

CANVIS A L'EXPRESSIONI DELS GENS I I II DE LA CALMODULINA EN EL CERVELL DE RATA, PRODUITS PEL NEUROTÒXIC LINDANE.

Sònia Barrón, Josep M^a Tusell[†] i Joan Serratosa

Dept. Farmacologia i Toxicologia; [†]Dept. Neuroquímica. CID-CSIC. Jordi Girona 18-26. 08034 Barcelona.

RESUM

Hem estudiat, en el cervell de rata, l'expressió de dos gens diferents que codifiquen exactament per la mateixa seqüència d'aminoàcids de la calmodulina. Hem amplificat les sondes de cDNA per aquests gens i mitjançant Northern blots hem detectat canvis en la seva expressió en escorça cerebral, després d'administrar l'agent neurotòxic convulsivant lindane (γ -hexaclorciclehexà). Aquests canvis es produeixen a les poques hores d'ésser administrat el lindane. Es manifesten com una disminució de l'activitat transcripcional i sembla que hi hagi una relació dosi-resposta.

INTRODUCCIÓ

El lindane, isòmer γ del hexaclorciclehexà, és un potent plaguicida ampliament emprat i que també té aplicacions en veterinària i medicina. S'ha demostrat que aquest compost és neurotòxic a totes les espècies animals estudiades; concretament en humans i altres mamífers provoca hiperexcitabilitat, tremolors i convulsions (Joy, 1982; Wooley et al., 1985; Tusell et al., 1987). Diversos autors han proposat el canal de clor lligat al receptor GABA_A com a lloc d'acció del tòxic (Lawrence i Casida, 1984; Abalis et al., 1985). Nogensmenys diferents estudis suggereixen que també poden haver-hi altres mecanismes d'acció (Bloomquist et al., 1986). En diversos treballs hem demostrat que el lindane és l'únic isòmer del hexaclorciclehexà que activa l'expressió del c-fos. En un recent treball hem demostrat que tant el lindane com el BAY K provoquen un augment de la calmodulina al nucli de les neurones al cap d'una hora de la seva administració (Vendrell et al., 1992). En condicions normals molts processos cel·lulars són regulats pels nivells de Ca²⁺ presents al citosol, el qual no actua amb la seva forma iònica lliure, sino lligat a determinades proteïnes. La calmodulina (CaM) és la principal proteïna acceptora de Ca²⁺ en cèl·lules no musculars (Means et al., 1982). Fins ara s'han clonat del genoma de rata tres gens diferents que codifiquen per la mateixa proteïna (Nojima 1989): CaM I que s'expressa en dos mRNAs provinents de senyals de poliadanilació alternatives (1,7 i 4 kb), CaM II (1,4kb) i CaM III, igualment amb dos mRNAs (0,8 i 2,3 kb). En aquest treball presentem un estudi de l'expressió dels gens CaM I i CaM II com a resposta a l'administració del lindane.

MATERIAL I MÈTODES

A) Obtenció de sondes

Les sondes específiques dels gens CaM I i CaM II emprades en aquest treball, han estat amplificades a partir dels cDNAs insertats en un plàsmid pUC. Posteriorment s'han purificat digerint-les amb l'enzim de restricció Bam HI.

B) Tractament dels animals

El lindane ha estat dissolt en oli d'oliva i administrat oralment mitjançant sonda intragàstrica. Les rates control han estat administrades amb oli d'oliva. Els animals s'han decapitat a diferents temps post-administració. Les escorçes han estat disseccionades ràpidament i congelades a -80°C per la posterior purificació del RNA.

C) Aïllament del RNA i Northern blots.

L'obtenció del RNA s'ha fet segons el mètode de LiCl-urea (Gubits, et al., 1989). Les diferents mostres de RNA s'han fet correr en un gel d'agarosa al 1,2% i s'han transferit a una membrana de nylon. La hibridació s'ha fet tota la nit amb sondes marcades amb $[^{32}\text{P}]\alpha\text{-dCTP}$ (Amersham) seguint el mètode Oligo-labeling (Pharmacia). Les membranes han estat rentades amb diferents condicions d'astringència segons la sonda emprada i exposades dos dies a -80°C .

