

RESULTATS

1 - Cronopatologia del ratolí mdx

1.1 - Classificació i contatge de grups degeneratius-regeneratius

(GDR):

En cada secció del grup muscular del gastrocnemi (GMG) del ratolí mdx es van observar múltiples GDRs de diferents grandàries. Per aquest motiu, es va plantejar l'establiment d'una classificació de grups necròtics segons la seva grandària, comptabilitzats segons el nombre aproximat de fibres que involucraven. En aquesta classificació es va distingir entre GDR que incloïen menys de 5 fibres (>5) entre 6 i 15 fibres (6-15), entre 16 i 30 fibres i finalment GDR amb més de 30 fibres involucrades (Fig. 14). És freqüent, que diferents grups necròtics de diferent maduresa i grandària coexisteixin en la mateixa secció muscular (Figs. 14A i 15).

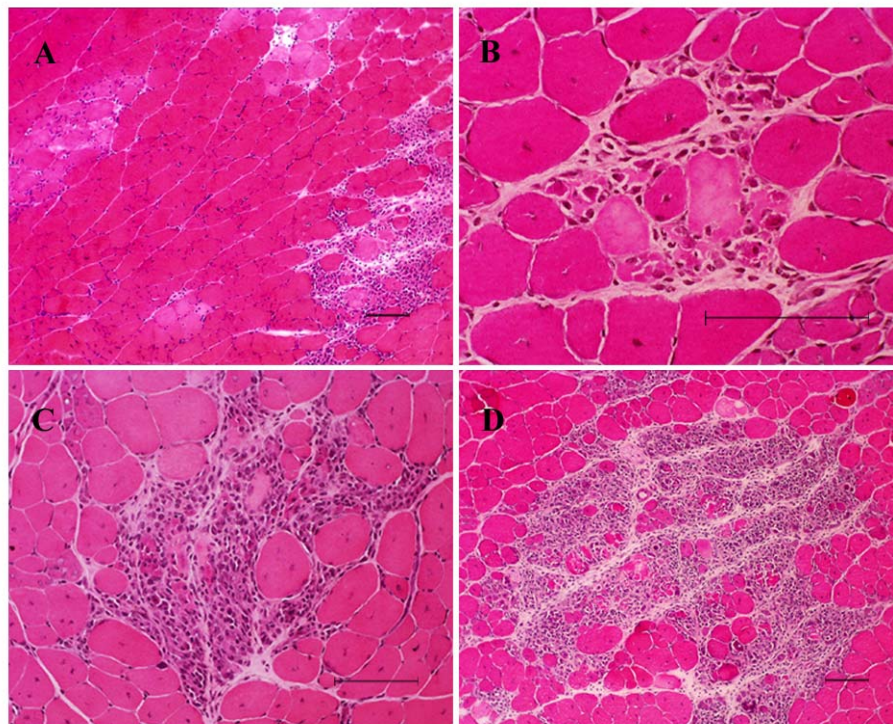


Figura 14 - Coexistència de diferents grups necròtics en la mateixa secció i classificació per grandàries. A: Diferents grups necròtics de diferent grandària i maduresa coexisteixen en la mateixa secció muscular. **B:** Grup necròtic petit (afectant a menys de 5 fibres), **C:** grup necròtic mitjà (afectant entre 15 i 30 fibres) i **D:** Grup necròtic gran (afectant a més de 30 fibres). *Totes les barres equivalen a 100 micres.*



Figura 15 - Coexistència de diferents grups degeneratius-regeneratius (GDR) en diferents estadis en el ratolí mdx. Tal i com es pot veure en la imatge, en els ratolins mdx es poden apreciar GDRs en diferents estadis en una mateixa secció muscular (en concret la imatge correspon a un ratolí de 2 mesos). Els asteriscs blancs indiquen algunes de les fibres conservades, és a dir, que no han patit cap degeneració. L'asterisc negre indica una fibra necròtica aïllada en el seu estadi inicial. Les línies blava i verd fosc delimiten GDRs recents en estadi regeneratiu primerenc. A l'esquerra de la línia groga i a la part inferior a la línia verda es poden apreciar grups regenerants en un estadi avançat, però que encara no han completat del tot la seva regeneració. A la part central de la imatge podem veure grups de fibres regenerades madures (distingibles pel seu nucli central).

