

Identificació i caracterització de factors implicats en la protecció i en la regeneració del múscul esquelètic de ratolí sotmès a necrosi-regeneració crònica.

A la Clara, pel teu somriure...

i a la meva família.

Agraïments:

En el món actual, sens dubte, poder-te dedicar al que t'agrada és tot un privilegi, especialment quan estem parlant de recerca. És per aquest motiu, que haig d'agraïr especialment a les persones que em van permetre d'iniciar el meu camí com a científic, en definitiva, per haver confiat en mi. A Manel Roig, co-director d'aquesta tesi, per haver-me proporcionat un projecte, una beca, un laboratori i per haver compartit amb mi el seu saber sobre la regeneració del teixit muscular. A la Francina Munell per haver estat co-directora d'aquesta tesi, pel seu suport tècnic, la seva cordialitat i la seva simpatia. També el meu sincer agraïment a Jaume Reventós per haver-me permès de treballar en el seu laboratori.

Poder presentar una tesi doctoral és acabar una part d'un llarg trajecte. Però arribar a fer un dels cims, és ben poca cosa, si no has pogut gaudir del camí que t'hi ha conduït. Afortunadament, he comptat amb el suport d'uns excepcionals companys de viatge que m'han donat motius més que suficients per fruit de la sinuosa ruta. Començant per l'Arnau que, qui apart de regalar-me tot el seu saber sobre el teixit muscular i els ratolins mdx, ha estat un referent, un company, un amic. Igualment, voldria dedicar un agraïment molt especial a la resta de companys amb qui també he tingut ocasió de compartir laboratori i experiències: començant pel Laboratori 16: amb en Jesús (*tot un Aragorn del disseny gràfic*), la Marta amb en Joan i l'Isac-anxoveta René (*als tres, moltes gràcies per iniciar-me en l'art de l'escalada*), l'Àlex (*gràcies per la teva simpatia, i també pel teu suport informàtic!*) en Mariano (*on està el Ché de Bifurca?*), en Víctor (*com se t'assembla el petitó Marc*), en Tomàs (*que el poder de la força t'acompanyi*), en JC (*piano, piano, arriba lontano*), l'Andreu (*I quins sopars!*), en Jordi (*el millor cap d'expedició per pujar el Puigmal. De moment!*), l'Alba (*mba eichapa reimé!*), la Patricia (*Patricina pels amics*), l'Angel (*"el hombre que susurraba a los siluros"*), la Maite O., en Toni, en David i l'Òscar, la Sole, l'Anna, la Rosanna, la Maite Q., l'Antònia, la Cristina E., la Carme, en Josep....; en el laboratori de Neurologia: l'Esther, la Roser, l'Estel, l'Anna i la Maite, l'Alfons, l'Anna, la Mireia, la Margarita i en Víctor (*gràcies pel vostre suport i la vostra companyia*); en el Laboratori 14: en Nour (*ante la duda?...*), la Vane (*Wie geht es Ihnen?*), l'Anna, la Johanna, la Marta Ch., la Déborah (*que bueno está el mate!!*), la Raquel, els MegaVikings Michael, Sara i Alma (*el tai self!!*, *que grandes sois!!*) i en Tim; a les companyes de les antípodes de la planta: la Pilar, l'Anna, la Vanessa, l'Olga, la Isabel, la Maruja i la Carmen; als veïns del Laboratori 2, l'Anna, la Cristina, en Joan, l'Olga, en David

(*el noi del pont del llac*), en Lluís, en Hafid, en Tòfol, en Ricardo (*farem un partidet?*); a la senyora Maria, l'Antonio i la Silvia; als companys de l'IRO/CRG: Pura, Mònica, Fredi, Erika, Maribel, Luciano i tota la resta...; al grup de Receptors del departament de Bioquímica de Químiques de la UB, on vaig poder fer les primeres passes en el món de la recerca, moltes gràcies per tot.

i a la planta 15 , també un sincer agraïment pels ratolins de la soca mdx.

Moltes gràcies a tots, he après molt amb vosaltres. I recordeu, com va dir *Picasso*: fan falta molts anys per arribar a ser jove.

Un agraïment especial pels amics de la colla de la Facultat de Biologia. Tan en les Biomarxes, com en els inoblidables sopars al Pizza Hut de Diagonal, les excursions...heu posat el llistó molt amunt. I el que és més difícil, heu mantingut viva (i de quina manera) una amistat fora de l'àmbit on es va iniciar. Per ordre alfabètic:

Àlex, Àngels, Dani, David, Guillem, Iñaki, Judith, Lluís, Marta A., Marta B., Miguel, Pep, Pol, Sandra, Silvia, Tere i Víctor. Estic en deute amb tots vosaltres, per tants bons moments que m'heu permès de viure al vostre costat. Us asseguro que, tot i que no ens podem retrobar tan sovint com voldriem, el vostre record sempre em fa companyia, com una part més de mi mateix.

A tots els companys musicals per permetre'm de gaudir amb ells produïnt l'única cosa que neix i es manté sempre lliure: la música.

A la meva família: pares, germans, tiets, avis, sogres, cunyats, nebots.....moltes gràcies pel vostre suport incondicional. Sense vosaltres no ho hauria aconseguit.

A la Clara, pel teu suport incondicional, per compartir amb mi la teva vida i per permetre'm gaudir diàriament del teu somriure.

Que tingueu molta sort, i que us trobi preparats per aprofitar-la.

ÍNDICE

ÍNDEX	1
INTRODUCCIÓ	9
1 - Estructura funcional del múscul esquelètic	10
1.1 - Nivell macroscòpic.....	10
1.2 - Nivell ultraestructural.....	11
1.3 - Nivell molecular.....	12
2 - Regeneració del múscul esquelètic	14
2.1 - Fase inflamatòria.....	14
2.1.1 - <i>Formació de la membrana de demarcació o quall</i>	14
2.1.2 - <i>Fagocitosi de les restes fibril.lars</i>	15
2.1.3 – <i>Revascularització</i>	16
2.2 - Fase de replicació. La cèl.lula precursora del múscul: la cèl.lula satèl.lit.....	17
2.2.1- <i>Origen</i>	18
2.2.2 – <i>Propietats</i>	19
2.2.3 - <i>Fase de replicació</i>	20
2.3 - Diferenciació i fusió (de cèl.lula satèl.lit a mioblast i de mioblast a miotub).....	21
2.3.1 - <i>Diferenciació (de cèl.lula satèl.lit a mioblast)</i>	21
2.3.2 - <i>Fusió (de mioblast a miotub)</i>	21
2.4 - Maduració (de miotub a miofibra).....	22
2.5 – El sistema del plasminògen i les metaloproteases en la regeneració muscular.....	22
3 - La distròfia muscular de Duchenne (DMD)	24

3.1 - Característiques generals.....	25
3.2 – Evolució Clínica de la DMD.....	25
3.3 – Patologia de la DMD.....	26
4 - La distrofina: el gen i la proteïna.....	27
4.1 - Estructura del gen.....	27
4.1.1 - <i>Promotors alternatius</i>	28
4.1.2 – <i>Processaments alternatius del mRNA</i>	29
4.2 - Estructura de la proteïna.....	29
5 - El complex de proteïnes associades a la distrofina.....	31
5.1 - Els sarcoglicans.....	31
5.2 - Els distroglicans.....	33
5.3 - Les sintrofines.....	34
5.4 - La proteïna sarcospan.....	35
6 - Proteïnes de la família de la distrofina. Estructura molecular i relació amb la distrofina.....	36
6.1 – Distrobrevina.....	37
6.2 – Proteïna relacionada amb la distrofina 2 (DRP-2).....	37
6.3 - Utrofina (DRP, DRP1): Estructura comparada a la distrofina.....	38
7 - Models animals de la DMD.....	40
7.1 - El gos distròfic.....	40
7.2 - El gat distròfic.....	41
7.3 - El ratolí mdx.....	42
7.3.1 - <i>Descobriments i caracterització de la soca mdx</i>	43
7.3.2 – <i>Evolució de la patologia del ratolí mdx</i>	44
7.3.3 - <i>La utrofina i el ratolí mdx</i>	46

7.3.4- Anatomia del grup muscular del gastrocnemi (GMG) del ratolí.....	47
OBJECTIUS.....	9
MATERIALS I MÈTODES.....	53
1 – Animals.....	54
1.1 - Soques C57Bl10/ScSn-mdx (mdx) i C57BL/10ScSn (control).....	54
1.1.1 - Obtenció de les soques.....	54
1.1.2 - Identificació del fenotip/genotip.....	55
1.2 - Les soques uPA-/-, tPA-/- i C57BL/6 (control).....	57
1.2.1 – Obtenció de les soques.....	57
1.2.2 - Inducció de la regeneració muscular.....	57
1.2.3 - Desfibrinogènesi sistèmica.....	58
1.3 - Establiment del doble mutant mdx-uPA-/-.....	59
1.3.1 – Encreuaments.....	59
1.3.2 – Identificació del fenotip/genotip.....	60
2 - Processament de les mostres musculars de ratolí.....	61
3 -Tincions histològiques.....	62
4 – Morfometria.....	63
5 - Tècniques immunohistoquímiques.....	64
6 - Microscopia electrònica.....	65
7 - Western-blots per MMP-9, MHCd (200 KDa), utrofina (400 KDa) i β-distinglicà(43KDa).....	65
8 - Extracció de RNAs.....	66

8.1 - Extracció de RNA total.....	66
8.2 - Extracció de RNA missatger.....	67
9 - RT-PCR.....	67
9.1 – Retrotranscripció.....	67
9.2 - Amplificació per reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) dels Gens control.....	67
9.3 - Amplificació per PCR de la utrofina, la DRP2, la β -espectrina, la banda 2 (B2) i CD63.....	68
9.4 - Amplificació per PCR de les isoformes de la utrofina.....	69
10 - Northern-blots.....	70
11 - RAP-PCR (<i>random arbitrarily primed-polymerase chain reaction</i>).....	71
11.1 - Retrotranscripció del mRNA.....	71
11.2 - Reacció de PCR.....	72
11.3 - Separació del producte per electroforesi desnaturalitzant en poliacrilamida al 6%, tallat i eluït de les bandes.....	73
11.4 - Reamplificació, clonació i seqüenciació.....	73
11.5 - Allargament de les seqüències per 5'-RACE.....	73
RESULTATS.....	75
1 - Cronopatologia del ratolí mdx.....	76
1.1 - Classificació i contatge de grups degeneratius-regeneratius (GDR)....	76
1.2 - Evolució del percentatge de fibres amb nucli no perifèric (NNP).....	79
1.3 – Acumulació de col.làgens fibril.lars.....	81
1.4 - Variació de la grandària de les fibres.....	83

1.5 – Presència de mastòcits.....	85
1.6 - Anàlisi de l'expressió de la metaloproteasa-9 (MMP-9) i Miosina del desenvolupament (MHCd).....	87
2 – La utrofina com a substitut de la distrofina en el múscul del ratolí mdx.....	88
2.1 - Evolució de l'expressió d'utrofina a nivell de proteïna.....	88
2.2 - Evolució dels nivells de β -dystroglicà.....	90
2.3- Correlació entre els nivells de utrofina i els de β -dystroglicà.....	90
2.4 – Presència d'una possible isoforma alternativa de la utrofina en els ratolins mdx.....	91
2.4.1 – <i>Detecció de doble banda per western-blot</i>	91
2.4.2 - <i>Búsqueda de isoformes de mRNA produïdes per processament alternatiu (splicing)</i>	92
2.5 - Evolució dels nivells de mRNA de proteïnes estructuralment relacionades amb la distrofina en els ratolins mdx i controls adults.....	93
3 - El paper de uPA en la regeneració muscular.....	96
3.1 – El paper de uPA després d'una lesió experimental.....	96
3.1.1 - <i>Inducció de l'expressió del mRNA de uPA després d'una lesió muscular</i>	96
3.1.2 - <i>Expressió dels mRNAs de MyoD i miogenina en el múscul en regeneració del ratolí deficient en uPA</i>	97
3.1.3 – <i>La regeneració muscular sense uPA</i>	98
3.1.4 - <i>Efectes de la carència de uPA en la resposta inflamatòria després d'una lesió muscular</i>	101
3.1.5 - <i>Increment en l'acúmul de fibrina en el múscul lesionat del ratolí deficient en uPA</i>	103

3.2 - El doble mutant mdx-uPA-/-.....	105
3.2.1 - Mortalitat de la soca.....	105
3.2.2 - Creixement de la soca.....	107
3.2.3 - Característiques patològiques musculars del doble mutant mdx-uPA-/-.....	108
3.2.4 - Presència de grups necròtics.....	110
3.2.5 – Percentatge de fibres amb nucli no perifèric (NNP).....	111
3.2.6 – Caracterització anatòmica de les fibres necròtiques no fagocitades.....	112
3.2.6.1 – Tincions de Von Kossa, Pearls i PAS.....	112
3.2.6.2 - Microscopia electrònica.....	114
4 - Expressió diferencial de gens en el múscul esquelètic del ratolí mdx.....	115
4.1 - Seqüències amb homologia amb enzims.....	115
4.2 - Seqüències amb homologia amb interleuquines.....	116
4.3 - Seqüències amb homologia amb proteïnes transmembrana.....	117
4.4 - Seqüències amb homologia amb clons.....	118
4.5 - Seqüències sense identitat inicial significativa amb cap seqüència coneguda.....	119
5 - Caracterització de l'expressió de la Banda 2 (B2).....	121
5.1 - Expressió <i>in vivo</i> en ratolins mdx i controls.....	123
5.2 - Expressió <i>in vitro</i> durant la diferenciació de la línia mioblàstica murina C2C12.....	125
6 - Caracterització de l'expressió de CD63 (Banda 3).....	127
6.1 - Expressió <i>in vivo</i> en ratolins mdx i controls.....	127
6.2 - Expressió <i>in vitro</i> durant la diferenciació de la línia mioblàstica murina	

C2C12.....	128
DISCUSSIÓ.....	131
1 - Cronopatologia del ratolí mdx.....	131
2 - Paper de la utrofina i del β-dístroglicà.....	137
3 - Paper de la proteasa uPA en la regeneració muscular.....	142
4 - Identificació de noves proteïnes implicades en la regeneració muscular.....	147
CONCLUSIONS.....	151
REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.....	155

INTRODUCCIÓ

1 - Estructura funcional del múscul esquelètic

El múscul esquelètic és un òrgan especialitzat en la generació instantània de moviment i força en una direcció específica en resposta a un estímul. La seva estructura altament ordenada, tan a nivell macroscòpic com a nivell ultraestructural i molecular, és una conseqüència directa d'aquesta funció tan específica.

1.1 - Nivell macroscòpic:

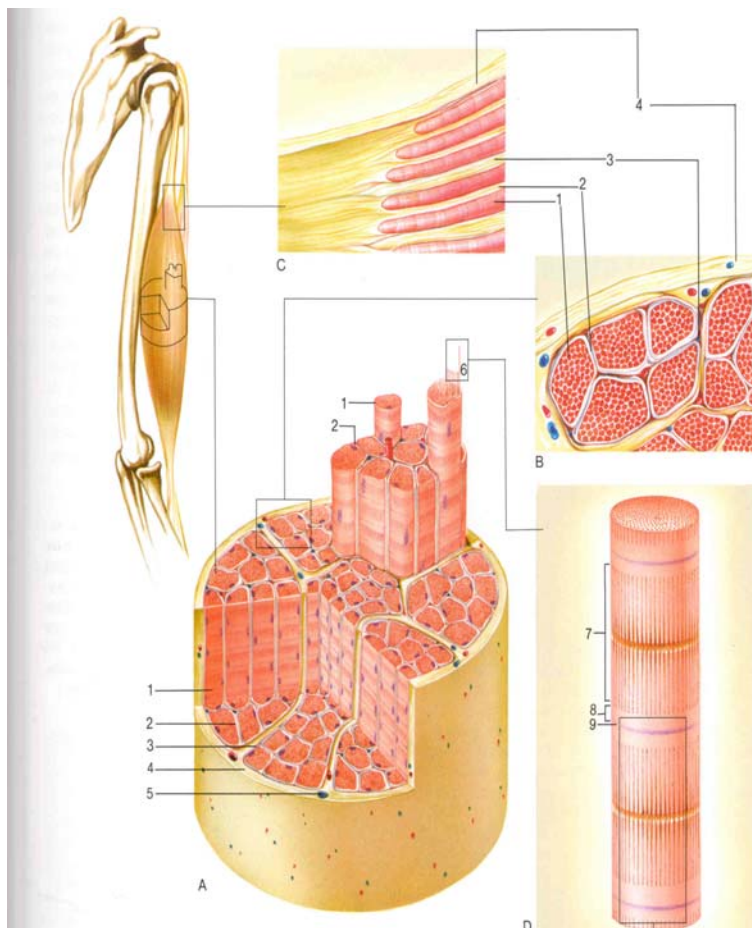


Figura 1 - Estructura macroscòpica del múscul esquelètic: La capacitat contràctil del múscul és possible gràcies a la complexa estructura que permet la funció coordinada de tots els seus elements. En l'esquema es mostra l'estructura del múscul estriat: A: visió tridimensional d'una porció de múscul; B: tall transversal d'un fascicle muscular; C: Tall longitudinal de l'unió entre tendó i múscul; D: visió tridimensional d'una miofibril·la. Elements musculars: 1: fibra muscular, 2: endomisi, 3: perimisi, 4: epimisi, 5: vasos sanguinis, 6: miofibril·la, 7: banda A, 8: banda I, 9: disc Z (Dibuix: Fors J, *Enciclopèdia de medicina i salut, Enc. Catalana*).

Una bona part dels organismes pluricel·lulars són capaços de generar força i desplaçar-se gràcies a un teixit especialitzat en la contracció mitjançant la qual pot generar moviment i/o força. Són molts els músculs que componen un organisme com pot ser el dels mamífers, i molt diversos els seus tamanys i formes. En termes generals però, tal i com s'esquematitza en la figura 1, al voltant de tots els músculs de l'organisme hi trobem una vaina col·lagenosa que rep el nom d'epimisi. Cada múscul està compost per diferents fascicles musculars. Cada fascicle muscular està envoltat d'una vaina intersticial anomenada perimisi. El perimisi conté branques nervioses, vasos sanguinis i cèl·lules adiposes. Cada fascicle muscular està compost de fibres musculars, envoltades cada una d'elles pel seu endomisi, format per la làmina basal, capil·lars, branques nervioses simpàtiques i motores fines, fibroblastes, mastòcits, macròfags i una xarxa de fibril·les de col·lagen (lamina reticular) (Mayne R 1985, Sanes JR 1994).