C) Anàlisi dels resultats

Com a control tots els northernns han estat hibridats amb una sonda del gen de l'actina. L'anàlisi de les bandes ha estat feta amb un Densitòmetre Laser (LKB). S'han comparat els quocients dels valors d'absorbància de les bandes corresponents a la CaM partits pels valors d'absorbància de les bandes de l'actina.

RESULTATS

Per poder caracteritzar l'acció del lindane sobre l'expressió dels gens de la calmodulina hem dut a terme una corba de temps, així com un estudi dosi-resposta. A la figura 1 (B,C) es presenten els Northernns de CaM II i de la actina corresponent que procedeixen del mateix gel després de tractar als animals amb una dosi convulsiva de lindane (30 mg/Kg pes corporal). A la Figura 2 es mostren els resultats

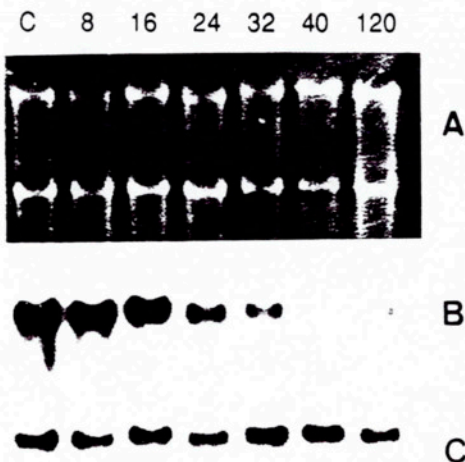


Figura 1. Expressió de CaM II. Els números indiquen les hores després de l'administració de lindane (30 mg/kg pes corporal). A: càrrega del gel; B: CaM II; C: Actina.

de les diferents dosis estudiades al llarg del temps. A dosis no convulsives ens trobem en dues situacions: a 10 mg/kg de pes corporal, dona un increment significatiu de l'expressió del gen CaM II a partir de les 24 hores de l'administració del lindane. Aquest increment es manté a les 40 hores de l'administració: a 20 mg/kg, no hi ha canvis significatius de l'expressió. A dosi convulsiva (30 mg/Kg) hi ha una forta disminució dels valors basals de transcripció que es comença a detectar a les 24 hores i es manté fins a les 40.

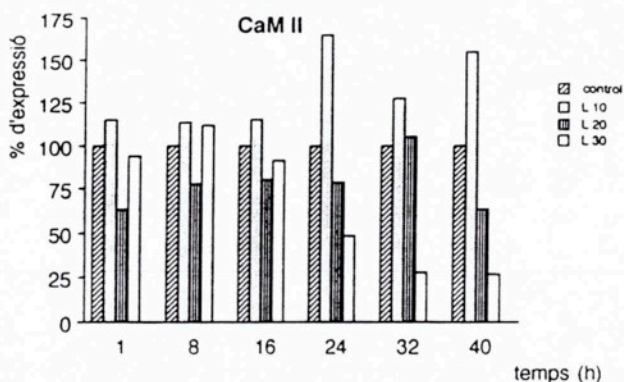


Figura 2. Expressió de CaM II. L 10, L 20, L 30 indiquen les dosis de lindane (mg/kg) a diferents temps (hores) després de l'administració. L'ordenanda indica el % respecte els valors control.

A la figura 3 es veu un Northern del gen CaM I corresponent als animals tractats a dosi convulsiva. Es poden observar les dues bandes descrites (1,7 i 4 kb). En aquest cas, la disminució d'expressió la tenim principalment a la banda de 4 kb, tot i que , tal com mostra la figura 4, els valors relatius de densitat òptica de les dues bandes varien poc.

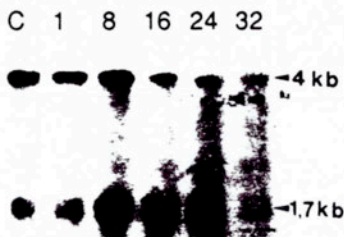


Figura 3. Northern de CaM I. Els números indiquen el temps després de l'administració de lindane a dosi convulsiva.