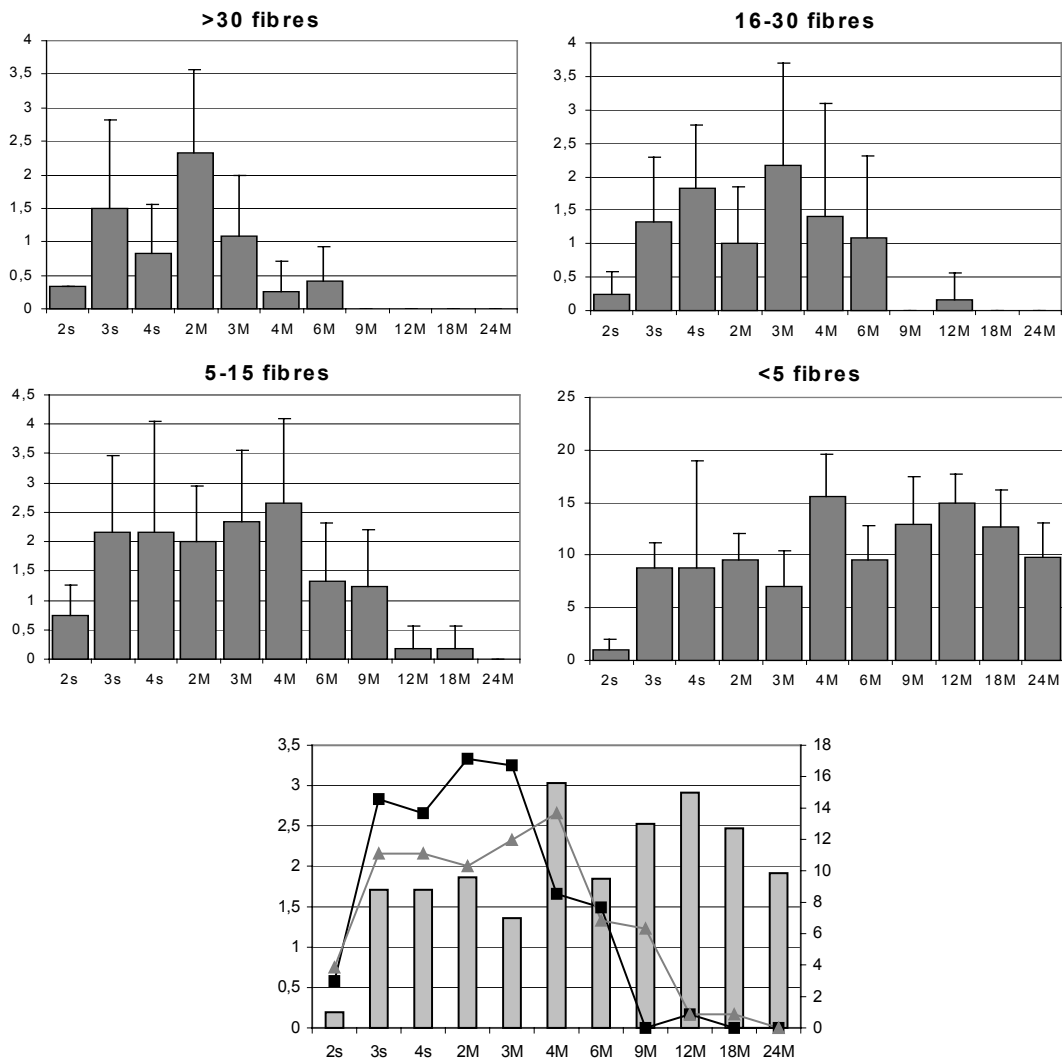


Figura 16 - Evolució de grups necròtics durant la vida del ratolí mdx. Les quatre gràfiques superiors es refereixen al nombre de grups necròtics afectant a més de 30 fibres, entre 16 i 30, entre 5 i 15 i menys de 5 fibres. En la gràfica combinada inferior, es poden veure les variacions en el nombre de DGRs afectant més de 30 fibres (quadres i línia negra, unitats en l'eix Y esquerra) i dels que inclouen entre 5 i 30 fibres (triangles i línia gris, unitats en l'eix Y esquerre). En canvi, els grups necròtics que afecten menys de 5 fibres (barres grises, unitats en l'eix Y dret) comencen també entorn dels 15 dies però es mantenen a nivells més o menys estables durant tota la vida del ratolí. Els eixos Y expressen nombre de grups necròtics per secció. L'eix X expressa edat dels ratolins (s:setmanes, M: mesos). Es van utilitzar 8 ratolins per cada edat de l'estudi. L'anàlisi estadístic de la varianza (ANOVA) i el test Scheffé donen que el nombre de grups necròtics dels quatre tamanys comptabilitzats no és igual per totes les edats, amb una probabilitat de $P < 0,00001$ (excepte pels grups de >5 fibres).