1.2 - Nivell ultraestructural:

Encara que en el teixit muscular podem trobar molts altres tipus cel·lulars dels que parlarem més endavant, la unitat cel·lular capaç de produir el moviment contràctil és la fibra muscular estriada. La fibra muscular estriada dels vertebrats, típicament amb un diàmetre de 10 a 100 µm, té naturalesa sincicial multinucleada i està envoltada per una sola membrana cel·lular anomenada específicament sarcolema. Cada fibra empaqueta nombroses miofibril·les, de 1 a 3 micres de diàmetre, cada una d'elles envoltada per membrana de reticle sarcoplasmàtic. Les miofibril·les es disposen paral·leles a l'eix de la fibra que les conté i presenten una aparença estriada. El patró de les estries de la miofibril·la es repeteix amb una periodicitat de 2 a 3 micres. Els patrons de les estries de totes les miofibril·les estan acompassades, donant en conjunt també un aspecte estriat a la fibra muscular que componen. La unitat mínima que es va repetint en els patrons d'estries rep el nom de sarcòmer i es pot considerar com la unitat contràctil mínima. El coneixement de l'estructura sarcomèrica ens

permet entendre el mecanisme de la contracció muscular. Quan observem una miofibril·la al microscòpi electrònic (Fig. 2) hi podem distingir una sèrie de bandes. Així, flanquejant el sarcòmer per ambdós costats hi trobem una banda fina (0,1 μm de gruix) i fosca anomenada banda Z. Cada banda Z es disposa en el centre de la banda I, amb un gruix de 1 μm i té una coloració clara, i que es comparteix entre sarcòmers adjacents. Al centre de cada sarcòmer es troba una banda fosca de 1,6 μm de gruix anomenada banda A, la qual està biseccionada per una zona menys densa que correspon amb la banda H. La banda H conté una fina línia electrodensa anomenada línia M (Engel AG 1994).

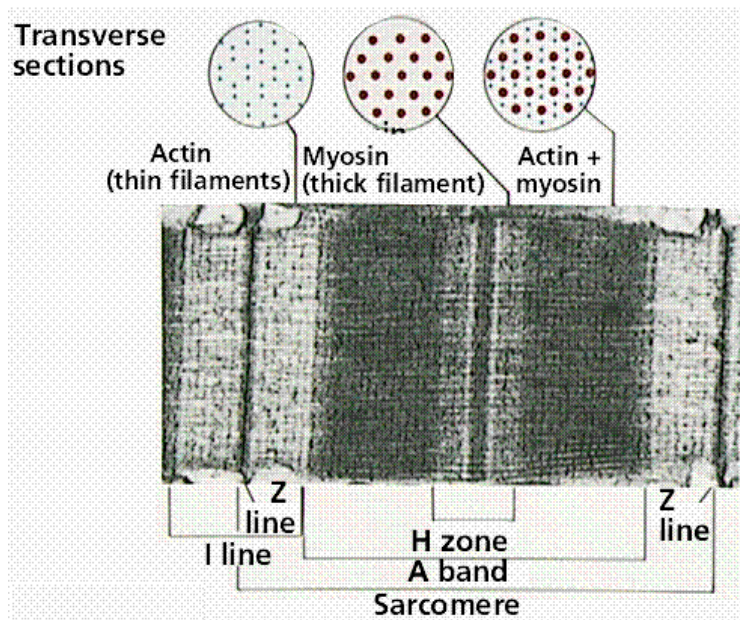


Figura 2 - Ultra-estructura del múscul estriat. Imatge de microscopia electrònica on es mostren els diferents patrons de bandes i línies que donen l'estructura estriada al múscul esquelètic. En la part superior es mostra gràficament com serien les seccions transversals en diferents zones del sarcòmer. Aquestes seccions transversals venen condicionades per la presència d'actina (filaments primers) i/o de miosina (filaments gruixuts).

1.3 - Nivell molecular:

Aquest patró de bandes presentat en l'apartat anterior, respon perfectament a l'estructura funcional del sarcòmer i a la disposició sarcomèrica de diferents proteïnes per tal de permetre els mecanismes de la contracció muscular. Així, les bandes A corresponen als filaments de miosina, mentre que les bandes I corresponen als miofilaments d'actina. La miosina és la proteïna principal que compona els miofilaments gruixuts. Cada miofilament gruixut està compost per varis centenars de molècules de miosina. En canvi, l'actina

filamentosa és qui conforma majoritàriament els miofilaments prims (Hasselbach W 1953, Hanson J 1953). La molècula de miosina conté dos dominis globulars units a un domini de doble cadena en hèlix- α . (Lowey S 1969).

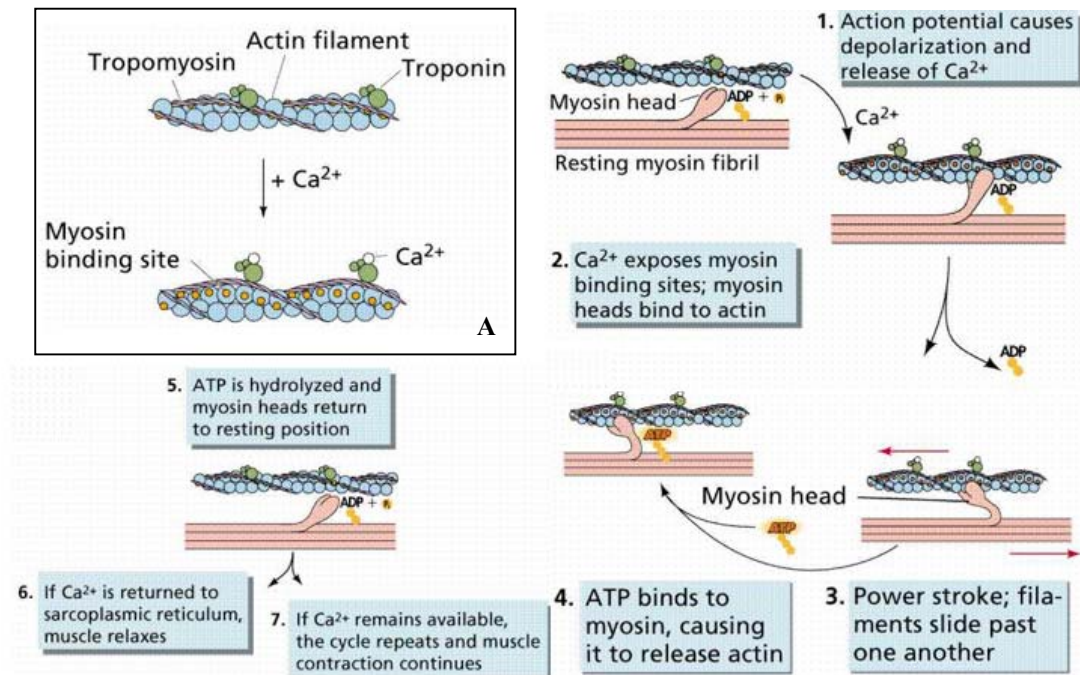


Figura 3 - Mecanisme contràctil del múscul esquelètic. Requadre A: La unió de calci a la troponina promou un canvi conformacional de la tropomiosina, deixant exposats els llocs d'unió a miosina de l'actina. 1: L'arribada d'un potencial d'acció provoca la despolarització de la membrana de la fibra muscular i l'alliberament de calci (Ca^{2+}). 2: El Ca^{2+} exposa els llocs d'unió a miosina de l'actina, permetent així que els caps de miosina s'uneixin a l'actina amb l'hidròlisi d'ATP. 3: Els filaments es desplacen gràcies als canvis conformacionals que experimenten i s'allibera el ADP. 4: La unió d'un nou ATP fa que la miosina s'alliberi de l'actina. 5: La hidròlisi de l'ATP retorna els caps de miosina a la posició de repòs. 6 i 7: Si resta Ca^{2+} en el medi el cicle es repeteix. Si el Ca^{2+} retorna al reticle sarcoplàsmic el múscul es relaxa.

La miosina s'uneix a l'actina mitjançant el seu domini globular, i l'activitat ATPasa resideix també en aquest mateix domini (Szent-Gyorgyi A 1953, Huxley HE 1963). Els miofilaments prims estan composts de dobles cadenes d'actina filamentosa, conformada cada cadena per multitud de monòmers d'actina globular (Hanson J 1963, Huxley HE 1963). En els miofilaments prims també hi trobem la tropomiosina i la troponina. La tropomiosina es disposa al voltant de les cadenes d'actina de forma helicoidal, amb una periodicitat d'uns 400

Armstrongs (Hanson J 1963). La troponina està formada de tres monòmers, el primer dels quals disposa d'un lloc d'unió a calci d'alta afinitat, un segon mostra una funció inhibidora de l'activitat ATPasa de la miosina i un tercer que porta a terme la unió del complex amb la tropomiosina. Tal i com s'esquematitza en la figura 3, la seva funció és la regulació de la contracció en resposta a calci, permetent la contracció només en presència d'aquest ió (Ebashi S 1967, 1968, Tonomura Y 1969, Wilkinson JM 1972).

2 - Regeneració del múscul esquelètic

El fenomen mitjançant el qual es reconstrueix un teixit després d'una lesió rep el nom de regeneració. La regeneració muscular presenta algunes característiques pròpies degut a la seva estructura altament especialitzada. La naturalesa sincicial de les fibres musculars i la presència d'una làmina basal al voltant de cada una de les fibres són els factors principals que condicionen el seu comportament particular en la regeneració (Gorospe JRM 1996). La regeneració es pot dividir en diferents fases, amb el ben entès de que existeix una gran interrelació i un alt grau de solapament temporal entre les diferents fases.

2.1 - Fase inflamatòria:

2.1.1 - Formació de la membrana de demarcació o quall:

Després de produir-se una lesió en una o varies fibres musculars, per tal d'evitar que la necrosi s'estengui cap a zones no lesionades, el múscul reacciona aïllant el més ràpidament possible la zona lesionada de la zona sana. Això ho fa mitjançant la formació del que es coneix com a membrana de demarcació o quall que es forma a partir de les porcions adjacents no lesionades de la fibra (Grounds MD 1991). Utilitzant diferents noxes per tal de produir necrosi, diferents autors han establert que la membrana de demarcació es formaria entre les 3 i les 21 hores post-noxa (Karpati G 1974, Carpenter S 1989, Papadimitriou JM 1990, Grounds

MD 1991). De la composició bioquímica de la membrana de demarcació només se'n coneix la seva composició fosfolipídica (Carpenter S 1989).

2.1.2 - Fagocitosi i proteòlisi de les restes fibril.lars:

La fagocitosi i la proteòlisi de les restes fibril.lars són pre-requisits fonamentals per aconseguir la correcta regeneració del múscul esquelètic. Les cèl.lules inflamatòries del tipus neutròfil activats per la noxa, envaeixen el lloc danyat i promouen la inflamació per l'alliberament de citoquines que atreuen i activen altres cèl.lules inflamatòries (Tidball JG 1995). En aquest procés d'eliminació de restes cel.lulars hi intervenen primer els leucòcits, els quals van essent progressivament substituïts al voltant de les 24 hores post-noxa pels macròfags mononuclears (Papadimitriou JM 1990, Carpenter S 1989, Orimo S 1991, Gorospe JRM 1996). Els macròfags juguen un paper fonamental en la regeneració muscular però no només pel fet de la fagocitosi, sinó també per l'alliberament de substàncies moduladores del comportament de les cèl.lules precursors del múscul (cèl.lules satèl.lit). Entre aquestes substàncies hi figuren el grup de proteïnes que formen el Complement, i mediadors quimiotàctics com fosfolípids de membrana (alliberats per la mateixa ruptura de les membranes) (Tidball JG 1995) i citoquines. Altres molècules produïdes per mastòcits (Gorospe JRM 1996) i plaquetes (Grounds MD 1991) també hi juguen un paper fonamental.

Conjuntament amb la fagocitosi, es produeix una digestió de les restes fibril.lars per part de proteases intrínseques de la fibra que col.laboren en l'eliminació del material necrosat (Bischoff R 1994). Segons Stoward i cols., aquestes proteases es troben en el perineuro, en les cèl.lules intersticials i a l'endoteli capil.lar. També en l'endomisi i el perimisi, sobretot els 5 primers dies post-noxa. Entre el 5è i el 14è dia post-noxa també presenten activitat proteasa els miotubs i fibres regenerants. Als 21-28 dies post-noxa encara hi ha certa activitat proteasa.

En general, l'activitat dipeptidasa (un tipus concret de proteasa) disminueix al ritme que progressa la maduració de les fibres musculars (Stoward PJ 1988). En un estudi portat a terme en ratolí, Kherif i cols. demostren l'existència d'una metaloproteïnasa constitutiva (MMP-2) sintetitzada per cèl.lules miogèniques, i una metaloproteïnasa no constitutiva (MMP-9), el mRNA de la qual s'indueix fortament a les 24 hores d'injecció amb cardiotoxina i es manté present durant varis dies (pic màxim als 7 dies post-noxa), per a tornar després a la normalitat. La MMP-9 seria sintetitzada per les cèl.lules inflamatòries i per les cèl.lules satèl.lit (Kherif S 1999).

2.1.3 - Revascularització:

La revascularització del múscul lesionat o trasplantat és també un dels elements que condiciona la correcta regeneració muscular (Bodine-Fowler S 1994). A més, es considera que l'èxit o el fracàs de la revascularització es correlaciona amb l'absència o presència de fibrosi, respectivament (Grounds MD 1991, Roig M 1998). En el trasplantament de múscul sencer, Faulkner afirma que els vasos de la perifèria de l'empelt, adjacents a teixit viu de l'hoste sobreviuen. A les 24 hores post-trasplantament, aquests vasos perifèrics de l'empelt tenen aspecte normal. A les 48 hores, aquests vasos supervivents de l'empelt han fet brots que s'extenen cap a l'hoste. Entre les 48 i 60 hores, anastomosis entre aquests vasos i els que procedeixen de l'hoste restableixen la circulació sanguínia. Als 3 dies post-noxa, d'un 40 a un 60% de l'empelt ja presenta vasos sanguinis. Faulkner i cols conclouen que alguns vasos sobreviuen al trasplantament i que la circulació en l'empelt es restableix per les anastomosis entre els brots procedents de vasos de l'empelt i els vasos de l'hoste (Faulkner JA 1983). A les 24 hores post-noxa, algunes cèl.lules endotelials ja s'han separat del vas. A les 36 hores post-noxa s'observen mitosis en algunes d'aquestes cèl.lules endotelials. Als 2 dies, apareixen vasos sanguinis de petit diàmetre. Als 3 dies es restableix la circulació sanguínia. Entre els 3 i

5 dies post-noxa no hi ha canvis significatius en l'estructura dels vasos. El 5è dia post-noxa els vasos són grans però no hi ha cap altra diferència amb els capil·lars control (Weiss SW 1983). Estudis més recents fets amb el model de necrosi basat en el trasplantament de múscul, coincideixen en que el moment de restablir la circulació sanguínia és al voltant del tercer dia post-noxa (Lawson-Smith MJ 1997). La recuperació de l'estructura i la funció d'un múscul trasplantat depèn del temps i de la quantitat de revascularització. El creixement dels vasos sanguinis es produeix de forma centrípeta a l'empelt i precedeix a la regeneració de la fibra (Burton HW 1987).

2.2 - Fase de replicació. La cèl.lula precursora del múscul: la cèl.lula satèl.lit:

La primera descripció de la cèl.lula satèl.lit va ser probablement feta per Waldeyer l'any 1865 (Waldeyer W 1865). Però el nom de cèl.lula satèl.lit va ser introduït en la literatura per Mauro l'any 1961, a l'observar que aquestes cèl.lules en el seu estat quiescent estaven situades al voltant de la membrana plasmàtica de les fibres musculars, ocupant l'espai entre aquesta i la làmina basal (Mauro A 1961). Les cèl.lules satèl.lit (cèl.lules de reserva tipus mioblast), anomenades també cèl.lules precursoras del múscul, són les cèl.lules que permeten la regeneració del múscul esquelètic (Allbrook D 1981). En estudis fets en rates adultes s'ha vist que entre un 1 i un 5% dels nuclis d'una fibra de contracció ràpida, i entre un 3 i un 15% dels nuclis d'una fibra de contracció lenta pertanyen a cèl.lules satèl.lit (Schmalbruch H 1977, Kelly AM 1978, Gibson MC 1982). L'edat de l'individu és determinant en quant a la quantitat de cèl.lules satèl.lit, sent més nombroses a l'inici de la vida que al final (Allbrook D 1981, Bischoff R 1994). L'absència d'aquestes cèl.lules en el múscul cardíac fa que aquest no tingui la capacitat de regenerar (Maillet M 1980). El múscul llis tampoc té cèl.lules satèl.lit però segons la seva localització anatòmica, quan es lesiona és substituït per teixit connectiu o

per cèl·lules de llinatge poc diferenciat, les quals substitueixen el múscul llis amb un grau variable de diferenciació (Maillet M 1980).

2.2.1- Origen:

Està àmpliament acceptat que les cèl·lules reserva del múscul esquelètic dels mamífers adults deriven de les cèl·lules satèl·lit (Campion DR 1984, Grounds MD 1991). Tanmateix, no es pot excloure de manera taxativa la possibilitat de que en el múscul regenerant *in vivo*, les cèl·lules precursors del múscul puguin derivar d'altres tipus de cèl·lules mononuclears (Grounds MD 1991). Hi ha estudis que demostren que algunes cèl·lules de llinatge mesodèrmic (fibroblastes i adipòcits), o neuroectodèrmica, poden donar lloc a cèl·lules precursors del múscul sota certes condicions (Grounds MD 1990). El fet que els miofibrils formats a partir de cèl·lules precursors de múscul madur donen lloc a miofibrils amb nucli central i que en canvi, els miofibrils formats a partir de cèl·lules precursors de múscul embrionari donen lloc a fibres amb nuclis que tornen a situar-se a la perifèria, fan pensar que es possible que existeixin diferents graus de diferenciació de la cèl·lula satèl·lit (Grounds MD 1980).

Estudis basats en el trasplantament de cèl·lules satèl·lits adultes a embrions conclouen que en aus, aquestes no poden participar en la embriogènesi, conclouent que no poden ser considerades cèl·lules mare pluripotencials (Chevallier A 1986), però que retenen la capacitat d'entrar en mitosi (Snow MH 1978). Altres autors però, si que les consideren cèl·lules mare (Garry DJ 1997), doncs compleixen els tres requisits bàsics de tota *stem cell* segons Potten: capacitat de proliferar, descendència especialitzada i auto-manteniment (Potten CS 1990). També és possible que existeixin dos tipus de cèl·lula satèl·lit: un tipus estaria preparat per a la diferenciació immediata post-noxa sense que sigui precedida per divisió cel·lular, i l'altre tipus de cèl·lula satèl·lit (*stem cell*) entraria en mitosi per a donar una cèl·lula filla per a la

diferenciació i una altra cèl.lula filla per a mantenir la reserva de cèl.lules satèl.lit (Schultz E 1994, Rantanen J 1995, Schultz E 1996).