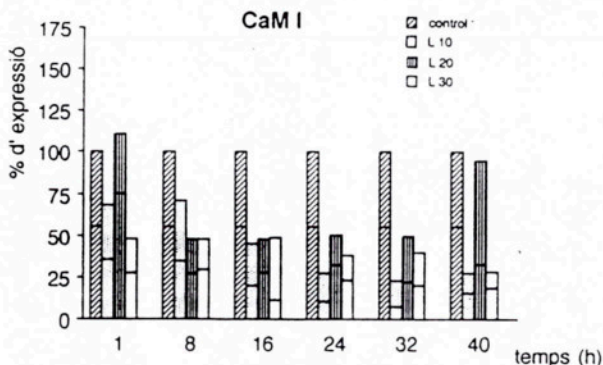


Figura 4. Expressió de CaM I en les mateixes condicions que a la Figura 2. La part superior de les barres representa la banda de 4 kb i la part inferior la de 1,7.

DISCUSSION

El treball que presentem és un estudi preliminar sobre la possible afectació diferencial de dos gens que codifiquen per la calmodulina. Els nivells d'expressió basal d'aquests gens que hem trobat a l'escorça de cervell, coincideixen amb els d'altres estudis referits a la distribució cerebral de l'activitat de la calmodulina (Zhou et al., 1985) i a la localització per hibridació *in situ* dels mRNA del gen CaM I. D'altra banda, hi ha treballs que presenten modificacions de l'expressió d'aquests gens durant el desenvolupament i a cel·lules transformades (MacManus et al., 1989). Aquestes modificacions a vegades són increments de l'expressió i d'altres, decrements. Els nostres resultats indiquen que a dosis baixes de lindane (10 mg/kg) hi ha un increment de l'expressió del gen CaM II mentre que a dosis convulsives (30 mg/kg) hi ha una forta disminució tant de CaM I com de CaM II i que es manté després de bastantes hores de l'administració de l'agent neurotòxic. No sabem quines són les conseqüències ni el per què de d'aquests canvis. No obstant, cal dir que donada la diversitat de funcions de la calmodulina al cervell, un canvi en els nivells de transcripció podria significar una variació dels nivells de calmodulina i això podria repercutir en l'activitat d'enzims calmodulina dependents com la proteïna quinasa II, la calcineurina, MLCK, etc. De fet hi ha estudis en que els efectes tòxics de metalls com el zenc es tradueixen en una inhibició de la fosforilació en general i de l'activitat de la proteïna quinasa II calmodulina dependent. El nostre treball encara no permet aportar res en aquest sentit però el fet de que un agent com el lindane, que modifica els fluxes neuronals de calci, provoqui canvis a l'expressió dels gens de la calmodulina, permetrà aportar coneixements sobre els mecanismes d'acció dels agents convulsivants així com sobre els esdeveniments que són conseqüència de la seva acció.

AGRAÏMENTS

Sònia Barrón és becària P.F.P.I. del Ministeri d'Educació i Ciència. Aquest treball ha estat possible gràcies als ajuts SAL-89-0926 de la CICYT i AR91-118 de la CIRIT.

BIBLIOGRAFIA

- Abalis, I.M., Eldefrawi, M.E. i Eldefrawi, A.T. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, 34: 579-2582.
Bloomquist, J.R., Adams, P.M. i Soderlund, D.M. (1986) *Neurotoxicol.*, 7:11-20.
Gubits, R.M., Smith, T.M., Fairhurst, J.L. i Yu, H. (1989) *Mol. Brain Res.*, 6, 39-45.
Joy, R.M. (1982) *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 4: 813-823.
Lawrence, L.J. i Casida, J.E. (1984) *Life Sci.*, 35: 175-178.
MacManus, J.P., Gillen, M.F., Korczak, B. i Nojima, H. (1989) *BBRC.*, 159: 278-282.
Means, A.R., Tash, J.S., Chafouleas i J.G. (1982) *Physiol. Rev.*, 62: 1-39.
Nojima, H., (1989) *J. Mol. Biol.*, 208: 269-282.
Tusell, J.M., Suñol, C., Gelpí, E. i Rodríguez-Farré, E. (1987) *Arch. Toxicol.*, 60: 432-437.
Vendrell, M., Pujol, M.J., Tusell, J.M. i Serratosa J. (1992) *Mol. Brain Res.*, En premsa.
Wooley, D., Zimmer, L., Dodge, D. i Swanson, K. (1985) *Neurotoxicology*, 6: 165-192.
Zhou, L-W., Moyer, E.A., Muth, E.A., Clark, B, Palkovits, M. i Weiss, B. (1985) *J. Neurochem.*, 44: 1657-1662.