L'evolució dels GDR segons la seva grandària es troba graficat en la figura 16. Els GDRs es comencen a detectar just després de la segona setmana de vida dels ratolins. La quantitat de GDRs de totes les grandàries augmenta de forma dramàtica durant el període que va de la segona setmana al segon mes de vida. Entre el tercer i el quart mes, els grups afectant a més de 5 fibres comencen a decréixer per arribar a nivells molt baixos als 9 mesos, per no ser detectats d'aquesta edat en endavant (en concret vam analitzar fins a 24 mesos). Contràriament, el nombre de petits grups (afectant a menys de 5 fibres) es manté estable, tot i experimentar lleugeres fluctuacions durant tota la vida del ratolí mdx (Fig. 16). No es van detectar GDRs de cap tipus en els ratolins controls analitzats.

1.2 - Evolució del percentatge de fibres amb nucli no perifèric (NNP):

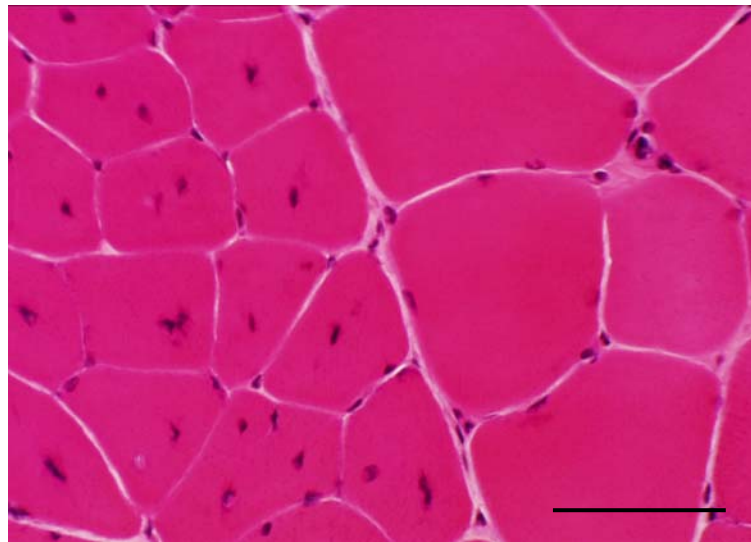


Figura 17 - Fibres amb nucli no perifèric (NNP) en un ratolí mdx de 1 mes. A la part esquerra de la imatge es pot veure una zona amb fibres que han patit almenys un cicle de necrosi-regeneració (es distingeixen clarament pels seus NNPs). A la part dreta de la imatge s'aprecien fibres que no han patit cap cicle de necrosi-regeneració (nuclis perifèrics). *Barra: 50 micres.*