2.2.2 – Propietats:

La cèl.lula satèl.lit activada té la capacitat de travessar la làmina basal en tots dos sentits (de dins a fora i de fora a dins), i la capacitat de migrar a considerable distància dins del múscul (Hughes SM 1990, Bischoff R 1994, Guerin CW 1995). La implicació funcional de que les cèl.lules satèl.lit puguin travessar la làmina basal i migrar és molt important, doncs significa que poden contribuir a la regeneració d'una fibra lesionada distant. Per altra banda, les cèl.lules satèl.lit tenen la capacitat de sintetitzar components de la matriu extracel.lular (Grounds MD 1991) i metaloproteases, podent participar així en el remodelatge de la matriu extracel.lular durant la regeneració (Guerin CW 1995). Per altre banda, la implantació per via intramuscular o intravenosa de cèl.lules satèl.lit d'alguns llinatges determinats com les CD34+Bcl-2+ o CD34+Sca-1+ és un mètode que s'ha demostrat com capaç d'arribar a restaurar l'expressió de distrofina en algunes fibres de ratolins carents de distrofina (Lee JY 2000, Torrente Y 2001). Malauradament el baix nombre de fibres que arriben a expressar distrofina i la seva curta durada fan que aquest procediment encara no sigui gaire esperançador com a possible teràpia per la DMD.

Fins l'any 1995 es considerava que no existia cap marcador específic per a les cèl.lules satèl.lit no activades (Grounds MD 1991, Bischoff R 1994). L'any 1995 es comença a considerar la proteïna MyoD com un excel.lent marcador per a les cèl.lules satèl.lit activades (Koishi K 1995). Recentment s'ha publicat que el 98% de les cèl.lules satèl.lit expressen MyoD 24 hores després de la seva activació, coincidint amb les cèl.lules Myf5+ (Zammit PS 2002). L'any 1997 es descriu el factor nuclear miocític (MNF), el qual és

expressat selectivament per les cèl.lules satèl.lit en estat de quiescència (abans d'iniciar la proliferació). També s'expressa transitòriament en les cèl.lules satèl.lit proliferants i en el nucli central de les miofibres regenerants. Aquesta expressió disminueix al ritme que la fibra va madurant, fins que únicament l'expressa el grup de cèl.lules satèl.lit reserva de la fibra madura (Garry DJ 1997). S'ha vist que la carència d'aquest factor en ratolins, dona lloc a un defecte en la funció miogènica de les seves cèl.lules satèl.lit (Garry J 2000). També l'any 1997 es descriu el receptor tirosina quinasa de C-met com a candidat per a mediatitzar l'activació de les cèl.lules satèl.lit quiescents (Cornelison DD 1997). Recentment s'ha descrit que l'expressió de CD34 i de Myf5 defineix la majoria de cèl.lules satèl.lit adultes quiescents (Beauchamp JR 2000).

2.2.3 - Fase de replicació:

El moment d'inici i la durada de la replicació de les cèl.lules satèl.lit han estat difícils de determinar, donada la dificultat en identificar les cèl.lules satèl.lit (Bischoff R 1994). S'ha pogut saber, mitjançant estudis de proliferació utilitzant timidina tritiada, que els descendents de la cèl.lula satèl.lit comencen a fusionar-se per a donar lloc a miotubs multinucleats després de només dues divisions (Grounds MD 1987). L'inici de la replicació de les cèl.lules satèl.lit depèn del tipus de noxa, però oscil.la entre les 15 i les 48 hores post-noxa i aquestes cèl.lules provenen de zones no lesionades (Schultz E 1985, McGeachie JK 1987, Roberts P 1989, Grounds MD 1989). A partir del 5è dia es produeix una dràstica disminució de la replicació (McGeachie JK 1999).

2.3- Diferenciació i fusió (de cèl.lula satèl.lit a mioblast i de mioblast a miotub)

2.3.1 - Diferenciació (de cèl.lula satèl.lit a mioblast):

La diferenciació suposa que la cèl.lula satèl.lit passi a ser un mioblast, capaç de sintetitzar les proteïnes específiques del múscul esquelètic. La diferenciació implica l'activació d'un gran nombre de gens per tal de donar lloc a processos com la formació de les miofibril·les i la formació del sistema de membranes del múscul (túbuls T i reticle sarcoplàsmic) que controla els moviments de Ca^{2+} responsables d'iniciar i finalitzar la contracció (Franzini-Armstrong C 1994). Segons sembla, la fusió no és un requisit per a la diferenciació (Grounds MD 1991, Ono K 1993). Entre les 4 i les 8 hores post-noxa, produïda per contusió o per injecció de tòxic, ja s'expressa RNA missatger de miogenina, indicant diferenciació. A les 12 hores post-noxa ja es detecten proteïnes com desmina, miogenina i MyoD1 en els primers mioblastes. En canvi, no es detecta replicació de cèl.lules satèl.lit fins a les 24 hores post-noxa. Per tant, la diferenciació s'iniciaria abans de la proliferació de les cèl.lules satèl.lit (Rantanen J 1995). Segons Grounds, però, la diferenciació es dona conjuntament a la fusió per a formar els miotubs (Grounds MD 1991).

2.3.2 - Fusió (de mioblast a miotub):

La fusió és el procés pel qual els mioblastes es fusionen per formar un sinciti que s'anomena miotub. La fusió, tant de les cèl.lules precursors del múscul entre elles com de les cèl.lules precursors del múscul amb fibres danyades, requereix reconeixement cèl.lula-cèl.lula, neutralització de les forces electrostàtiques de les membranes i producció de glicoproteïnes i glicolípid específics de les membranes (Grounds MD 1991). La fusió entre mioblastes, mioblast-miotub i miotub-miotub, s'inicia als 4-5 dies post-noxa (Bischoff R 1986, Robertson TA 1990). A partir del 6è dia, quasi tots els miotubs estan fusionats (Bischoff R 1979).

2.4 - Maduració (de miotub a miofibra):

Després de la fusió de les cèl.lules precursoras del múscul per a formar miotubs multinucleats (sincitis) i de l'ensamblament dels microfilaments contràctils, varis gens (com actina, miosina o tubulina entre altres) canvien la seva expressió embriogènica o juvenil per una expressió adulta (Grounds MD 1991). El resultat és l'organització de les miofibril·les, els túbuls transversos i el reticle sarcoplàsmic dins del citoesquelet fibril·lar. El desenvolupament funcional de la miofibra requereix finalment de l'elaboració de la làmina basal, innervació, vascularització i fixació de la fibra muscular al tendó i/o fàscia (Franzini-Armstrong C 1994).

2.5 – El sistema del plasminògen i les metaloproteases en la regeneració muscular:

L'activació del plasminogen (Plg) per proteòlisi per donar lloc a la plasmina, la seva forma amb activitat serina-proteasa, és un procés altament regulat i àmpliament utilitzat com a mecanisme generador d'activitat proteolítica extracel·lular. Els activadors del plasminògen (PAs) són serina-proteases que catalitzen específicament la conversió del zimògen plasminògen en plasmina, una proteasa capaç de degradar un ampli espectre de proteïnes extracel·lulars. En mamífers, es coneixen 2 tipus de PAs: l'activador tisular del plasminògen (tPA) i la uroquinasa (uPA). Tot i que els dos PAs catalitzen la mateixa reacció i són estructuralment similars, tPA i uPA són productes de diferents gens i sovint s'expressen en teixits diferents (Vassalli JD, 1991). Ambdós enzims són secretats al compartiment extracel·lular on poden interaccionar amb els seus respectius lligands, tals com receptors cel·lulars específics, inhibidors fisiològics i components de la matriu extracel·lular (ECM) (Irigoyen JP 1999), permetent focalitzar la proteòlisi mitjançant plasmina en regions concretes de l'entorn pericel·lular, dotant així a les cèl.lules productores de PAs d'un sistema

molt eficient per a la degradació controlada de components de la matriu extracel.lular (Lijnen HR 1998). Els PAs són sintetitzats per gran varietat de tipus cel.lulars dotats de propietats migratòries i invasives, com els trofoblastes, monòcits/macròfags, queratinòcits, neurones granulars i mioblastes regenerants, pel que s'ha convingut que els PAs participen en el control de la degradació de la matriu extracel.lular en el context de la remodelació tisular (Vasalli JD 1991, Carmeliet P 1996).

El sistema del plasminògen és un factor clau en la dissolució de les matrius de fibrina. Actuant de forma coordinada amb altres sistemes proteolítics, es creu que juga també un paper important en la degradació de matrius extracel.lulars en el context de la remodelació tisular, ja sigui patològica o fisiològica, així com en processos de migració cel.lular, tals com l'ovulació, la invasió trofoblàstica, la involució mamària post-lactacional, la cicatrització, l'angiogènesi i la invasió de cèl.lules tumorals (Irigoyen JP 1999).

Durant la formació del múscul esquelètic així com durant la seva regeneració té lloc una proteòlisi extracel.lular que remodela totalment la matriu extracel.lular de la zona lesionada. En resposta a un dany muscular, el teixit és infiltrat per fibroblastes, cèl.lules inflammatòries i macròfags (Pimorady-Esfahani A 1997). El teixit necròtic és ràpidament eliminat, comença la revascularització i les cèl.lules satèl.lit proliferen. En aquest procés es donen diversos processos mediat per enzims amb activitat proteolítica, ja sigui en la resposta inflammatòria i/o en la migració dels mioblastes a través de la làmina basal i la seva posterior fusió (Hughes SM 1990, Couch CB 1983). Les metaloproteinases (MMPs) com MMP-2 i MMP-9, així com la meltrina- α i la catepsina B són requerides per la formació de miotubs *in vitro* (Couch CB 1983, Guerin CW 1995, Yagami-Hiromasa T 1995, Gogos JA 1996). A més, l'expressió de MMP-2 i de MMP-9 ha estat descrita durant el procés de degeneració-regeneració en el múscul *in vivo* (Kherif S 1999). El mecanisme d'activació de les MMPs en la majoria de teixits ve precedit d'una activació prèvia d'una cascada proteolítica iniciada per

uPA. La major part de les MMPs poden ser activades d'aquesta forma mitjançant proteòlisi directa mediada per plasmina per donar lloc a proteïnes actives de pes molecular menor (Kherif S 1999). S'ha demostrat que la inhibició de l'activitat proteolítica de uPA amb un anticòs anti-uPA, impedeix la migració, la fusió i la diferenciació de la línia cel.lular mioblàstica C2C12 *in vitro* (Muñoz-Cánoves P 1997). En aquesta part de la tesi doctoral, ens preguntem quin és el paper de la proteasa uPA en la regeneració muscular *in vivo* i quin és el mecanisme o mecanismes mitjançant els quals uPA intervé en aquest procés. A més, ens preguntem com pot afectar a un ratolí carent de distrofina la carència afegida d'aquesta proteasa.

3 - La distròfia muscular de Duchenne (DMD)

La regeneració muscular és un procés mitjançant el qual els organismes poden reparar *ad integrum* les lesions esporàdiques a les que el seu múscul es veu sotmès. Malauradament, l'elevada intensitat i/o l'alt grau de reiteració de la necrosi que presenten algunes patologies musculars cròniques fan que els mecanismes regeneratius del múscul no siguin suficients i el múscul acabi degenerant i fibrosant irreversiblement, perdent en bona part la seva funcionalitat. Són moltes les malalties que donen lloc a una degeneració muscular i moltes les seves possibles causes primàries, però les que ens ocupen en aquest treball són la distròfia muscular de Duchenne (DMD) i en menor grau, la distròfia muscular de Becker (BMD).

3.1 - Característiques generals:

La distròfia muscular de Duchenne (DMD) és la més freqüent de les malalties recessives letals lligades al cromosoma X, amb una incidència de 1 per cada 3500 naixements de varons (Emery AE 1993). Tan la DMD com la seva forma més benigne, la distròfia muscular de Becker (BMD), són causades per mutacions en el gen de la distrofina que donen lloc a disfuncions de la proteïna per la que codifica. La distrofina és una proteïna subsarcolèmica de 427 KDa, composta per una seqüència total de 3685 aminoàcids i que enllaça l'actina del citoesquelet amb la merosina de la làmina basal. En la DMD, els nivells de distrofina solen ser indetectables o molt baixos, mentre que en la BMD tot i detectar-se certs nivells de distrofina, la seva quantitat i/o funcionalitat es troben disminuïdes en major o menor grau, però sempre conservant part de la seva funcionalitat. La BMD és força menys comú i menys severa que la DMD, amb una incidència de 1 de cada 18500 naixements de varons (Bushby KM 1991).

3.2 – Evolució Clínica de la DMD:

Els pacients amb DMD presenten nivells alts en sèrum de la isoforma muscular de la creatina quinasa derivats de la necrosi muscular en el període neonatal, però la malaltia no esdevé clínicament aparent fins al segon o quart any de vida. Els primers símptomes que detecten els familiars solen ser retards en la capacitat per caminar, dificultat per córrer o pujar escales, caigudes freqüents, així com hipertròfia dels músculs dels bessons. Entre els 3 i 6 anys, el caminar esdevé lordòtic, presentant un cert grau de torpesa i es fa palès el signe de *Gowers* (forma característica d'aixecar-se del terra). A l'edat de 5 o 6 anys la hipertròfia muscular es va extenent i ja sol afectar més músculs com els glutis, quadríceps, bessons,

deltoides, bíceps i músculs infraespinals (Engel AG 1986). No tots els músculs es veuen afectats en el mateix grau, afectant molt menys els músculs distals que els proximals, fins a l'extrem de que alguns músculs, com els extraoculars, no presenten simptomatologia clínica (Andrade FH 2000). Entre els 6 i els 11 anys la força dels músculs de les extremitats i el tors va decreixent gradualment. Aquesta pèrdua de força dels músculs, no es correlaciona bé amb la pèrdua de capacitat per portar a terme certes funcions específiques. Així, la capacitat de fer certes funcions com pujar escales, aixecar-se de terra i caminar decau bruscament en algun moment entre els 7 i els 11 anys, no pas gradualment com seria esperable. Durant la segona dècada de la vida del pacient amb DMD, la debilitat muscular ja és molt acusada i especialment a partir de que es perd la mobilitat del pacient, els músculs de les extremitats i el tors van perdent volum. La debilitat dels músculs paraspinals produeix una cifoescoliosis. En aquest període es troba també una debilitat cada vegada més acusada dels músculs respiratoris que porten a una deficiència respiratòria. Les causes més freqüent de mort són la insuficiència i la infecció pulmonars, i en un 10% dels casos la mort esdevé per disfunció cardíaca progressiva (Engel AG, 1986).

3.3 – Patologia de la DMD:

L'absència de distrofina en la DMD s'associa a la desaparició del complex de glicoproteïnes associades a la distrofina (DAGC, veure apartat 5) perdent-se una de les connexions entre el citoesquelet i la matriu extracel.lular (Campbell KP 1995). La pèrdua d'aquest conjunt estructural converteix el sarcolema de les fibres musculars en una membrana molt més propensa a patir alteracions provocades per la pròpia activitat contràctil del múscul esquelètic (Petrof BJ 1993). Petites ruptures de la membrana permeten l'entrada anòmala de calci cap a l'interior de la fibra muscular, que posa en marxa mecanismes de necrosi cel.lular per activació de proteases calci dependents (Turner RP 1988). El conjunt de mecanismes que

es posen en marxa com a resposta als múltiples i repetits episodis de necrosi segmentària als que es veu sotmesa la fibra muscular són molt complexes i poc coneguts, especialment els processos que condueixen a l'excessiva producció i/o persistència de col·làgens fibril·lars en el teixit muscular (Stauber WT 1996, Roig M 1998). Segons la teoria patogènica més acceptada sobre els mecanismes de regeneració muscular en els pacients amb DMD, les cèl·lules satèl·lit, al principi de la malaltia, aconsegueixen compensar la pèrdua de fibres musculars, però amb el pas del temps acaben esgotant la seva capacitat replicativa. A partir d'aquest moment, s'inicia la substitució progressiva del teixit muscular normal per teixit fibrós i teixit adipós, així com l'aparició de la simptomatologia clínica (Engel AG 1986, Roig M 1998).

4 - La distrofina: el gen i la proteïna

4.1 - Estructura del gen:

El gen de la distrofina està situat en el braç curt del cromosoma X (Xp21.1) i és el gen més gran de tots els que s'han identificat fins el moment. Presenta una complexa estructura amb un mínim de 79 exons que suposen aproximadament 2,4 milions de parells de bases (Mbp) (Coffey AJ 1992, Koenig M 1988, Roberts RG 1992). La proteïna per la que codifica és la distrofina, de 427 KDa, que està composta per una seqüència total de 3685 aminoàcids. Tot i que la isoforma de 427 KDa es la forma més estudiada i coneguda (per la seva implicació en DMD y BMD) existeixen altres isoformes amb papers rellevants en diversos teixits. Se sap que el gen de la distrofina posseeix almenys 7 promotors al llarg de la seva seqüència. A més, com a mínim sis dels seus exons poden presentar *splicing* alternatiu per donar lloc a isoformes alternatives en l'extrem COOH-terminal de la distrofina (Bies RD 1992, Feener CA 1989).

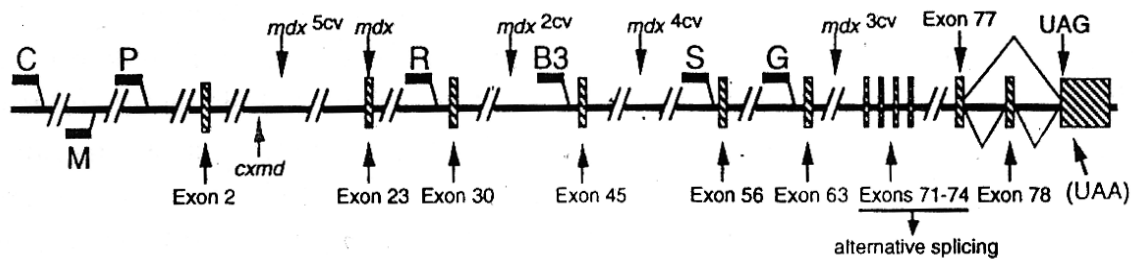


Figura 4 - Estructura general del gen de la distrofina. Estructura del gen de la distrofina. Les fletxes de la part superior indiquen les localitzacions de les mutacions que presenten diferents soques de ratolí. Les fletxes de la part inferior indiquen alguns dels exons que s'esmenten en el text. C, M, P, R, B3, S i G corresponen als 7 promotors que s'han descrit en aquest gen.

