's disease: pathological cross-talk between the nucleus and the mitochondria? *J. Mol. Med.* 2001; 79:375-381

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 1993; 123:513-522

Schmetsdorf S, Gärtner U, Arendt T. Constitutive expression of functionally active cyclin-dependent kinases and their binding partners suggests noncanonical functions of cell cycle regulators in differentiated neurons. *Cereb. Cortex* 2007; 17:1821-1829

Schulz M, Engelhardt B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2005; 2:8

Schwartz EI, Smilenov LB, Price MA, Osredkar T, Baker RA, Ghosh S, Shi FD, Vollmer TL, Lencinas A, Stearns DM, Gorospe M, Kruman II. Cell cycle activation in postmitotic neurons is essential for DNA repair. *Cell Cycle* 2007; 6:318-329

Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66:1453-1458

Sharp CD, Hines I, Houghton J, Warren A, Jackson TH IV, Jawahar A, Nanda A, Elrod JW, Long A, Chi A, Minagar A, Alexander JS. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003; 285:H2592–2598

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* 2003; 23:3394-3406

Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3:155-168

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399:483-487

Sieradzan KA, Mann DM. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2001; 27:1-21

Siesjö BK. Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J. Neural Transm. Suppl.* 1978; 14:17-22

Simionescu M, Simionescu N, Palade GE. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J. Cell Biol.* 1976; 68:705-723

Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27:766-791

Sisó S, Jeffrey M, González L. Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2010; 120:689-705

Song C, Zhang Y, Parsons CG, Liu YF. Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:33364-33369

Spector R, Johanson CE. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on vitamins B and E. *J. Neurochem.* 2007; 103:425-438

Squitieri F, Cannella M, Simonelli M. CAG mutation effect on rate of progression in Huntington's disease. *Neurol. Sci.* 2002; Suppl 2:S107-S108

Sternberger NH, Sternberger LA. Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84:8169-8173

Sternberger NH, Sternberger LA, Kies MW, Shear CR. Cell surface endothelial proteins altered in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 1989; 21:241-248

Stoica BA, Byrnes KR, Faden AI. Cell cycle activation and CNS injury. *Neurotox. Res.* 2009; 16:221-237

Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:24713-24718

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-446

I

Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann. Neurol.* 1999; 45:25-32

Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10:923-934

Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy. *Cell Signal.* 2008; 20:581-589

Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 2006; 9:260-267

Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7:619-627

Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95). Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998; 58:5315-5320

Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JY. Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:9613-9616

Tan X, Wang JY. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell. Biol.* 1998; 8:116-120

Taylor CJ, Nicola PA, Wang S, Barrand MA, Hladky SB. Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J. Physiol.* 2006; 576:769-785

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008; 9:231-241

Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, O' Neill C. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2009; 467:30-35

Travis J. Glia: the brain's other cells. *Science* 1994; 266:970-972

Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 2000; 7:1174-1181

Túnez I, Collado JA, Medina FJ, Peña J, Del C Muñoz M, Jimena I, Franco F, Rueda I, Feijóo M, Muntané J, Montilla P. 17 beta-Estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem. Int.* 2006; 48:367-373

Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules* 2010; 15:878-916

U

Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:44785-44794

V

Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell.* 1999; 3:159-167

Verdaguer E, García-Jordà E, Canudas AM, Domínguez E, Jiménez A, Pubill D, Escubedo E, Pallàs JC, Camins A. Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 2002; 13:413-416

Verdaguer E, Jordà EG, Canudas AM, Jiménez A, Sureda FX, Rimbau V, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J, Pallàs M, Camins A. 3-Amino thioacridone, a selective cyclin-dependent kinase 4 inhibitor, attenuates kainic acid-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience* 2003; 120:599-603

Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci.* 1997; 17:3588-3598

Vis JC, Schipper E, de Boer-van Huizen RT, Verbeek MM, de Waal RM, Wesseling P, ten Donkelaar HJ, Kremer B. Expression pattern of apoptosis-related markers in Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* 2005; 109:321-328

von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp. Cell Res.* 2006; 312:623-629

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1985; 44:559-577

Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998; 57:369-384

Vorbrodt AW. Ultrastructural cytochemistry of blood-brain barrier endothelia. *Prog. Histochem. Cytochem.* 1988; 18:1-99

W

Walling HW, Baldassare JJ, Westfall TC. Molecular aspects of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 1998; 54:301-308

Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, De Vivo DC. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15:1169-1179

Wang F, Corbett D, Osuga H, Osuga S, Ikeda JE, Slack RS, Hogan MJ, Hakim AM, Park DS. Inhibition of cyclin-dependent kinases improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22:171-182

Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000; 23:20-26

Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D. Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog. Neurobiol.* 2009; 89:1-17

Wartiovaara K, Barnabe-Heider F, Miller FD, Kaplan DR. N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 2002; 22:815-824

Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99:7951-7955

Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:467-477

Wen Y, Yang S, Liu R, Simpkins JW. Cell-cycle regulators are involved in transient cerebral ischemia induced neuronal apoptosis in female rats. *FEBS Lett.* 2005; 579:4591-4599

Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:35179-35185

Wong V. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am. J. Physiol.* 1997; 273:C1859-C1867

Woods J, Snape M, Smith MA. The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: suggestions for drug development. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1772:503-508

Y

Yamamoto T, Harada N, Kawano Y, Taya S, Kaibuchi K. In vivo interaction of AF-6 with activated Ras and ZO-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 259:103-107

Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10:1723-1733

Yang L, Sugama S, Mischak RP, Kiaei M, Bizat N, Brouillet E, Joh TH, Beal MF. A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol. Dis.* 2004; 17:250-259

Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27:697-709

Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2001; 21:2661-2668

Yang Y, Herrup K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1772:457-66

Yeste-Velasco M, Folch J, Trullàs R, Abad MA, Enguita M, Pallàs M, Camins A. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 2007; 53:295-307

Yeung D, Manias JL, Stewart DJ, Nag S. Decreased junctional adhesion molecule-A expression during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* 2008; 115:635-642

Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6:931-944

Yu F, Kamada H, Niizuma K, Endo H, Chan PH. Induction of MMP-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 2008; 25:184-195

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297:259-263

Z

Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR, Raymond LA. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol. Cell Neurosci.* 2001; 17:41-53

Zhang JW, Deb S, Gottschall PE. Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10:3358-3368

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270:3778-3786

Zhao M, Brunk UT, Eaton JW. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.* 2001; 509:399-404

Zhong Y, Enomoto K, Isomura H, Sawada N, Minase T, Oyamada M, Konishi Y, Mori M. Localization of the 7H6 antigen at tight junctions correlates with the paracellular barrier function of MDCK cells. *Exp. Cell Res.* 1994; 214:614-620

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008; 57:178-201

Zlotnik A, Gurevich B, Tkachov S, Maoz I, Shapira Y, Teichberg VI. Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Exp. Neurol.* 2007; 203:213-220