Tot i que no se'n coneix el significat fisiològic ni el mecanisme, és ben conegut que els nuclis de les fibres regenerades resten en posició no perifèrica (Engel AG 1994). La posició no perifèrica dels nuclis d'algunes fibres ens indiquen que la fibra en qüestió ha patit almenys un cicle de necrosi-regeneració (Fig. 17). L'evolució del percentatge de fibres amb NNP (Fig. 18) segueix una evolució paral·lela a la dels GDRs mitjans i grans (Fig. 16). Així, es detecta un ràpid increment de fibres amb NNP entre les 3 setmanes i els 2 mesos de vida, moment en que s'assoleixen valors pròxims al 60%. Després dels 6 mesos trobem percentatges pròxims al 20% de fibres amb NNP.

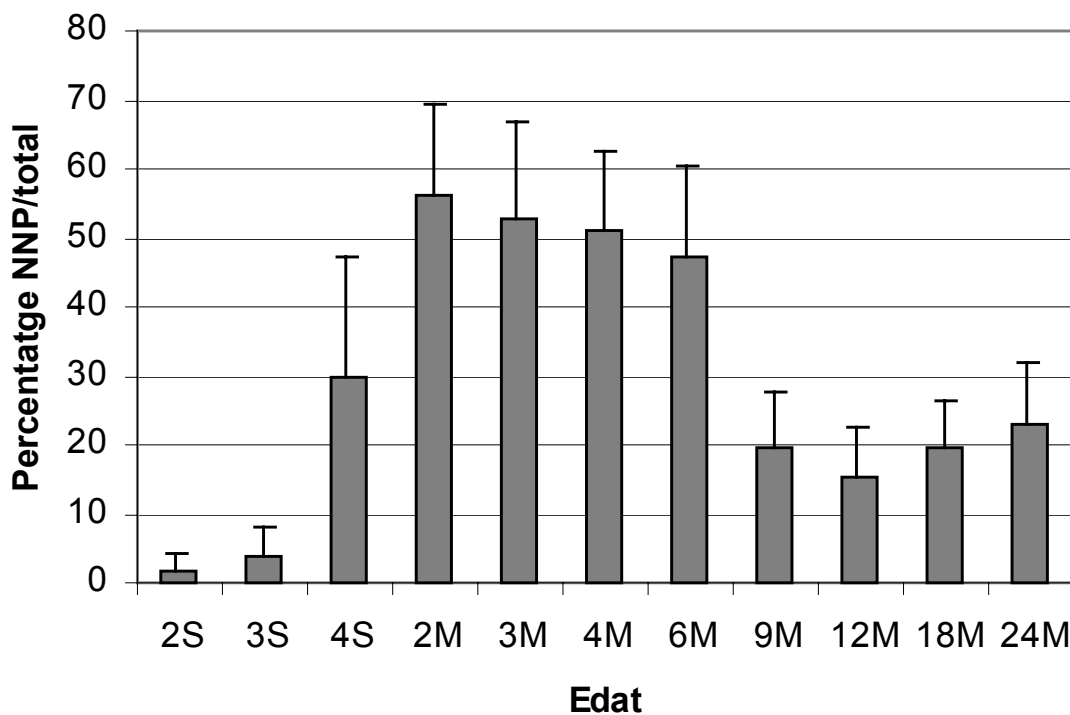


Figura 18 - Evolució del percentatge de fibres amb nucli no perifèric (NNP). L'evolució del percentatge de fibres amb NNP segueix una evolució paral·lela a la dels grups necròtics, encara que amb un cert retard en les edats inicials. s: setmanes, M: mesos. Es van utilitzar 8 ratolins per cada edat.