4.1.1 - Promotors alternatius:

Tres dels promotors que s'han descrit, estan en la zona 5' del gen de la distrofina i donen lloc tots ells a la forma de 427 KDa. S'usen de forma específica en alguns teixits i s'han proposat per ells els noms de B, M i P (de Brain, Muscle i Purkinje cell respectivament). Els transcrits resultants dels tres promotors són pràcticament idèntics ja que només difereixen en el seu primer exó que codifica per menys de 13 aminoàcids i presenten en els tres casos un *splicing* que manté la pauta de lectura pels exons restants. Els altres quatre promotors donen lloc a isoformes més curtes de distrofina: Dp260, Dp140, Dp116 i Dp71, mantenint sempre l'extrem COOH-terminal. Dp260 és una isoforma descrita en retina i sembla ser clau per la normal neurotransmissió en la primera línia sinàptica de la retina (D'Souza VN 1995). Dp140 s'expressa específicament a cervell i ronyó i no s'ha descrit ni en múscul esquelètic, ni en múscul cardíac. Dp116 (*apodystrophin-2*) es transcriu en nervis perifèrics, mostrant una abundant expressió en el node de Ranvier. Per últim, Dp71 (*apodystrophin-1*) que només conté el domini ric en Cisteïna i el domini COOH-terminal s'expressa de forma ubíqua, però la seva presència és molt baixa a múscul esquelètic, i més abundant en múscul cardíac i

cervell. És la forma de distrofina predominant en astròcits i cèl.lules de glioma (Lederfein D 1993).

4.1.2 – Processaments alternatius del mRNA:

A part dels promotors alternatius, s'ha vist que tres diferents àrees del domini COOH-terminal presenten *splicing* alternatiu segons estadi de desenvolupament i segons teixit (Bies RD 1992, Feener CA 1989). S'ha observat que el penúltim exó (exó 78) pot ser eliminat per *splicing* alternatiu en múscul i en el sistema nerviós central. L'eliminació d'aquest exó dona lloc a una variació de la pauta de lectura que canvia el COOH-terminal de la proteïna. Amb aquest patró de *splicing* es substitueixen 14 aminoàcids hidrofílics per 32 aminoàcids altament hidrofòbics. La isoforma amb el COOH-terminal hidrofòbic s'expressa durant les primeres etapes del desenvolupament, mentre que la isoforma amb el COOH-hidrofílic es troba abundantment en teixits adults (Bies RD 1992).

Un segon lloc de *splicing* alternatiu inclou els exons 71 al 74 que poden ser eliminats independentment, i en varies combinacions. L'eliminació de cada un dels quatre dóna lloc a deleccions que conserven la pauta de lectura, podent donar lloc a 10 isoformes diferents observades en diferents teixits humans i de ratolí (Bies RD 1992, Feener CA 1989). Aquesta regió, no obstant, no sembla rellevant com a lloc de *splicing* en múscul esquelètic.

No es coneix la funció d'aquestes isoformes obtingudes per *splicing* alternatiu, però el fet de que es conservin en diferents espècies fa pensar que puguin estar jugant un paper important. (Sadoulet-Puccio HM 1996).

4.2 - Estructura de la proteïna:

La distrofina, de 427 kDa, es pot dividir en quatre grans dominis estructurals (Koenig M 1988). El domini I (*domini d'unió a l'actina*) presenta una forta homologia amb les regions

d'unió a l'actina de la α -actinina i la β -espectrina (Karinch AM 1990) i la seva principal funció és la unió a la actina del citoesquelet. El domini II (*Domini bastó tipus espectrina*) consisteix en una sèrie de repeticions que presenten homologia amb el motiu de repeticions de l'espectrina tot i que una mica més variables que en aquesta (Koenig M 1990). Aquest domini mutat o delecionat no comporta en cap cas una patologia tan severa com la resta de dominis, sobretot si el comparem amb el domini COOH terminal. El domini III (*Domini ric en cisteïna*) és ric en cisteïnes i presenta dos possibles llocs d'unió a calci tot i que sembla que estarien degenerats i s'ha postulat que haurien perdut la capacitat d'unir aquest ió (Koenig M 1988). El domini IV (COOH-terminal) és un domini exclusiu de la distrofina i de proteïnes de la seva família incloent la DRP-1 (*Dystrophin related Protein 1*) o Utrofina (Khurana TS 1990, Tinsley JM 1992) i la distrobrevina (Wagner KR 1993), així com la DRP-2 (*Dystrophin related Protein 2*) (Roberts RG 1996). Es pot distingir també, entre els dominis II i III la seqüència consens WW/WWP que sembla estar implicat en unions proteïna-proteïna, i es troba en almenys 12 proteïnes totes elles relacionades amb senyalització cel.lular, la qual cosa semblaria implicar la distrofina en aquesta funció, encara que no s'ha pogut demostrar (André B 1994, Bork P 1994).

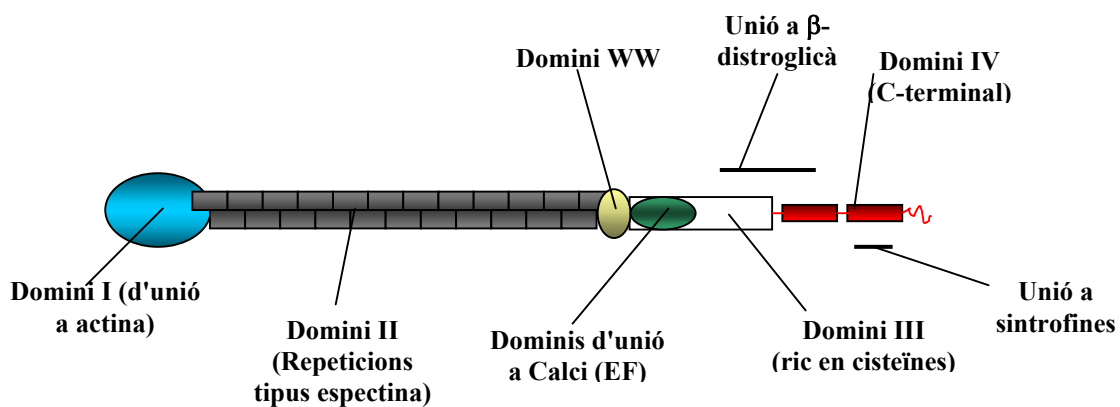


Figura 5 - Dominis funcionals de la distrofina. Representació esquemàtica de l'estructura de la distrofina indicant-ne els principals dominis funcionals.

També es troben en aquesta regió els llocs d'unió a les proteïnes associades a la distrofina a més de possibles llocs de fosforilació. A més, s'ha descrit que aquest domini de la distrofina és substrat d'algunes proteïnes quinases endògenes com la quinasa cdc2. Les mutacions que donen lloc a la pèrdua de funcionalitat d'aquest domini són les que comporten una patologia més severa.

5 - El complex de proteïnes associades a la distrofina

5.1 - Els sarcoglicans:

Els sarcoglicans formen part, junt amb els distroglicans, les sintrofines i el sarcospan del complex de glicoproteïnes associades amb la distrofina (DAGC), totes elles relacionades directa o indirectament amb la distrofina (Hoffman EP 1987, Ibraghimov-Beskrovnaia O 1992, Yoshida M 1990, Crosbie RH 1997, Ozawa E 1998). La importància d'aquestes proteïnes es posa clarament de manifest en diferents tipus de distròfies musculars, on hi ha un defecte primari o secundari d'alguna d'elles que provoca una degeneració muscular més o menys severa (Campbell KP 1995, Straub V 1997, Roberds SL 1994, Noguchi S 1995, Bonnemann CG 1995, Ozawa E 1995, Nigro V 1996). Existeixen també soques de ratolí Knock-out pels quatre tipus de sarcoglicans, i tots ells desenvolupen distròfies musculars severes (Duclos F 1998, Araishi K 1999, Hack AA 1998, Coral-Vazquez R 1999). Existeix també un hàmmster, mutant espontani nul del δ -sarcoglicà també amb patologia muscular severa (Nigro V 1997). En el complex dels sarcoglicans trobem quatre proteïnes transmembrana: L' α -sarcoglicà (proteïna transmembrana de tipus I) i els β -, γ -, i δ -sarcoglicans (les tres proteïnes transmembrana de tipus II). S'ha publicat que els α - i γ -sarcoglicans són específics de múscul esquelètic i múscul cardíac, mentre que els β - i δ -

sarcoglicans serien expressats en un rang molt més ampli de teixits (Noguchi S 1995, Roberds SL 1993, Lim LE 1995, Nigro V 1996, Liu LA 1999).

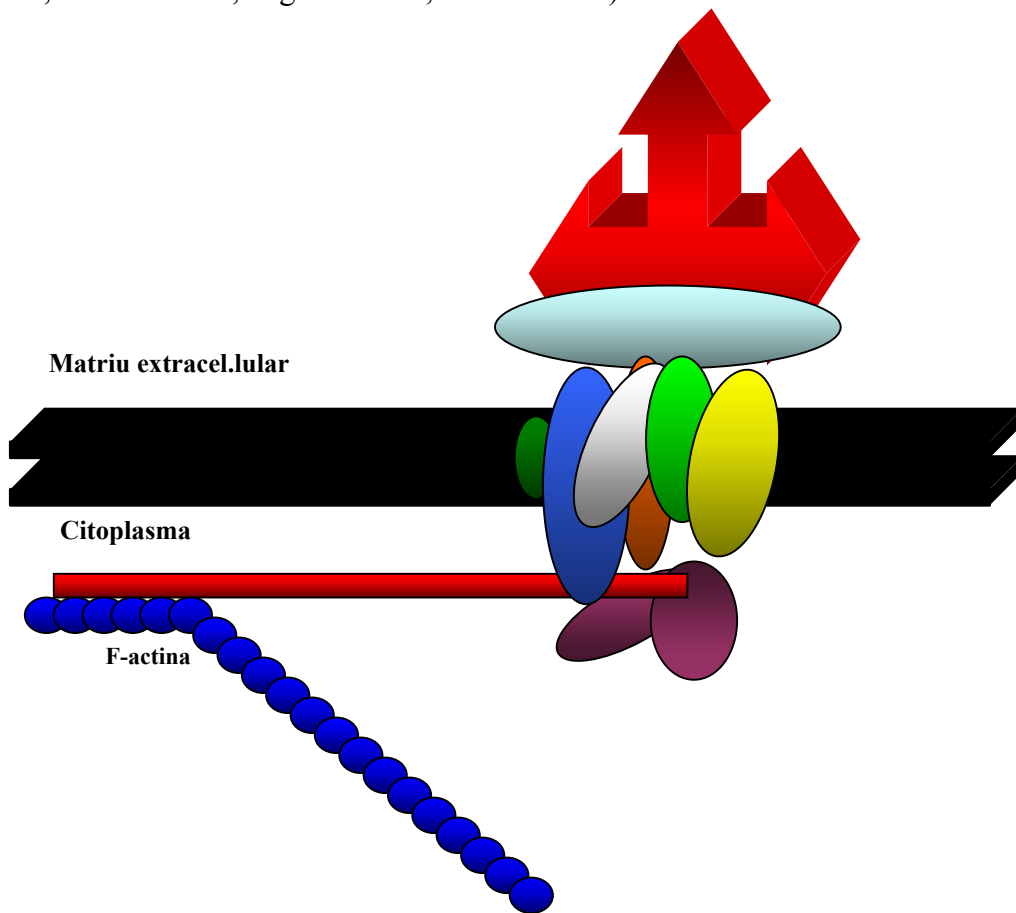


Figura 6 - Esquema del complex de glicoproteïnes associades a la distrofina. La distrofina és una peça més del macrocomplex proteic que enllaça, a través de la membrana plasmàtica, l'actina del citoesquelet amb la merosina de la làmina basal. Aquest macrocomplex inclou apart de la distrofina, les sintrofines (SF) $\alpha 1$ i $\beta 1$, el sarcospan (SPN), els α - i β -dístroglicans (DG), i els α -, β -, γ - i δ -sarcoglicans (SG).

Mutacions importants en qualsevol d'aquestes quatre proteïnes dona lloc a distròfia muscular recessiva “de les cintures” i la mutació en un d'ells sempre dóna lloc a una pèrdua total o parcial dels altres tres sarcoglicans, la qual cosa suggereix que la formació, localització i funcionalitat del complex requereix de les quatre subunitats (Straub V 1997). La interacció molecular dels sarcoglicans ha estat sobradament demostrada per diferents tipus d'aproximacions (Yoshida M 1994, Chan YM 1998). Tot sembla indicar que els quatre

sarcoglicans són unitats d'un macrocomplex funcional heterotetramèric (Hack AA 1999). Amb posterioritat es va identificar un altre sarcoglicà, l' ϵ -sarcoglicà (Ettinger AJ 1997, McNally EM 1998) que presenta alta homologia amb l' α -sarcoglicà, però contràriament a aquest s'expressa en un ampli rang de teixits (Ettinger AJ 1997) on semblaria associar-se als β - i δ -sarcoglicans (Durbeej M 1999). Per una banda es postula que, malgrat l'alta homologia i expressar-se a múscul esquelètic, l' ϵ -sarcoglicà no semblaria capaç de compensar pel defecte en l' α -sarcoglicà (Duclos F 1998). Per altra banda, s'ha demostrat també que l' ϵ -sarcoglicà és capaç d'associar-se a β -, δ - i γ -sarcoglicans en la línia cel.lular mioblàstica murina C2C12, a múscul esquelètic i a múscul llis on podria compensar, encara que només parcialment pel defecte en l' α -sarcoglicà (Liu LA 1999, Straub V 1999).

5.2 - Els distroglicans:

La família dels distroglicans inclou dos membres: l' α - i el β -sarcoglicans. L' α -distroglicà és una proteïna altament glicosilada i associada a la membrana a través del β -distroglicà que és una proteïna transmembrana. Ambdues van ser originalment aïllades de múscul esquelètic com a components d'un gran complex oligomèric, junt amb els sarcoglicans, les sintrofines, la distrofina i una proteïna, recentment aïllada, anomenada sarcospan (Ervasti JM 1990, Yoshida M 1990, Froehner SC 1997, Lim LE 1998, Crosbie RH 1997). En el múscul esquelètic, l' α -sarcoglicà s'uneix a la cadena α -2 de la laminina (Sunada Y 1994), mentre que el domini intracitoplasmàtic del β -distroglicà s'uneix a la distrofina (Jung D 1995). Segons aquestes dades, els dos distroglicans establirien un pont molecular entre la matriu extracel.lular i el citoesquelet. Aquest pont semblaria tenir una importància crucial pel correcte funcionament del múscul esquelètic (Lim LE 1998, Ervasti JM 1993, Durbeej M 1998). A més, qualsevol defecte important en qualsevol dels dos distroglicans,

conduïx a una dràstica reducció dels sarcoglicans i del sarcospan en el sarcolema (Lim LE 1998). Segons s'ha publicat, en altres teixits, l' α -dístroglicà seria capaç també d'unir-se a laminina-1, agrina i perlecan (Gee SH 1993, Rugg MA 1998, Gesemann M 1998, Peng HB 1998, Talts JF 1999), mentre que el β -dístroglicà podria també unir-se a altres isoformes de la dístrofina (Dp71, Dp116 i Dp260) i també a la utrofina (Jung D 1995, Saito F 1999).

5.3 - Les sintrofines:

La família de les sintrofines inclou vàries proteïnes que comparteixen les característiques comuns de ser proteïnes intracel·lulars i que formen part del complex de proteïnes associades a la dístrofina (DAPC) en el múscul esquelètic. Les tres sintrofines conegudes són la $\alpha 1$, $\beta 1$ i $\beta 2$, que estan codificades cada una d'elles per un gen propi. Les tres proteïnes s'expressen a múscul esquelètic, essent la més abundant la sintrofina $\alpha 1$ (Adams ME 1993, 95 Ahn AH 1994, Yang B 1995). En el múscul esquelètic, la sintrofina $\alpha 1$ i la $\beta 1$ es troben a tot el sarcolema encara que relativament més abundants a la unió neuromuscular, mentre que la sintrofina $\beta 2$ està concentrada a la unió neuromuscular, tot i que també se'n detecten traces a la resta del sarcolema (Peters MF 1994 i 1997). Les sintrofines s'uneixen directament a l'extrem C-terminal de la dístrofina i també a la utrofina i la dístrobrevína, totes elles proteïnes de la família de la dístrofina (Suzuki A 1995, Kramarcy NR 1994, Dwyer TM 1995, Yang B 1995, Ahn AH 1995, 1996). L'absència de dístrofina tan en la DMD com en el ratolí mdx, comporta una dràstica reducció de les sintrofines sarcolèmiques, restant només presents en la unió neuromuscular (Butler MH 1992, Yang B 1995). S'ha apuntat també la possibilitat de que les sintrofines puguin unir-se pel seu domini PDZ amb canals de sodi dependents de voltatge (Gee SH 98). També s'ha postulat una interacció entre les sintrofines i una família de serina/treonina quinases associades a microtúbuls (Lumeng C 1999).

5.4 - La proteïna sarcospan:

La proteïna *sarcospan* ha estat l'últim membre del complexe de proteïnes d'unió a la distrofina en ser caracteritzada. Va ser descrita inicialment com una proteïna de 25 KDa que semblava ser una proteïna integral de membrana, de naturalesa molt hidrofòbica (Yoshida M 1990, Ervasti JM 1991), però no va ser fins el 1997 quan es va clonar i es va predir que la seva estructura presentava 4 dominis transmembrana, cosa inusual, ja que la resta de proteïnes transmembrana del complexe de proteïnes associades a distrofina presenten totes elles un sol domini transmembrana (Crosbie RH 1997) .

La predicció topològica ens mostra la proteïna *sarcospan* com a una proteïna molt similar a la superfamília de proteïnes *tetraspan*, en la que tots els seus membres tenen quatre dominis transmembrana i una gran nansa extracel.lular (Wright MD 1994, Maecker HT 1997). S'ha observat també, que el correcte ensamblament dels sarcoglicans és clau per la presència del sarcospan a la membrana plasmàtica (Crosbie RH 1999). Amb posterioritat, es va obtenir un ratolí transgènic deficient en *sarcospan* que va permetre comprovar que es mantenia l'expressió de la resta de components del DAGC al sarcolema, sense cap anomalia significativa al seu múscul esquelètic, mantenint aparentment la funció normal de la seva musculatura. Aquest fet suggereix la possibilitat de que el *sarcospan* no sigui imprescindible per la funcionalitat del DAGC o bé que alguna altra proteïna desconeguda pugui compensar per l'absència del *sarcospan* (Lebakken CS 2000). Recentment s'ha intentat associar la seva deficiència a la fibrosi congènita del múscul extaocular (CFEOM1) però sense èxit (O'Brien KF 2001). fins el moment no s'ha pogut associar cap mutació del gen de sarcospan amb cap tipus d'anomalia muscular.