1.3 – Acumulació de col·làgens fibril·lars:

Els col·làgens fibril·lars tipus III i VI participen tan en processos de regeneració com en la fibrosi i per tant poden ser visualitzats en els espais entre les fibres en cada GDR. A l'analitzar resultats immunohistoquímics cal tenir en compte que les fibres en vies de necrosi reaccionen inespecíficament a qualsevol marcatge immunohistoquímic (com el que s'indica amb la fletxa buida en la Fig. 19 B), la qual cosa pot dificultar la interpretació dels resultats. Aquest marcatge inespecífic ha estat utilitzat per alguns autors com a marcador de fibres necròtiques (Weller B 1990 i Lefoucher JP 1995). En els GDRs, la presència d'aquests col·làgens és transitòria i són ràpidament eliminats un cop completada la regeneració. Malgrat aquest fet, el dipòsit de col·làgens III i IV en l'espai endomisial es pot apreciar clarament, especialment a partir de 6 mesos. Així, tal i com s'il·lustra en la Figura 19, la immunohistoquímica contra el col·làgen VI ens mostra com la fibrosi experimenta un increment amb l'edat en els ratolins mdx, tot i que de manera molt gradual, no arribant mai als nivells de fibrosi endomisial observats en l'humà, especialment en les zones perivasculars i perimisials. Els resultats obtinguts en la immunohistoquímica pel col·làgen III ens van donar resultats molt similars (no mostrats).

Es van poder observar certes diferències en la quantitat de col·làgen entre els diferents músculs que componen el grup muscular del gastrocnemi (GMG). Així, i segons les nostres observacions, el flexor profund dels dits suporta un grau de fibrosi lleugerament superior al de la resta dels músculs del GMG. Entre la resta de músculs del paquet muscular no es van observar diferències significatives (Fig. 19).