6 - Proteïnes de la família de la distrofina. Estructura molecular i relació amb la distrofina

Existeixen diverses proteïnes que donada la seva alta homologia amb la distrofina s'han inclòs en un grup de proteïnes, configurant l'anomenada família de la distrofina. Aquesta família inclou, apart de la distrofina, la utrofina (també anomenada DRP o DRP-1 de *dystrophin-related protein*) les distrobrevina i la DRP-2 (de *dystrophin-related protein 2*). És molt característic d'aquesta família el seu domini C-terminal, altament conservat i exclusiu dels quatre membres de la família.

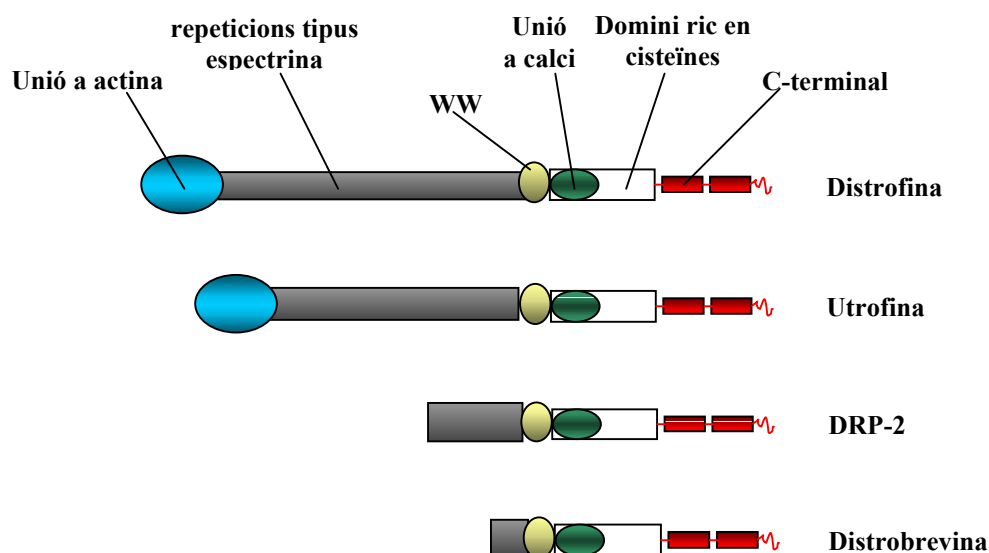


Figura 7 - Estructura comparativa de les diferents proteïnes de la família de la distrofina. Les proteïnes de la família de la distrofina es caracteritzen pel seu C-terminal amb una estructura molt característica i molt conservada en totes elles. Així trobem en tots els casos una elevada homologia des de el domini WW fins l'extrem C-terminal.

6.1 - Distrobrevina:

La distrobrevina va ser descrita per primera vegada com una proteïna de 87 KDa, aïllada de l'òrgan elèctric de *Torpedo marmorata* on es va trobar que estava associada amb la distrofina

i la sintrofina (Carr C 1989) i on va ser anomenada proteïna post-sinàptica de 87 KDa La seva unió directa amb distrofina i distrobrevina a *Torpedo marmorata* va ser demostrada *in vitro* i se li va identificar un domini d'unió a sintrofina de 52 aminoàcids (Dwyer TM 1995). Amb posterioritat es van identificar varis ortòlegs de mamífer per aquesta proteïna, els transcrits dels quals es generen per expressió diferencial des de un sol *locus* genètic donant lloc a diferents isoformes. (Blake DJ 1996, Ambrose HJ 1997, Loh NY 1998).

6.2 – Proteïna relacionada amb la distrofina 2 (DRP-2):

La DRP-2 va ser caracteritzada per primer cop en humans en un estudi filogenètic de seqüències que codificaven per proteïnes amb el C-terminal característic de les proteïnes de la família de la distrofina (Roberts RG 1996). En aquest estudi es va suggerir que la utrofina, fins el moment anomenada també DRP, passés a anomenar-se DRP-1, per diferenciar-la de la nova DRP-2. La DRP-2 és una proteïna relativament petita, especialment si es compara amb la distrofina i la utrofina, codificada per un gen de només 45 kb localitzat a Xq22. La seva estructura és similar a la isoforma Dp116 de la distrofina. S'expressa principalment al cervell i a la medul·la espinal. Amb posterioritat, es va caracteritzar l'expressió dels transcrits de DRP-2 a ratolí, confirmant-se la seva presència fonamental al sistema nerviós central, però veient-se també expressió del seu mRNA en alguns altres teixits, però no en el múscul esquelètic (Dixon AK 1997). Més recentment s'ha publicat que en les cèl·lules de Schwann la DRP-2 interaccionaria amb el β -dístroglicà gràcies a la interacció amb la L-periaxina, ja que en absència d'aquesta, la DRP2 perd la seva localització en la cara interna de la membrana plasmàtica i és deplecionada. La disrupció del complex DRP-2-dístroglicà comportaria una

hipermielinització i una desestabilització de la unitat cèl.lula de Schwann-axó neuronal (Sherman DL 2001).

6.3 - Utrofina (DRP, DRP1): Estructura comparada a la distrofina.

Malgrat que disposem de bastanta informació sobre el gens, la localització cel.lular i les col.localitzacions de la distrofina, la utrofina i les seves proteïnes associades, sabem relativament poc de la seva estructura proteica, i el poc que sabem, és gràcies a les homologies de la seva seqüència amb la d'altres proteïnes (Winder SJ 1995). La utrofina es va descriure per primera vegada a l'any 1989 com a *proteïna relacionada amb la distrofina (DRP)* (Love DR 1989). La comparació de la seva seqüència aminoacídica i dels seus dominis funcionals amb la distrofina donà suport a la hipòtesi de que podia desenvolupar una funció similar a la de la distrofina (Tinsley JM 1992). Segons Koga i cols., la utrofina únicament es localitza en la membrana de les fibres del múscul normal durant el desenvolupament fetal, però desapareix poc després del naixement quan la distrofina la va reemplaçant gradualment (Koga R 1993). Des d'aquest moment en endavant, en el múscul normal, la utrofina només es detecta a les unions neuromusculars i a les unions miotendinoses (Bewick GS 1992, Law DJ 1994). La seva expressió és molt més ubiqua que la de la distrofina, doncs es troba en la pràctica totalitat de tots els teixits estudiats (Love DR 1991, Nguyen TM 1991, Khurana TS 1992, Uchino M 1994). Es coneix també una isoforma més curta de utrofina, que seria homòloga a la distrofina Dp116, i que s'anomena utrofina G (Blake DJ 1995), suggerint que la utrofina i la distrofina estan relacionades per una duplicació ancestral. Igualment que per la distrofina, s'ha descrit també un promotor alternatiu, que estaria dins del segon intró del gen de la utrofina, una altre troballa que dóna arguments a la teoria de que utrofina i distrofina

comparteixen un ancestre comú. Aquestes dues formes tenen gairebé la mateixa grandària i només difereixen en dos exons del seu N-terminal (Burton EA 1999). Recentment s'ha vist que les dues isoformes produïdes poden ser regulades independentment (Galvagni F 2002). Pel que fa a l'estructura proteica, se sap que la utrofina és pràcticament idèntica a la de la distrofina, conservant totalment els quatre dominis estructurals descrits prèviament per la distrofina (veure secció 4.2 d'aquesta introducció). La identitat entre ambdues a nivell de seqüència és sorprenentment alta. Així, observant el domini d'unió a actina trobem un 66,8% d'homologia mitjana en la seqüència aminoacídica. El domini central en forma de bastó és el que menys homologia presenta, amb una mitjana del 37,6%. El domini ric en cisteïnes presenta un 90,9% d'homologia entre ambdues proteïnes. Finalment, en el domini COOH-terminal hi trobem una mitjana de 72,5% d'homologia, exemple que es mostra en l'alineament de la figura 8 de la pàgina anterior. Cal dir, que la homologia es distribueix irregularment al llarg de la seqüència. Així, arriba pràcticament al 100% en certs dominis funcionals altament conservats de la proteïna, mentre que en d'altres la homologia és força més baixa.

7 - Models animals de la DMD

7.1 - El gos distròfic:

L'any 1988 es va publicar el primer cas de gos distròfic equiparable morfològica i clínicament a la DMD humana (Kornegay JN 1988), però el primer que va ser confirmat bioquímicament com a distrofinopatia va ser el Golden Retriever descrit per Cooper et al. (Cooper BJ 1988). Posteriorment, es va demostrar que aquesta família de gossos tenien una mutació puntual en un lloc acceptor d'*splicing* de l'intró 6. Això provocava que l'mRNA

d'aquests gossos no presentés l'exó 7 i patissin un canvi de la pauta de lectura, donant lloc a una terminació prematura del seu mRNA en l'exó 8. Va ser el primer cas descrit de deficiència de distrofina per mutació d'un lloc de *splicing* (Sharp NJ 1992). Les fibres regenerants d'aquest gos distròfic expressen utrofina, i segons sembla algunes fibres també l'expressen fins a 28 dies després de la lesió (Wilson LA 1994). En aquest model s'han fet intents de teràpia gènica amb mini-gens de la distrofina i aquesta s'arriba a expressar a les fibres (Howell JM 1997, 1998 a i b) i amb reparació gènica induïda per oligonucleòtids quimèrics obtenint només un increment molt baix de fibres distrofina-positives (Fletcher S 2001). Un gos distròfic, de la raça Pointer alemany de pel curt, també s'ha descrit per tenir una deleció total del gen de la distrofina i presenta un increment de la utrofina, que segons els autors no sembla millorar el seu fenotip tal i com passa amb la DMD humana (Schatzberg SJ 1999). Recentment, s'ha descrit una tercera raça gos distròfic, en aquest cas de la raça Labrador Retriever, presentant també carència de distrofina i símptomes similars als anteriors (Bergman LR 2002).

7.2 - El gat distròfic:

El gat distròfic va ser descrit per primera vegada el 1989, però aquest primer model no va poder ser estabilitzat com a colònia, i per tan es va perdre. Malgrat aquest fet, va permetre apuntar que la seva herència semblava ser lligada al cromosoma X i es va demostrar que la seva malaltia, molt lleu, era deguda a l'absència de distrofina. Segons els autors, la seva patologia va ser progressiva i histopatològicament s'assemblava a la DMD/BMD excepte per la falta de infiltració adiposa i la prominent presència de hipertròfia tan de fibres com de grups musculars molt més acusades que en la DMD humana (Carpenter JL 1989). Tres anys més tard, es va descriure un altre cas (Gaschen 1992) que va poder ser estabilitzat com a

colònia. Les característiques patològiques d'aquesta colònia eren molt similars a les de la colònia descrita 3 anys abans, essent, la característica més destacable, l'altíssim grau de hipertròfia de fibres i de grups musculars, hipertròfia que arriba a ser letal *per se*, fins el punt de provocar l'estrangulament en alguns casos. Per aquest motiu es va proposar el nom de distròfia muscular hipertròfica felina (HFMD) per la malaltia del gat distròfic (Gaschen 1992). Posteriorment es va demostrar que la pèrdua de la distrofina era deguda a una deleció de la seva regió promotora muscular (promotor M) (Winand NJ 1994). S'ha vist que aquests gats distròfics presenten utrofina a les fibres musculars, però només durant la seva regeneració (Lin S 1998). Treballs recents han caracteritzat millor la patologia, i apunten que en gats joves les lesions histològiques ja són obvies, però que aquestes augmenten amb l'edat. Les seves característiques més visibles són els múltiples focus de degeneració-regeneració amb infiltració mononuclear, la seva gran variació de grandària de les fibres, fenòmens de partició de les fibres (*splitting*), nuclis centrals i fibres hipercontretes. La fibrosi no es detecta excepte en el diafragma on tampoc és massa important. Almenys en algunes fibres, s'hi observa un cert grau de presència de distrofina (Gaschen F 2001).

7.3 - El ratolí mdx:

Malgrat l'existència del model felí i el model caní per la DMD, el model murí ha estat, amb diferència, el model més utilitzat per la DMD. Existeixen diverses soques de ratolins amb mutacions del gen de la distrofina. De totes elles, la més estudiada amb diferència ha estat la soca mdx. Malgrat les similituds que presenta amb la DMD humana, també s'aprecien certes diferències que segons alguns autors posen en dubte aquesta soca com a model per la DMD humana. Malgrat aquestes diferències, ningú pot negar la importància que aquest model murí ha tingut en el coneixement i caracterització de la distròfia muscular de Duchenne i està

sent actualment el punt de mira de la majoria d'assatjos de teràpia gènica muscular per corregir el defecte de distrofina.

7.3.1 - Descobriment i caracterització de la soca mdx:

L'any 1984, Bulfield i col·laboradors (Bulfield G 1984), en treballs en els que buscaven mutants pels enzims de la glicòlisi, van trobar casualment un mutant de la soca C57BL/10 ScSn amb uns nivells plasmàtics altíssims de creatina quinasa muscular. De seguida es van adonar que el ratolí en qüestió presentava una distròfia muscular i que el seu patró de herència era lligat al cromosoma X. Per aquest motiu el van anomenar ratolí *mdx* (de distròfia muscular lligada a l'X). Posteriorment, a l'any 1989 es va demostrar que el ratolí *mdx* presenta una mutació sense sentit (crea un codó de parada) en l'exó 23 del gen de la distrofina, la qual comporta una carència total de la distrofina muscular (Sicinski P 1989). Tal i com passa en els pacients amb DMD, els ratolins *mdx* presenten lesions musculars i nivells plasmàtics molt alts de quinases musculars, ambdues característiques molt pròpies de les distròfies musculars (Bulfield G 1984). Malgrat aquestes similituds genètiques, histològiques i bioquímiques entre el ratolí *mdx* i els pacients amb DMD, la clínica de la malaltia és molt menys severa en el ratolí *mdx* que en l'humà amb DMD. Així, el ratolí *mdx* té una esperança de vida gairebé normal i només presenta debilitat muscular lleu entre el final de la segona i fins la cinquena setmanes de vida (Muntoni F 1993, Pastoret C 1995a). A més, aquests animals mai arriben a presentar cardiomiopatia, miofibrosis o substitució adiposa del teixit muscular tan severes com en la DMD avançada (Carnwath JW 1987, Torres LFB 1987, Coulton GR 1988, DiMario JX 1991, Bieber FR 1990).

7.3.2 – Evolució de la patologia del ratolí mdx:

La major part dels investigadors estan d'acord en que en el ratolí mdx la patologia muscular és pràcticament absent durant els primers 15 dies de vida postnatal, i que la necrosi muscular esdevé molt activa entre la tercera i la vuitena setmana de vida (Dangain J 1984, Bridges LR 1986, Anderson JE 1990, Coulton GR 1988, Tanabe Y 1986, Torres LFB 1987.). Contràriament, no tots els autors estan d'acord sobre el que passa en el múscul del ratolí mdx a partir d'aquesta edat. Alguns han postulat que la necrosi desapareix després dels primers mesos de vida (Dangain J 1984, Tanabe Y 1986, DiMario JX 1991.). D'altres han trobat que després del període de màxima necrosi aquesta no desapareix, sinó que continua però a nivells bastant més baixos (Bridges 1986, Anderson JE 1987, Carnwath JW 1987, Torres LFB 1987, Coulton GR 1988, Cullen MJ 1988, Muntoni F 1993, McGeachie JK 1993, Pastoret JNC 1995b, Gorospe JRM 1997).

D'ençà del descobriment d'aquesta soca experimental, molts autors, per tal d'explicar les diferències en el curs de la malaltia entre el ratolí i l'humà, han atribuït al ratolí una major capacitat regenerativa (Dangain J 1984, Dupont-Versteegden EE 1992, Pastoret C 1995b, Lefaucheur JP 1995, Cullen MJ 1997, Partridge TA 1997, De la Porte S 1999). Treballs addicionals, han donat suport a aquesta hipòtesi: dosis baixes de radiació gamma donades al ratolí mdx per bloquejar-li la regeneració, reproduïxen en aquests ratolins les lesions observades en els Duchennes avançats (Wakeford S 1991, Weller B 1990, Quinlan JG 1995 i 97); Treballs patològiques observades en els ratolins mdx vells han estat atribuïdes a disminucions de la capacitat regenerativa associada a l'envelliment (Lefaucheur JP 1995, Pastoret C 1995b). Per altre banda, els resultats derivats d'altres experiments posen en dubte que les diferències observades entre el ratolí mdx i l'humà amb DMD siguin degudes realment a la major capacitat regenerativa del ratolí respecte l'humà. Així, McGeachie i cols. van trobar que la replicació de les cèl.lules satèl.lit (com a marcador de regeneració) en el

ratolí mdx començava durant la tercera setmana de vida postnatal, assolint el seu pic màxim entre la quarta i la vuitena setmana i que continuava a una taxa molt més baixa almenys fins la 44^a setmana de vida (McGeachie JK 1987 i 93). Altres estudis apunten que les fibres del ratolí que han patit almenys un cicle de necrosi- regeneració esdevenen més resistents a la necrosi, malgrat continuar sent totalment deficientes en distrofina. Aquests autors van atribuir aquest fenomen a la major resistència a les lesions induïdes per activitat física de les fibres de menor calibre (Karpati G 1988, Weller B 1990).

S'han portat a terme molts estudis en músculs o grups musculars diferents. Tot i que existeixen bastantes característiques comuns, queda bastant clar que hi ha una variació de les característiques de la patologia segons els músculs estudiats. En aquest sentit, diferents estudis apunten que alguns músculs com els extraoculars pràcticament no pateixen necrosi (Andrade FH 2000, Dowling P 2002) mentre que a l'altre extrem trobaríem músculs com el diafragma, que pateix una patologia molt més severa que la resta de músculs (Stedman HH 1991).