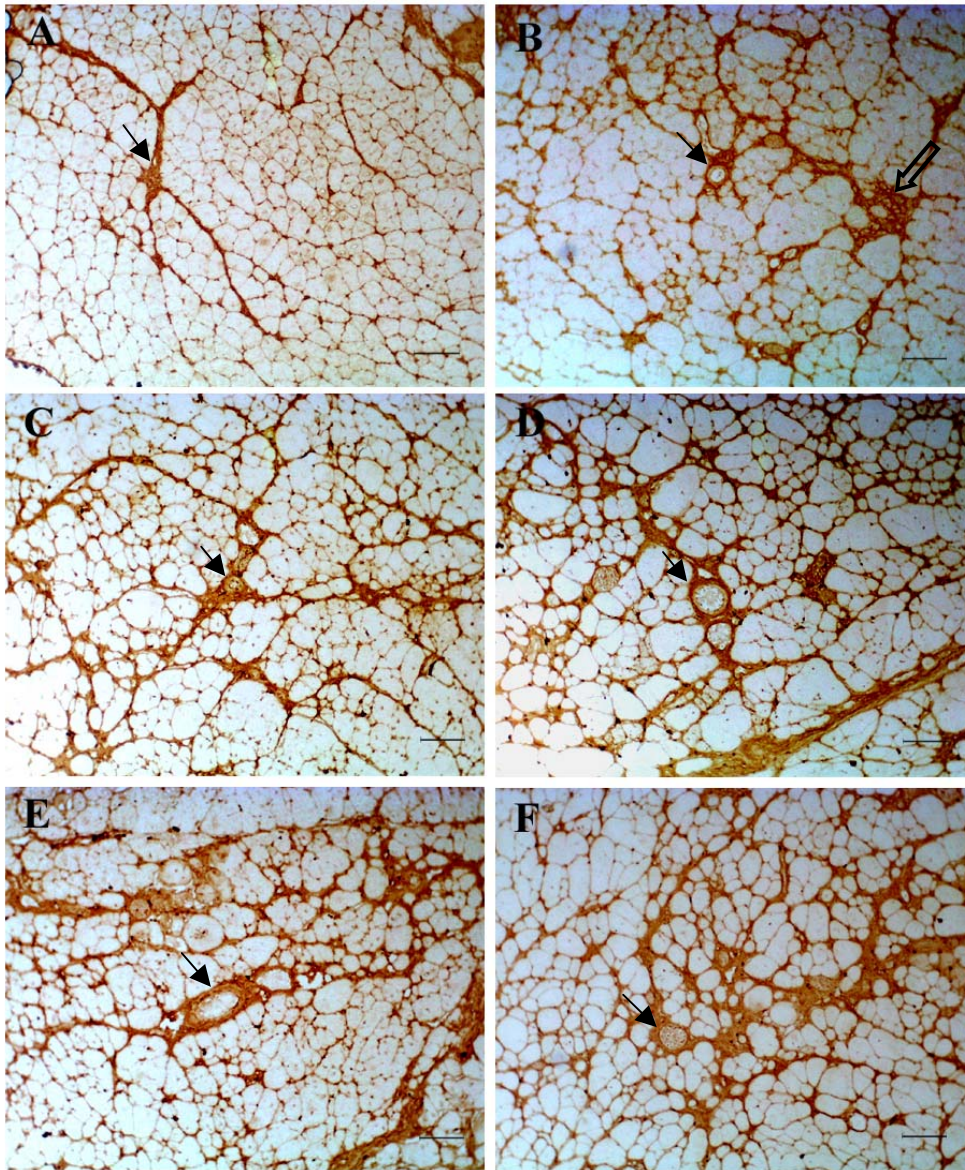


Figura 19 - Acumulació de col·làgens fibril·lars en el ratolí mdx. Tot i que la fibrosi del ratolí mdx mai no arriba als nivells observats en la DMD, podem veure com si que es dóna una certa acumulació progressiva de col·làgens fibril·lars com el col·làgen VI que es mostra en la imatge. Les imatges pertanyen a la zona del paquet vasculo-nerviós (indicat amb fletxes fines) del múscul gastrocnemi medial de ratolins mdx de 2 setmanes (A), 1 mes (B), 3 mesos (C), 9 mesos (D), 18 mesos (E) i 24 mesos (F). La fletxa oberta al gràfic B indica marcatge inespecífic d'un grup degeneratiu-regeneratiu. *Totes les barres equivalen a 100µm.*

1.4 - Variació de la grandària de les fibres:

La medició dels diàmetres fibril.lars ens han permès observar que a mesura que la malaltia del ratolí mdx va avançant, les seves fibres musculars experimenten variacions en la seva grandària, tal com es mostra en la figura 20. La característica més evident és l'aparició de fibres d'una grandària inferior a la normal (Fig. 21). Aquesta aparició de fibres de grandària menor es comença a detectar clarament des de el segon mes de vida, però esdevé prominent a partir del sisè mes de vida. Abans dels dos mesos de vida, però, ja s'aprecia una certa dispersió dels tamanyes de les fibres, però molt més lleu que la que s'observarà posteriorment.

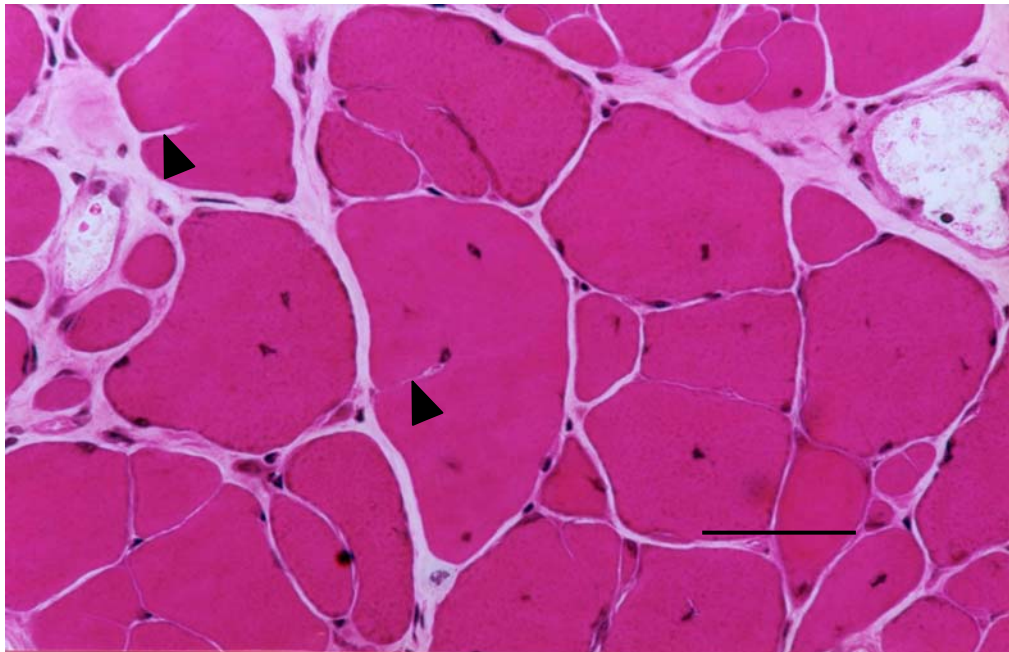


Figura 20 - Augment de la dispersió de les grandàries de les fibres en un ratolí de 9 mesos. En ratolins mdx trobem un nombre elevat de fibres de tamany més petit i també és detectable una presència, encara que més discreta de fibres hipertròfiques. Es poden apreciar amb certa freqüència fenòmens de partició de fibres (*splitting*) com l'indicat amb les puntes de fletxa. Barra: 50 micres.