El paper que juguen els mastòcits en la patologia del ratolí mdx és un aspecte que tampoc està massa clar. Per una banda s'ha postulat que l'activitat dels mastòcits podia ser el detonant per la producció dels grups degeneratius en el ratolí mdx (Gorospe JRM 1994). Aquest estudi es basa en el fet de que a l'injectar als ratolins grànuls purificats provinents d'aquestes cèl.lules es provoca una àmplia necrosi muscular en els ratolins mdx però no en els ratolins control. Posteriorment es va publicar que el ratolí doble mutant mdx/Tsk (amb una activitat mastocítica molt elevada) presentava una miopatia més severa que la observada en el ratolí mdx (Granchelli JA 1995). Aquests primers treballs semblaven apuntar cap a una funció en el desencadenament de la necrosi per part d'aquestes cèl.lules. Per altre banda, treballs posteriors, aporten dades en favor d'una funció encaminada a la regeneració, doncs després d'una lesió experimental suau amb sèrum salí fisiològic, s'observa una ràpida arribada de

mastòcits cap a la zona lesionada (Gorospe JR 1996, Lefaucheur JP 1996, Nahirney PC 1997).

Valorant conjuntament les dades que hem pogut trobar a la bibliografia sobre l'evolució de la patologia del ratolí mdx, sembla clar que existeix una certa variabilitat entre diferents músculs estudiats. Aquest fet sumat a l'elevat grau de controvèrsia derivada de diferents treballs publicats ens van portar a preguntar-nos quina era realment l'evolució de la malaltia en el grup muscular del gastrocnemi. La seva caracterització anatòmica des de el període postnatal fins els 24 mesos de vida dels ratolins (grau de necrosi, presència de fibres amb nuclis no perifèrics, variació de grandària de les fibres, presència de mastòcits i grau de fibrosi) ens donaria dades molt importants per elles soles, però ens serien també molt útils per interpretar els resultats que obtindríem posteriorment.

7.3.3 - La utrofina i el ratolí mdx:

La utrofina es va descriure per primera vegada a l'any 1989 com a *proteïna relacionada amb la distrofina (DRP)* (Love DR 1989). La comparació de la seva seqüència aminoacídica i dels seus dominis funcionals amb la distrofina donà suport a la hipòtesi de que podia desenvolupar una funció similar a la de la distrofina (Tinsley JM 1992). Segons Koga i cols., la utrofina únicament es localitza en la membrana de les fibres del múscul normal durant el desenvolupament fetal, però desapareix poc després del naixement quan va essent gradualment reemplaçada per la distrofina (Koga R 1993). Des d'aquest moment en endavant, en el múscul normal, la utrofina només es detecta a les unions neuromusculars i a les unions miotendinoses (Bewick GS 1992, Law DJ 1994). En el ratolí mdx així com en la DMD la utrofina sovint es detecta en membranes de fibres regeneratives (Khurana TS 1991, Ohlendieck K 1991, Pons F 1991, Karpati G 1993). Una hipòtesi que s'ha defensat per explicar el canvi en el grau de necrosi del ratolí mdx, és que proteïnes estructuralment

relacionades amb la distrofina, com la utrofina, puguin estar compensant la seva carència, unint-se al complex de proteïnes associades a la distrofina i portant a terme una funció compensatòria. Aquest mecanisme de compensació podria donar-se amb molt més èxit en el ratolí mdx que en els humans amb DMD. S'ha demostrat que la sobreexpressió de utrofina en un ratolí mdx (és a dir que no té distrofina però sí grans quantitats de utrofina) millora significativament el seu fenotip distròfic (Deconinck N 1997) i que ratolins carents de distrofina i utrofina pateixen una patologia bastant més severa que el ratolí mdx, sense implicacions cardíaques o neurològiques observables (Deconinck AE 1997, Grady RM 1997, Rafael JA 1998). Ja que no vam trobar dades a la bibliografia sobre l'evolució dels nivells de utrofina al llarg de tota la vida del ratolí mdx ens vam plantejar amb la màxima precisió possible l'evolució dels seus nivells de utrofina, així com els del seu lligand directe, el β -dístroglicà. També ens vam preguntar quina relació mantindrien els nivells de utrofina amb la severitat de la malaltia que trobem a cada edat del ratolí mdx.

7.3.4- Anatomia del grup muscular del gastrocnemi (GMG) del ratolí:

El grup muscular gastrocnemi (GMG) és el múscul que hem escollit per realitzar les nostres observacions i experiments. Es va escollir per ser un grup muscular fàcilment accessible, sense especials dificultats en la seva manipulació, amb representació de diferents tipus de múscul i diferents tipus de fibra i a més, perquè és un grup muscular parell la qual cosa ens permet de disposar de dues mostres en cada ratolí o bé per reservar-ne una com a control (en els casos en que es tracta una de les dues extremitats i l'altre es deixa intacte). És l'equivalent dels bessons o panxell de les extremitats posteriors de l'humà. El GMG del ratolí està integrat per 5 músculs: múscul gastrocnemi lateral (GL), múscul gastrocnemi medial (GM), múscul flexor superficial dels dits (FSD), múscul soli (S) i múscul flexor profund dels dits (FPD) (Fig. 10). En un tall transversal, l'àrea externa del terç superior està ocupada pel

múscul GL, i l'àrea interna pel múscul GM. L'àrea central presenta el múscul S ventralment i el múscul FSD dorsalment. En la confluència entre els músculs GL, S i FSD s'allotja el tronc nerviós ciàtic-popliti, normalment dividit a aquest nivell en 2 branques de gran calibre (Fargas A. 2003) (Fig 9).

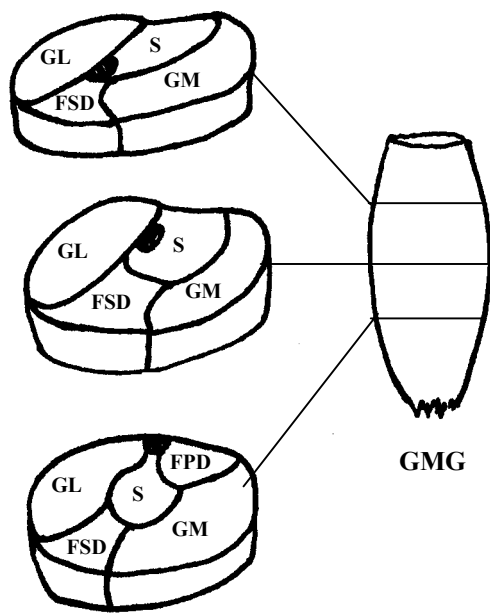


Figura 9 – Anatomia del grup muscular del gastrocnemi (GMG) en diferents seccions. El GMG del ratolí està integrat per 5 músculs: múscul gastrocnemi lateral (GL), múscul gastrocnemi medial (GM), múscul flexor superficial dels dits (FSD), múscul solí (S) i múscul flexor profund dels dits (FPD). El cercle negre indica la posició del tronc nerviós ciàtic-popliti en cada secció.

OBJECTIUS

Tot i que el ratolí mdx no està considerat per molts com un model òptim de la DMD, en el nostre parer és un model excel·lent per estudiar i caracteritzar el fenomen de la necrosi i la regeneració repetida en el que es conserva la membrana basal. Un dels aspectes que ens va interessar més després d'una revisió extensa de la literatura va ser la manca de consens a l'intentar explicar les diferències d'evolució de la patologia observades entre el ratolí mdx i els humans amb DMD. Un gran nombre d'autors ha subscrit la hipòtesi que el ratolí té una capacitat regenerativa més elevada que li permet de compensar millor que l'humà la seva patologia muscular. Altres, en canvi, han apuntat que una disminució en el grau de necrosi podria ser l'explicació del curs més benigne de l'absència de distrofina en el ratolí mdx. Per tal d'intentar donar resposta a aquesta qüestió ens vam disposar a estudiar detingudament l'evolució de la malaltia al llarg de tota la vida del ratolí mdx. Per això en una primera fase, ens vam plantejar els dos primers objectius:

Objectiu 1 - Caracterització de la cronopatologia del Grup Muscular del Gastrocnemi en el ratolí mdx.

Objectiu 2 - Quantificació bioquímica del grau de necrosi-regeneració en cada moment de la vida del ratolí mdx mitjançant marcadors proteics adequats, com a complement de les nostres observacions anatomo-patològiques.

Ja que la necrosi muscular en les distrofinopaties s'atribueix principalment a la inestabilitat de la membrana secundària a l'absència de distrofina, ens vam plantejar si altres

proteïnes podien estar contribuint a donar una major estabilitat a la membrana muscular del ratolí. Per tal de respondre a aquesta hipòtesi vam plantejar-nos el següent objectiu:

Objectiu 3 - Quantificació evolutiva dels nivells d'expressió de diverses proteïnes de membrana muscular i correlació d'aquests amb el grau de necrosi-regeneració del ratolí mdx.

Per tal d'intentar donar resposta a una de les qüestions plantejades inicialment en aquesta tesi: el ratolí suporta millor la malaltia que l'humà, no pas perquè tingui una capacitat regenerativa més alta, sinó perquè disminueix el seu ritme de necrosi, es va escollir una estratègia alternativa, que va ser la de investigar l'efecte de la carència de proteïnes que participen en la regeneració muscular, sobre el fenotip del ratolí mdx. Dades prèvies publicades a la literatura indicaven que la proteasa uPA podia ser un bon candidat per aquest tipus d'estudi. D'aquí es van derivar els objectius 4 i 5.

Objectiu 4 - Demostració i caracterització del paper de la proteasa uPA en un model de regeneració muscular aguda.

Objectiu 5 - Establiment i caracterització d'una soca de ratolí doble mutant per la distrofina i per la proteasa uPA (mdx-uPA/-).

Finalment, per tal de trobar d'altres factors no implicats fins el moment en la disminució de la necrosi o en la regeneració musculars es va portar a terme un estudi d'expressió diferencial de

gens comparant el ratolí mdx i la seva soca control. D'aquí es desprèn l'últim objectiu d'aquesta tesi:

Objectiu 6 - Identificació i caracterització de nous factors implicats en la disminució de la necrosi i/o en la regeneració del ratolí mdx mitjançant un estudi d'expressió diferencial de gens.

MATERIALS I MÈTODES

1-Animals:

Totes les soques de ratolí emprades en aquest estudi han estat mantingudes sempre a temperatura constant, amb cicle natural de llum/foscor de 12 hores, seguint una dieta comercial estàndard i aigua *ad libitum*, sempre d'acord amb la normativa del Reial Decret nº 223 (1998). Tots els animals van ser sacrificats per dislocació cervical i anestesiats sempre que va ser necessari tal i com es detalla posteriorment.

1.1 - Soques C57Bl10/ScSn-mdx (mdx) i C57Bl10/ScSn (Control):

1.1.1 – Obtenció de les soques:

Per tal de portar a terme la part central d'aquest treball es va utilitzar la soca distròfica mdx (C57Bl10/ScSn-mdx) i el seu respectiu control (C57Bl10/ScSn) que van ser adquirits inicialment de *Jackson Laboratories* (Maine, Estats Units d'Amèrica). Per tal d'obtenir mostres amb la màxima similitud genètica possible es van dissenyar encreuaments per obtenir ventrades on es trobés almenys un ratolí mdx i un ratolí control. Per tal d'obtenir mascles sans i afectes en una mateixa ventrada vam encreuar una femella homozigota per la mutació mdx i un mascle sa (soca C57Bl10ScSn) per tal d'obtenir femelles heterozigotes per la mutació mdx. Aquestes femelles van ser encreuades novament amb mascles sans per obtenir un teòric 50% dels mascles sans i un 50% d'afectes, tal i com es detalla en la figura 10 de la pàgina següent:

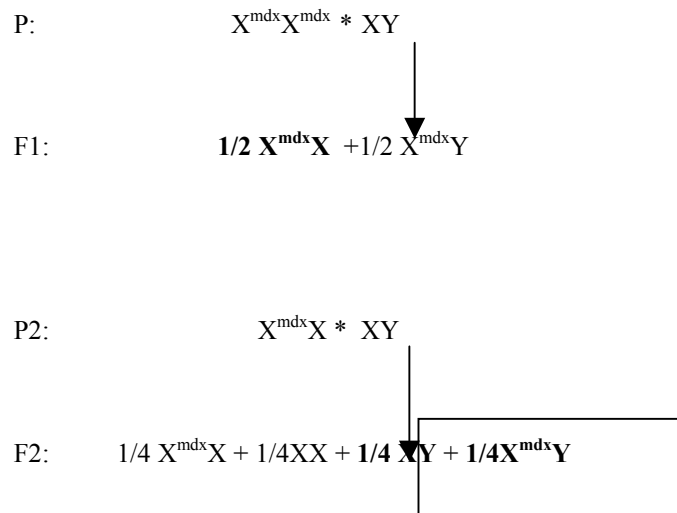


Figura 10 - Obtenció dels ratolins mdx i controls en la mateixa ventrada. Per tal d'obtenir mascles sans i afectes en una mateixa ventrada vam encreuar una femella homozigota per la mutació mdx i un mascle sa (soca C57Bl/10ScSn) per tal d'obtenir femelles heterozigotes per la mutació mdx. Aquestes femelles van ser encreuades novament amb mascles sans per obtenir un teòric 50% dels mascles sans i un 50% d'afectes (recuadre).

1.1.2 - Identificació del fenotip/genotip:

Per tal de discriminar ratolins mdx i ratolins sans (controls) es va utilitzar la tècnica del *Western blot* amb un anticòs contra la distrofina. Ja que tots els ratolins que comparem en aquest estudi són mascles, no calia discernir entre heterozigots i homozigots, simplement entre ratolins sans (amb distrofina) i afectes o mdx (sense distrofina). Per a portar a terme aquesta identificació es va obtenir una petita mostra de múscul de l'extremitat superior dreta dels mascles a analitzar (prèviament anestesiats amb droperidol a una dosi 0,08 mg/g de pes corporal), fent una petita incisió a la pell, separant la fascia i tallant amb un bisturí una petita porció de múscul que va ser congelada en nitrògen líquid immediatament. El múscul obtingut va ser trossejat amb bisturí i immediatament incubat en tampó de lisi (75 mM Tris-HCl pH: 6.8, 4% SDS, 4 M Urea and 20% Glicerol) durant 4 minuts a 90°C. Es va quantificar el total de proteïna (*Bio-Rad DC assay kit*, *Bio-Rad Laboratories*, Hercules, Estats Units d'Amèrica) i

després de l'addició de 5% de β -mercaptoethanol i 0.001% de blau de bromofenol, 100 μ g de proteïna van ser carregats en cada carril del *Western-blot* en gel de poliacrilamida al 6% a 100V durant unes 3 hores. Es va transferir sobre membrana de nitrocel·lulosa durant 2 hores i mitja a 100V. Es van bloquejar les unions inespecífiques incubant la membrana tota la nit a 4°C en PBS, 0,1% Tween-20 i 2% de llet descremada en pols. Es va incubar la membrana 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs monoclonal de ratolí anti-distrofina (*Novocastra Laboratories*, Newcastle upon Tyne, Regne Unit) (dilució 1:160) dirigit contra l'extrem C-terminal de la distrofina humana, amb reacció positiva per la de ratolí. El secundari de conill contra ratolí (*DAKO*, Glostrup, Dinamarca) (dilució 1:2000) incubat també 1 hora a temperatura ambient. Els rentats es van portar a terme amb PBS-0,1% Tween-20.

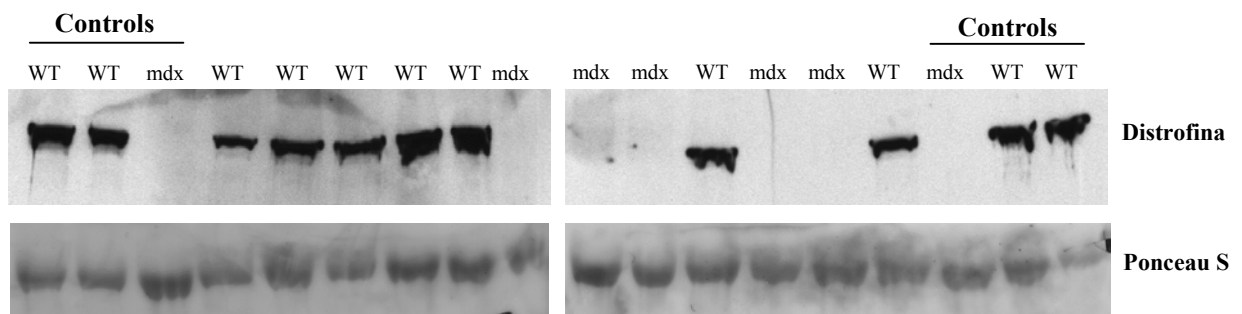


Figura 11 - Exemple del Western utilitzat per genotipar els ratolins. Tal i com es pot veure en l'imatge els resultats obtinguts ens permetien un clar genotipat dels ratolins. Tots els ratolins usats en l'estudi van ser mascles. WT: ratolins control, mdx: ratolins mdx.

Es va revelar utilitzant el substrat de quimioluminiscència ECL (*Amersham-Pharmacia Biotech*, Uppsala, Suècia). Posteriorment, la membrana de nitrocel·lulosa es va tenyir amb *Ponceau S* (*BioRad Laboratories*, Hercules, Estats Units d'Amèrica) per tal de visualitzar la banda de miosina per utilitzar-la com a control.

Per tal de verificar la correcta identificació del genotip dels ratolins, en un de cada 4 ratolins, després del sacrifici es van recollir mostres de múscul addicionals per realitzar estudis immunohistoquímics amb el mateix anticòs Dys2 (*Novocastra Laboratories*, Newcastle upon Tyne, Regne Unit) coincidint els resultats amb els dels *Western-blot* en un 100% dels casos. Per escollir les edats de sacrifici dels ratolins, ens vam basar en els resultats obtinguts en l'estudi de la cronopatologia del ratolí mdx. Segons això, per tal de tenir punts d'anàlisi abans del moment de màxima necrosi, durant la fase de màxima necrosi i després de la fase de màxima necrosi vam recollir músculs a les edats següents: 1, 3, 5, 10, 15, 20 i 25 dies i 1, 2, 3, 6, 9 i 12 mesos.

1.2 - Les soques uPA^{-/-}, tPA^{-/-} i C57BL/6 (control):

1.2.1 – Obtenció de les soques:

Les soques Knock Out (KO) per uPA^{-/-} i tPA^{-/-}, així com el seu respectiu control C57BL/6 que es van usar en part d'aquesta tesi, estan establades a l'animalari de l'Institut de Recerca Oncològica i són propietat de la Dra. Pura Muñoz-Cànoves, ja que la part del treball dedicada al paper de uPA en la regeneració muscular es va portar a terme en col.laboració amb el seu grup de recerca. Es van utilitzar animals de les tres soques d'entre 9 i 12 setmanes d'edat. Aquestes soques van ser inicialment cedides per el Dr. Peter Carmeliet (*Centre for Transgene Technology and Gene Therapy*, Leuven, Bèlgica).

1.2.2 - Inducció de la necrosi-regeneració muscular:

La regeneració muscular va ser induïda per lesió amb glicerol mitjançant la punció intramuscular amb 50 µl d'una solució al 50% vol/vol de glicerol/sèrum salí fisiològic en el grup muscular del gastrocnemi (GMG) (Kawai H 1990, Fargas A 2002). En algun experiment puntual també es va iduïr la lesió mitjançant congelació-aixafament (*freeze-crush*)

(McGeachie 1987). L'extremitat lesionada va ser la posterior dreta, mentre que l'extremitat contralateral es va preservar intacte per fer de control. Els exàmens morfològics i bioquímics es van realitzar sobre mostres recollides als 2, 5, 7, 9 i 20 dies després de la lesió. Quatre animals de cada una de les tres soques van ser estudiats en cada temps post-lesió.

1.2.3 - Desfibrinogenació sistèmica:

Per tal de provocar la desfibrinogenació sistèmica dels animals es van implantar subcutàniament unes mini-bombes osmòtiques model 1002 (*Alza*, Palo Alto, Estats Units d'Amèrica) plenes amb una solució tamponada de 500U/ml de ancrod (*Sigma Chemical*, St Louis, Estats Units d'Amèrica), proteasa fibrinolítica extreta del verí de la serp *Adkistrodom Rhodostoma* (Víbora de Malàisia). Els animals van ser anestesiats (Droperidol a una dosi de 0,08 mg/g de pes corporal) i se'ls va col·locar a cada un una mini-bomba sota la pell de l'esquena, després d'haver-los practicat una incisió que va ser posteriorment suturada. Aquestes bombes alliberen 0,25 µl/hora, la qual cosa suposava que ens subministraven 3U de ancrod/dia a cada ratolí (total de 3 ratolins uPA/-/-). En els animals control es van col·locar les mateixes bombes però, en aquest cas, dispensant sèrum salí fisiològic (3 ratolins). El tercer dia després de la impantació de la bomba es va provocar la lesió muscular amb injecció intramuscular de glicerol en el centre del grup muscular del gastrocnemi (GMG). 9 dies després de la lesió, els ratolins van ser sacrificats i els seus músculs extrets, congelats i tallats tal i com es descriu en l'apartat 5.

1.3 - Establiment del doble mutant mdx-uPA-/-:

1.3.1 – Encreuaments:

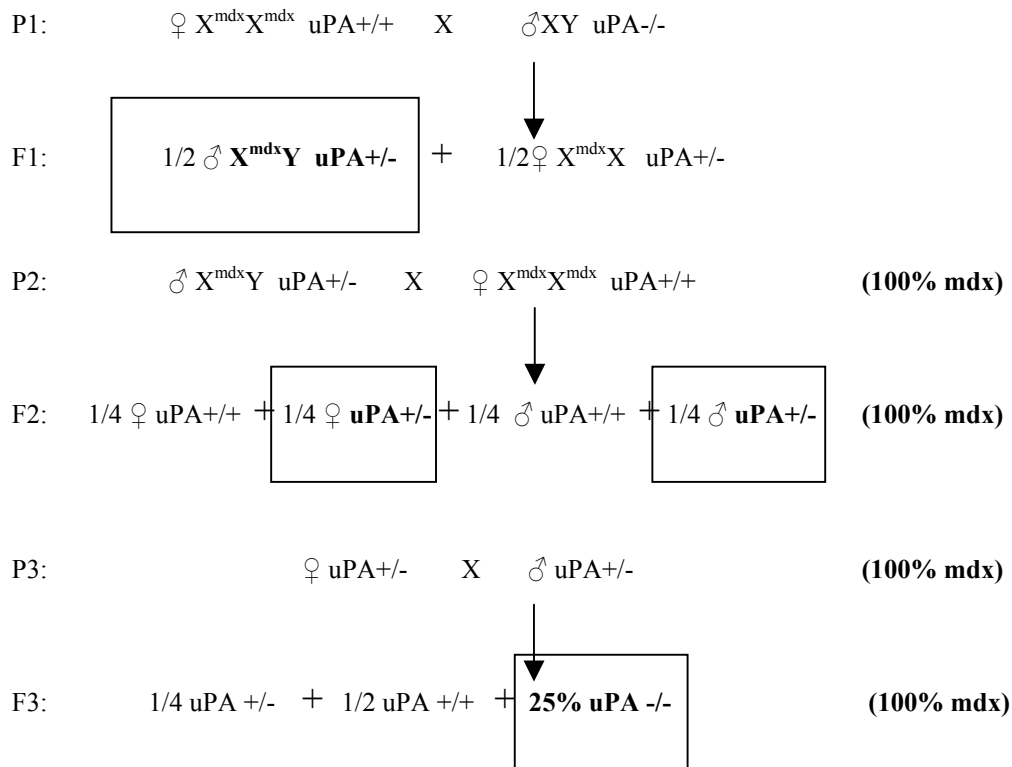


Figura 12 - Obtenció de la soca doble mutant mdx-uPA-/-. Per tal d'obtenir la soca doble mutant es van encreuar una femella mdx amb un mascle uPA-/- . De la generació resultant vam seleccionar els mascles (heterozigots per uPA i mdx). Aquests van ser encreuats de nou amb una femella mdx. a partir d'aquí tot el background genètic és 100% mdx. Dels ratolins obtinguts en aquest segon encreuament es van seleccionar els heterozigots per uPA, tan mascles com femelles que van ser encreuats entre sí, evitant sempre el creuament entre germans. La generació resultant havia de contenir un teòric 25% de ratolins dobles mutants mdx-uPA-/- Els requadres ens marquen els ratolins resultants de cada aparellament que vam utilitzar per obtenir la següent generació.

Per tal d'aconseguir la soca doble mutant per la distrofina i per la proteasa uPA es van dissenyar uns encreuaments en que, a partir de la segona generació (P2), tot el fons genètic era mdx (aprofitant que és un gen d'herència lligada al cromosoma X), facilitant-nos així el seu genotipatge. Els requadres ens marquen els ratolins resultants de cada aparellament que vam utilitzar per obtenir la següent generació. Els encreuaments es van portar a terme tal i com es detallen en la pàgina anterior (Fig. 12).

1.3.2 – Identificació del fenotip/genotip:

Tal i com es van dissenyar els aparellaments, tot el background genètic a partir del segon encreuament (P2) ja era 100% mdx. Per tant, rutinàriament només ens calia demostrar la presència de l'al.lel truncat de uPA. Malgrat això, l'absència de distrofina es va comprovar mitjançant *Western-blot* tal i com es descriu en l'apartat 1.1.2 d'aquest material i mètodes. Per tal d'analitzar la presència del gen uPA es va portar a terme l'extracció de DNA de la cua del ratolí i PCR amb primers pertanyents a l'al.lel salvatge (WT) i a l'al.lel truncat (Knock Out o KO). Per això disposàvem de dues parelles de primers que ens permetien distingir entre ambdós. Els *primers* eren els següents:

uPAG240 (al.lel salvatge i KO 3'): 5'-CAGAGGGGAGAGACTGCCCGGCTTGGG-3'

uPAG689 (al.lel salvatge 5'): 5'-GGTACTCCCCGTGGCTTCTTCCTCCCTTG-3'

PGKpA (al.lel KO 5'): 5'-AATGTGTCAGTTTCATAGCC-3'

L'al.lel WT s'amplifica amb la combinació de uPAG240 i uPAG689 (producte de 440bp) i l'al.lel *Knock Out* amb uPAG240 i PGBKpA (reconeix el vector amb que es va interrompre el gen de uPA al fer el ratolí KO) (producte de 300bp). La PCR es va portar a terme amb una desnaturalització inicial de 5 minuts a 95°C, seguida de 35 cicles amb una desnaturalització de 1 minut a 94°C, *annealing* de 1 minut a 55°C i extensió de 1 minut a 72°C, seguit de una extensió final de 10 minuts a 72°C. Es van utilitzar 50 ng de DNA inicial per cada reacció de PCR de 50 µl. La PCR es va portar a terme en presència de 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM

Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% Tween-20 i 1,5 mM MgCl₂ i 0.01U/μl de Taq polimerasa (*Ecogen*, Madrid, Espanya). Els resultats obtinguts es poden veure en l'exemple de la Figura 13.

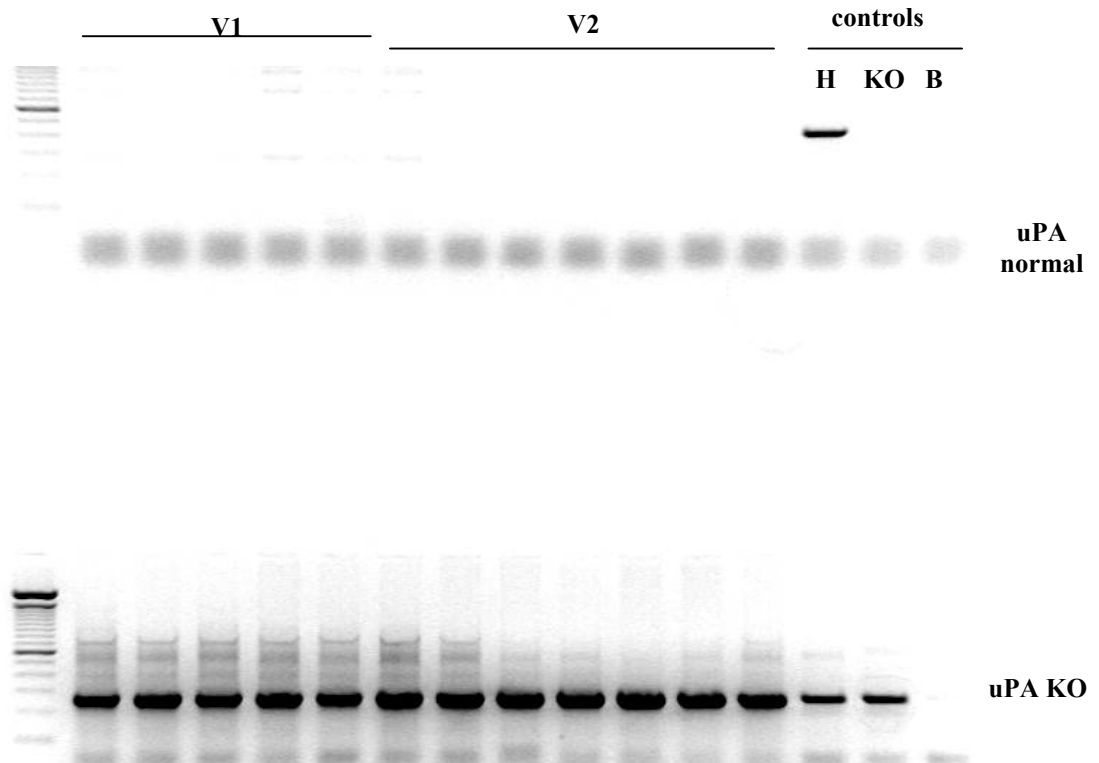


Figura 13 - Exemple de genotipat per PCR distingint els al·lels uPA normal i uPA KO. En aquest cas, es genotipaven de les dues primeres ventrades (V1 i V2) de la quarta generació en la que tots els ratolins s'esperava que fossin homozigots per l'al·lel uPA KO. Tal i com era d'esperar, tots els ratolins van ser homozigots per uPA KO. Els controls usats van ser un ratolí heterozigot (H), un homozigot per uPA KO (KO) i un blanc sense DNA (B).

2 - Processament de les mostres musculars de ratolí:

El teixit muscular de ratolí que s'ha analitzat en aquesta tesi s'ha extret del grup muscular del gastrocnemi (GMG). Aquest grup muscular s'ha triat per la seva accessibilitat, per estar compostat per músculs de diferents tipus (composició de tipus de fibra) i per tractar-se d'un múscul que duplicat. Per fer-ne l'extracció, es col·loca l'animal en posició de *decúbit pronus*, es practica un tall amb tisora de la pell que el recobreix. A continuació, es rebutja la

pell i el teixit subcutani de tota l'extremitat inferior per dissecció amb bisturí i pinces, quedant tota l'extremitat inferior al descobert, just a nivell de les aponeurosis musculars superficials. Seguidament es procedeix a pinçar el tendó d'Aquil·les amb *Kocher*, per a evitar el gir de l'extremitat durant la manipulació. A continuació es secciona de forma incompleta el quàdriceps femoral, a nivell de la unió del terç mig amb el terç proximal del quàdriceps, en sentit postero-anterior fins arribar al fèmur. D'aquesta manera aconseguim rebutjar la part del quàdriceps que tapa el GMG. Un cop alliberat de totes les seves relacions posteriors i laterals, obtenim el GMG seccionant el tendó d'Aquil·les per sota del "*Kocher*" que havíem col·locat, alhora que estirem el *Kocher*, fent una lleu tracció al zènit per a que s'alliberin les darreres adherències entre el GMG i la cara dorsal del fèmur. Un cop obtingut el GMG, es procedeix immediatament a la seva congelació en isopentà refredat en nitrogen líquid i posteriorment a -80°C fins el moment de la seva utilització.

3 -Tincions histològiques:

Al llarg d'aquesta tesi s'han utilitzat diverses tincions histològiques clàssiques. La més utilitzada ha estat l'Hematoxilina de Harris-Eosina, que ens permet tenir una visió general del múscul i poder objectivar l'aspecte anatòmic de cada múscul, però també visualitzar les fibres i els seus nuclis, els grups necròtics en diferents estadis, l'infiltrat inflamatori, etc. Per altres qüestions més específiques hem utilitzat també altres tincions. La tinció de blau de Toluidina i la de Giemsa van ser usades inicialment per contar mastòcits, ja que ens donen un marcatge molt clar d'aquest tipus cel·lular. Posteriorment però, també les vam usar per interpretar l'anatomia, ja que al igual que l'Hematoxilina-eosina, també donen una bona visió del teixit muscular en general, especialment el blau de Toluidina. La tinció de Von Kossa va ser utilitzada per visualitzar dipòsits de calci a l'interior de les fibres necrosades, mentre que la de

Pearls va servir per descartar possibles acúmuls de ferro en la fibra necrosada. La tinció de PAS va ser utilitzada per descartar la presència de dipòsits d'hidrats de carboni.

4 - Morfometria:

Els anàlisis morfomètrics que es van portar a terme es van realitzar mitjançant un mètode computeritzat, utilitzant un software específic (*Scion image analysis software for Windows, Scion Corporation, Frederick, Estats Units d'Amèrica*). Es van examinar quatre ratolins mdx i quatre controls per cada una de les edats analitzades. Els contactges es van fer sobre seccions tenyides amb Hematoxilina-Eosina i amb blau de Toluidina. Es van contabilitzar diversos camps elegits a l'atzar de cada GMG. Entre 1500 i 2100 fibres per animal van ser analitzades. Tots els tipus de fibres que van poder ser visualitzades van ser incloses en l'estudi morfomètric. Es va utilitzar el criteri de medició proposat per Dubowitz en que es mesura com a diàmetre de la fibra, el seu diàmetre menor. Els nuclis no perifèrics de fibres madures (excloent miotubs) van ser encerclats digitalment utilitzant una unitat digitalitzadora mitjançant un bolígraf digital. Hem utilitzat el terme de grups degeneratius-regeneratius (GDR) proposada per Engel (Engel AG 1987) per descriure els grups de fibres en necrosi-regeneració ja que ambdós fenòmens sovint poden ser observats simultàniament en un mateix múscul. Per aquest estudi, i depenent del nombre de fibres de cada grup necròtic, els GDRs van ser dividits en tres grups: GDRs petits amb 5 o menys fibres implicades, GDRs mitjans que afecten de 6 a 15 fibres i GDRs grans amb més de 15 fibres afectades. El nombre de GDRs així com el nombre de mastòcits de cada secció van ser comptabilitzats a través de l'ocular del microscopi òptic amb una quadrícula incorporada per facilitar el contactge de cada camp (*Olympus 10/100 grid eyepiece, Hamburg, Alemanya*). Es va fer un escombrat al llarg de tota la superfície de cada secció muscular analitzada (3 per cada ratolí, i quatre ratolins per cada una de les edats analitzades). Pel contactge de GDRs, nuclis no perifèrics i tamanys de

fibres es va utilitzar la tinció de Hematoxilina-eosina. Pel contacte de mastòcits, es va utilitzar seccions adjacents, una tenyida amb blau de Toluidina i l'altre amb Giemsa (l'anàlisi es va portar a terme en quatre ratolins per cada edat de l'estudi). Les edats analitzades van ser les següents: 2, 3 i 4 setmanes i 2, 3, 4, 6, 9, 12, 18 i 24 mesos.

5 - Tècniques immunohistoquímiques:

Les seccions criostàtiques de 10 micres de gruix i fixades sobre portes tractats amb poli-L-Lisina van ser incubades durant 1 hora amb els següents anticossos primaris: anticòs monoclonal de ratolí anti-distrofina (*Novocastra Laboratories*, Newcastle upon Tyne, Regne Unit), diluït a 1:20, anticossos policlonals de conill anti-Col.làgens III i VI (*Chemicon*, Temecula, Estats Units d'Amèrica), ambdós anticossos diluïts a 1:100 anticòs monoclonal de ratolí anti-miosina del desenvolupament (MHCd) (*Novocastra Laboratories*, Newcastle upon Tyne, Regne Unit), diluït a 1:20, anticòs monoclonal de ratolí anti-fibrinògen (cedit pel Dr. Keld Dano, Fisenlab, Dinamarca, diluït a 1:1000), anticòs monoclonal de ratolí anti-Mac-1 (*Pharmingen- Becton Dickinson*, Franklin Lakes, Estats Units d'Amèrica) diluït a 1:30 i anticòs policlonal de ratolí anti-CD-31 (*Pharmingen- Becton Dickinson*, Franklin Lakes, Estats Units d'Amèrica) diluït a 1:25. Posteriorment, es va incubar amb el secundari adequat marcat amb peroxidasa. Es va usar un sistema de revelat basat en la activitat peroxidasa sobre el seu substrat (peròxid d'hidrogen), i amb una reacció acoblada a la primera que, a partir de la diaminibenzidina (DAB) dona lloc un precipitat de color marró sobre les parts immunoreactives del teixit.

6 - Microscopia electrònica:

Els resultats de microscopia presentats en aquesta tesi es van realitzar en col.laboració amb el Dr. Isidre Ferrer de La Ciutat Sanitària de Bellvitge amb el microscopi electrònic de la Unitat de Patologia. Les mostres van ser fixades en glutaraldehid, postfixades en tetraòxid d'osmi, deshidratades amb etanol i propilenòxid i incloses en araldita. Els talls ultrafins, abans de ser visualitzats al microscopi electrònic, van ser contrastats amb acetat d'urani i citrat de plom.

7 - Western-blots per MMP-9, MHCd (200 KDa), utrofina

(400 KDa) i β -dístroglicà (43KDa):

Les peces de múscul congelades van ser triturades en un morter de porcellana sobre neu carbònica i immediatament incubades en tampó de lisis (75 mM Tris-HCl pH: 6.8, 4% SDS, 4 M Urea and 20% Glicerol) durant 4 minuts a 90°C. La proteïna total es va quantificar usant el sistema *Bio-Rad Dc Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, Estats Units d'Amèrica) de quantificació de proteïna. Després de l'addició de 5% de β -mercaptoethanol i 0.001% de blau de bromofenol es van córrer 50 μ g de proteïna/carril (excepte per MHCd amb 100 μ g) en un gel de poliacrilamida al 6% (gel separador, *resolving gel*) per la utrofina, 10% per MMP-9, MHCd i β -dístroglicà. el gel es va resoldre a 100V durant unes 3 hores per la utrofina (400 KDa) i entre 1 i 2 hores per les altres proteïnes de menor tamany (MMP-9, MHCd i β -dístroglicà). Es va transferir a 100 V sobre una membrana de nitrocel.lulosa (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, Estats Units d'Amèrica) durant 2 hores i mitja a 100V per la utrofina i durant 1 hora al mateix voltatge per MMP-9, MHCd i β -dístroglicà .

Es van bloquejar les unions inespecífiques incubant les membranes tota la nit a 4°C en PBS, 0,1% Tween-20 i 2% de llet descremada en pols. Les membranes es van incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb els següents anticossos: anticòs monoclonal de ratolí anti-utrofina

(*BD-Transduction Laboratories*, Lexington, Estats Units d'Amèrica) diluït 1/250, anticòs monoclonal de ratolí anti- β -dístroglicà (*Novocastra Laboratories*, Newcastle upon Tyne, Regne Unit) diluït 1/50, anticòs monoclonal de ratolí anti-MHCd (*Novocastra Laboratories*, Newcastle upon Tyne, Regne Unit) diluït 1/200 i anticòs policlonal de conill anti-Metaloproteïna-9 (*Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, Estats Units d'Amèrica) per metaloproteïna-9 diluït a 1/200. El secundari rabbit-antimouse (dilució 1:2000 per MHCd, utrofina i β -dístroglicà) i el secundari goat-antirabbit (1:2000 per MMP-9) van ser incubats també durant 1 hora a temperatura ambient. Els rentats es van portar a terme amb PBS-0,1% Tween-20. Es va revelar utilitzant el substrat de quimioluminiscència ECL (*Amersham-Pharmacia Biotech*, Uppsala, Suècia). Es va córrer en paral·lel un gel que va ser tenyit amb Coomassie per tal de visualitzar la banda de miosina i utilitzar-la com a control. L'anàlisi densitomèric es va fer utilitzant un scanner i un PC amb el software Molecular Analyst (*BioRad Laboratories*, Hercules, Estats Units d'Amèrica).

8 - Extracció de RNAs:

8.1 - Extracció de RNA total:

Per procedir a l'extracció del mRNA es va homogenitzar el teixit en un morter sobre neu carbònica i ple de nitrògen líquid. Un cop el teixit del tot triturat el mRNA va ser extret segons el procediment del Trizol (*Sigma Chemical*, St Louis, Estats Units d'Amèrica) basat en el mètode d'extracció de RNA total descrit per Chomczynski i Sacchi (Chomczynski P 1987).

8.2 - Extracció de RNA missatger:

Per procedir a l'extracció del mRNA, el teixit homogenitzat va ser resuspès i purificat segons el protocol *del QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suècia)*. Els mRNAs obtinguts van ser resuspendos en aigua tractada amb DEPC, quantificats usant l'espectofotòmetre *GeneQuant II (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suècia)* i guardats a -80°C fins el moment de la seva utilització.

9 - RT-PCR:

9.1 - Retrotranscripció:

El mRNA va ser retrotranscrit a partir de *Random Primers (Random Hexamers, Life-Technologies, Carlsbad, Estats Units d'Amèrica)*, en un volum total de 20 μl , utilitzant la retrotranscriptasa SuperScript II (Life-Technologies, Carlsbad, Estats Units d'Amèrica) amb 200 U/reacció, 25mM Tris-Cl, 75mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM ditiotretitol, 0,5 mM de cada dNTP, 150 ng de Random Primers i 190 ng de mRNA en cada reacció. La retrotranscripció es va portar a terme en un termociclador Perkin-Elmer 2400 amb el següent programa: 10 minuts a 70°C , 10 minuts a 25°C , 50 minuts a 42°C , 15 minuts a 70°C per acabar el programa a 4°C per temps indefinit. La retrotranscriptasa va ser afegida als 2 minuts d'iniciar-se la incubació a 42°C .

9.2 - Amplificació per reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

dels Gens Control:

Per tal de trobar un bon gen control pel nostre teixit muscular, vam assajar amb diversos gens control prèviament utilitzats. Concretament, vam analitzar l'expressió de la Gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (GAPDH), la ciclofilina A (CypA) i la proteïna ribosomal L19. L'expressió de les tres va ser assajada a totes les edats seleccionades per l'estudi (10 dies i 1,2,3,5 i 8 mesos) tan pels ratolins control com pels mdx. Es va optimitzar també el nombre de cicles per verificar que ens trobàvem dins de la fase exponencial de l'amplificació. Les parelles de primers i característiques generals de la PCR es resumeixen en la Taula 1.

Seqüència	Primers	Cicles PCR	T^a annealing	Producte (bp)
Utrofina	UT5275U: 5'-GGCTTGGACCCTGCTGGAAC-3' UT5915L: 5'-CCTCCATTCCTCCACAGCCC-3'	38	56.5	660
DRP2	2DRP592U: 5'-TCTATGGTGTGGCTGGCTGTT-3' 2DRP956L: 5'-CATCGGGGAAGAAGCAGGTG-3'	38	57.4	384
Espectrina	S3989U: 5'-CCGAAGACTGGTGAGCGATGGG-3' S4389L: 5'-GGCCTTGGTCTGGGTTGTGGATTC-5'	38	57.4	424
GAPDH (*)	GAPDH-L:5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3' GAPDH-U: 5'-CGTGGAGTCTACTGGCGTCTTCAC-3'	23	–	695
Ciclofilina A (*)	CypA-U: 5'- CAGATGGGGTAGGGACG-3' CypA-L: 5'-ATGGTCAACCCCACCACCGTG-3'	40	–	569
L19 (*)	ML19U: 5'-CATTCCCGGGCTCGTTGC-3' ML19L: 5'-TTCTTGCGGGCCTTGCTGC-3'	31	–	290
Banda 2	rB2U: 5'-GGACATTCTGTAGCCCAGGACC-3' rB2L: 3'-CCTTGTCAAAAGATGGCTGTGC-3'	38	55.6	115
CD63	CD63U:5'-TGGCGGTGGAAGGAGGAATG-3' CD63L:5'-AAGGCCACCAGGAAGAGGAAGG-3'	35	59.0	205

Taula 1 - Resum de primers utilitzats i condicions de les PCR's semiquantitatives. (*) Pels gens control no s'indica temperatura d'*annealing* perquè sempre s'utilitza la temperatura del gen problema que s'està estudiant en cada moment.

9.3 - Amplificació per PCR de la utrofina, la DRP2, la β -espectrina, la banda 2 (B2) i CD63:

Les condicions de les PCR van ser les següents: Una desnaturalització inicial a 94°C durant 5 minuts, seguida de 40 cicles amb una desnaturalització de 94°C per 15 segons, *annealing* de 30 segons segons temperatura indicada a la Taula 2.1 i extensió de 45 segons, seguit de una extensió final de 10 minuts a 72°C, per acabar el programa a 4°C. Es van utilitzar 50 ng de DNA inicial per cada reacció de PCR de 50 μ l. La PCR es va portar a terme en presència de 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% Tween-20 i MgCl_2 1,5 mM i 0.01U/ μ l de Taq polimerasa. Els primers utilitzats per cada amplificació i les condicions utilitzades per cada un d'ells es resumeixen en la Taula 1 (pàgina anterior). Per tal de comprovar la identitat de les bandes obtingudes en cada amplificació, aquestes van ser eluïdes., clonades i seqüenciades tal i com es datalla en l'apartat 12.4.

9.4 – Amplificació per PCR de les isoformes de la utrofina:

Les condicions de les PCR van ser les següents: una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C , seguida de 40 cicles amb una desnaturalització de 20 segons a 94°C, *annealing* de 30 segons a 57.0°C i extensió de 1 minut 30 segons a 72°C, seguit d'una extensió final de 10 minuts a 72°C. Es van utilitzar 50 ng de DNA inicial per cada reacció de PCR de 50 μ l. La PCR es va portar a terme en presència de 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% Tween-20 i MgCl_2 1,5 mM i 0.01U/ μ l de Taq polimerasa.

Els primers utilitzats per cada amplificació i les seves característiques es resumeixen en la Taula 2. Per comprovar la identitat de les bandes obtingudes en cada amplificació, aquestes van ser eluïdes, clonades i seqüenciades tal i com es datalla en l'apartat 12.4.

Fragment amplificat	Primers	Cicles PCR	T ^a òptima annealing	Producte (bp)
41-2324	5'-GGCAGAACGAATTCAGTGACATC-3' 5'-TCTTCCACTCCAACGAAACCC-3'	40	57.8	2304
2320-4075	5'-CAAACCCTTTCGTTGGAGTG-3' 5'-CTGTCCGTCAGGTATGTGGTAAG-3'	40	57.0	1778
4073-5898	5'-AGCTTACCACATACCTGACGGAC-3' 5'-CCTGGCAAAGGACCCTCTC-3'	40	57.3	1844
5858-7679	5'-ACGCAAAATGGGACCGAGTGAAT-3' 5'-TCCAGCGATGCCAGCAACC-3'	40	59.5	1840
7653-9342	5'-GGAGGCCAGTGCTGAGAAATG-3' 5'-CTTCCCCAGATGTTGTCGGTATG-3'	40	58.1	1712

Taula 2 - Resum de primers utilitzats i condicions de les PCR's per verificar l'existència de processaments alternatius (*splicings*) del mRNA de la utrofina. Com es pot apreciar en la figura, el fragment amplificat per cada parella de primers es solapa amb el producte de la parella posterior cobrint així la pràctica totalitat del mRNA de la utrofina.

10 - Northern-blots:

Es van córrer 3 µg de RNA total en cada carril del gel d'agarosa al 1% en presència de formadehid i tampó MOPS i transferits a una membrana de nitrocel.lulosa abans de ser hibridades amb sondes de DNA contra uPA, tPA, MyoD i Miogenina. Les sondes van ser obtingudes per digestió amb HindIII-EcoRI del vector on estaven clonades (i posteriorment marcades amb [α -³²P]dATP (3000Ci/mmol) utilitzant el sistema de Random Prime-It II (Stratagene, La Jolla, Estats Units d'Amèrica) basat en un *nick translation* portat a terme per una polimerasa *Exo-Klenow*. es van utilitzar 50 ng de sonda marcada per a cada hibridació.

Per tal de normalitzar la intensitat de la senyal es va hibridar també amb una sonda radiomarcada del oligonucleòtid ribosomal 18S.

11 - RAP-PCR (random arbitrarily primed-polymerase chain

reaction):

Per posar de manifest les diferències en l'expressió de gens entre el ratolí mdx i la seva soca control es va utilitzar el sistema anomenat RNAimage 2 de GenHunter Corporation (Nashville, USA). El sistema està basat en la retrotranscripció del mRNA utilitzant oligo-dT com a *primers* que s'ancoren a l'inici de la cua de poli-A, seguit d'una reacció de PCR en presència de α -[³³P]-dATP (3000Ci/mmol) i portada a terme en condicions molt baixes d'astringència utilitzant el mateix primer sentit que la RT-PCR i un altre primer antisentit de seqüència arbitrària, escollit aleatòriament entre els 8 que porta el kit de GenHunter. La subpoblació de mRNA's amplificats van ser resolts en un gel de poliacrilamida al 6% en condicions desnaturalitzants i van ser visualitzats en film d'autoradiografia. Les bandes obtingudes van estar tallades, eluïdes, reamplificades, clonades i seqüenciades. La seqüència obtinguda va estar sotmesa a anàlisi comparatiu amb les seqüències de les bases de dades.

11.1 - Retrotranscripció del mRNA:

Per portar a terme la retrotranscripció es disposa de tres possibles primers amb oligo-dT, que difereixen entre ells només en el primer nucleòtid després de la seqüència de oligo-dT. Un d'ells té una adenina en la posició adjacent a l'oligo dT, una altre una citosina i un altre una guanina. Això divideix en tres la població de mRNA's que podem retrotranscriure. La retrotranscripció es va portar a terme en un volum total de 25 μ l, amb un

d'aquests tres primers a una concentració de 200 nM, amb una unitat de la transcriptasa reversa de MMLV, 25mM Tris-Cl pH 8.3, 38 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ i 5 mM ditiotreitòl, 20 µM de dNTP's i amb 20 nanograms de mRNA. El programa es va portar a terme en un termociclador Perkin-Elmer 2400 fent 65°C durant 5 minuts, seguit de 37°C durant una hora i després 75°C per 5 minuts, per acabar el programa a 4 graus per temps indefinit. La transcriptasa reversa MMLV va ser posada als tubs quan aquests porten 10 minuts de la incubació a 37°C.

11.2 - Reacció de PCR:

La reacció de PCR es va portar a terme en un volum de 20 µl, a partir de 2 µl del producte de la RT prèvia, amb 2 µM de dNTP's, 200nM de cada primer, 1 unitat de AmpliTaq polimerasa (PerkinElmer) i 0,1 µCi/µl de α-[³³P]-dATP, 10mM Tris-Cl pH 8.4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂ i 0.001% gelatina. El termociclador Perkin-Elmer 2400 va ser programat de la forma següent: desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C, seguit de 40 cicles de 30 segons a 94°C, 2 minuts a 40°C i 30 segons a 72°C, seguits d'una extensió final de 5 minuts a 72°C.

11.3 - Separació del producte per electroforesi desnaturalitzant en poliacrilamida al 6%, tallat i eluït de les bandes:

El producte de les amplificacions de les PCR's va ser corregut en un gel de poliacrilamida amb tampó TBE (Tris-Borat-EDTA) amb Urea 7M durant 3-4 hores a 1500 volts. El gel va ser transferit a un paper Whatman 3M. El gel va ser recobert amb paper de film plàstic i assecat al buit durant 1-2 hores a 80°C. Va ser exposat sobre un film de radiografia entre 1 i 7 dies (segons l'activitat del ³³P).

Un cop seleccionades les bandes diferencials, es van dissecionar del gel (orientat per superposició amb el film) i eluïdes en tampó TE (Tris-EDTA) a 65°C durant 2 hores. El DNA va ser precipitat i resuspès en 10 µl de tampó TE. Després de tallar les bandes, el gel va tornar a ser exposat sobre film autoradiogràfic i revelat de nou per assegurar que la banda que s'havia tallat era la correcta.

11.4 - Reamplificació, clonació i seqüenciació:

Ja que la quantitat de DNA que s'obté de la purificació de les bandes del gel d'acrilamida és molt petita, és necessària una reamplificació per PCR. Aquesta reamplificació es va portar a terme a partir de 4 µl del DNA obtingut en l'eluït de la banda, amb les mateixes condicions que la PCR excepte en la concentració de dNTP's que va ser augmentada fins a 20 µM i que en aquest cas no es va addicionar isòtop radioactiu.

El producte de la PCR va ser corregut en gel d'agarosa al 1,5% i la banda obtinguda va ser retallada i eluïda utilitzant el Concert Gel Extraction System (Life-Technologies, Carlsbad, Estats Units d'Amèrica). Seguidament les bandes van ser clonades en E.Coli en el vector pCR2.1 de 3.9 kb (Invitrogen), utilitzant el sistema de Topo TA clonig (Invitrogen). El DNA plasmídic va ser purificat mitjançant una mini-prep, amb el mètode de Wizard Plus SV (Promega). Es van seqüenciar els vectors provinents de 5 colònies diferents de cada una de les bandes desde l'oligonucleòtid M13 (-20) Forward inclòs en el vector, en un seqüenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

11.5-Allargament de les seqüències per 5'-RACE:

Dels resultats obtinguts en l'estudi d'expressió diferencial es van obtenir dues secuències que no presentaven aliniament significatiu amb cap seqüència introduïda en les bases de dades públics de seqüències expressades en el moment en que es va realitzar aquest estudi. Ja que la seqüència que s'obté de l'estudi d'expressió diferencial és relativament curta

(entre 100 i 700 bp) és possible en alguns casos que la seqüència pertanyi per complet a una regió 3' no traduïda (3'UTR) i que a l'allargar la seqüència i entrar en zona codificant, llavors si que es detecti identitat amb algun gen, encara que sigui d'una altra espècie. Per tal d'obtenir la seqüència completa, o un fragment més llarg de la mateixa del que ja disposàvem, vam portar a terme un assaig de 5'-RACE (de *Rapid Amplification of cDNA Ends*) utilitzant el sistema de Marathon cDNA amplification Kit (Clontech) El sistema està basat en una llibreria de cDNA, als cDNAs de la qual s'hi han col.locat uns adaptadors de seqüència coneguda en els seus dos extrems, els quals ens permeten d'amplificar desde el fragment de seqüència que nosaltres coneixem fins a l'extrem que ens interessa del cDNA de la llibreria en qüestió mitjançant una PCR amb un primer de la nostra seqüència i un de l'adaptador de la llibreria. L'amplificació mitjançant PCR *touchdown*. Aquest tipus de PCR augmenta l'especificitat degut a que comença amb unes condicions molt restrictives i les va abaixant esglaonadament. Es va portar a terme en un termociclador Perkin-Elmer 2400 i amb el següent programa: 30 segons a 94° C, seguit de 5 cicles amb 5 segons a 94°C i 4 minuts a 72°C, seguits de 5 cicles més amb 5 segons a 94°C i 4 minuts a 70°C, per acabar amb 25 cicles amb 5 segons a 94°C i 4 minuts a 68°C. Es va utilitzar la DNA polimerasa *Advantage II polimerase system* (Clontech). El primers específics de les nostres seqüències van ser:

Per B4: 5'-TGTTTCATGTCCATGGTGGGGTTCTTTCC-3'

Per B2: 5'-CAAGGCAACAGATTCAGGTCAATGAGGG-3'