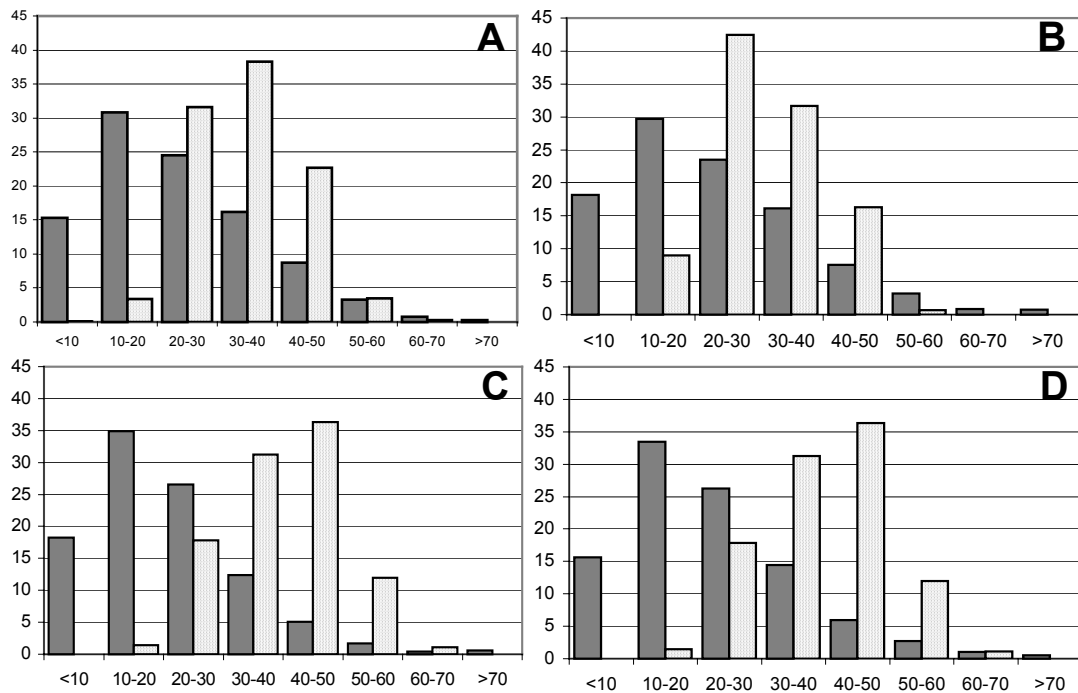


Figura 21 - Augment de la dispersió de l'histograma de grandària de les fibres. En els eixos Y es representa el percentatge de fibres d'un determinat diàmetre, en l'eix X es representen les categories de fibres segons el seu diàmetre en micres. **(A)** En els ratolins mdx de 2 mesos (barres grises) ja s'aprecia un clar desplaçament cap a la dreta respecte els controls de la mateixa edat (barres puntejades). L'aparició de fibres hipertròfiques, en canvi, és molt més discreta. **(B)** En ratolins mdx de 6 mesos (barres grises) es manté aquesta mateixa tendència amb l'aparició de fibres petites, però sense acumular-se fibres hipertròfiques quan els comparem als controls de la mateixa edat (barres puntejades). **(C i D)** Als 9 i 12 mesos observem el mateix desplaçament cap a la dreta de l'histograma dels ratolins mdx (barres grises C i D respectivament) al comparar-los amb els controls de nou mesos (barres puntejades). El nombre de ratolins utilitzats va ser de 8 per cada edat analitzada.

També és observable l'aparició d'un petit percentatge de fibres hipertròfiques, però gairebé residual. A partir dels 9 mesos d'edat dels ratolins, l'histograma de grandària de fibres ja no experimenta variacions significatives. És destacable, la gran activitat de partició de les fibres de gran tamany (*splitting*), especialment a partir del quart mes de vida dels ratolins, que podria explicar el baix nombre de fibres hipertròfiques (Indicat amb puntes de fletxa en la Fig. 20).

1.5 – Presència de mastòcits:

Per tal de seguir l'evolució del nombre de mastòcits presents en el teixit muscular dels ratolins mdx es va portar a terme un contactge en seccions tenyides amb blau de Toluidina i Giemsa (Figs. 22 i 23). Els resultats obtinguts d'aquest contactge ens van permetre observar que el nombre de mastòcits s'incrementa gradualment en els ratolins mdx per arribar al seu màxim als 6 mesos d'edat. Entre els 6 i els 12 mesos els seus nivells es mantenen més o menys estables, i a partir dels 12 mesos pateixen una lleu i gradual disminució (Fig. 24). També vam observar que la localització dels mastòcits gairebé és sempre perimisial, especialment en els perimisis de la zona pròxima a vasos mitjans i grans. No hem trobat una correlació entre els grups necròtics i la presència de mastòcits en la zona necrosada. En els ratolins control, sembla haver-hi un discretíssim increment amb l'edat, però sempre amb uns nivells molt més baixos.

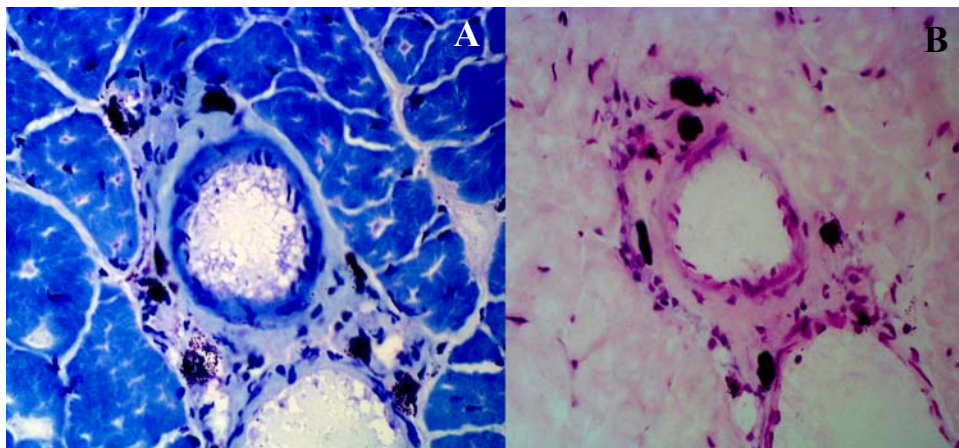


Figura 22 – Tincions per la detecció de mastòcits. Mastòcits en l'àrea perivascular visualitzats amb les tincions de blau de Toluidina (A) i Giemsa (B) en seccions musculars adjacents d'un ratolí mdx de 3 mesos (200X). Els mastòcits es tenyeixen en ambdues tincions de color violeta fosc.

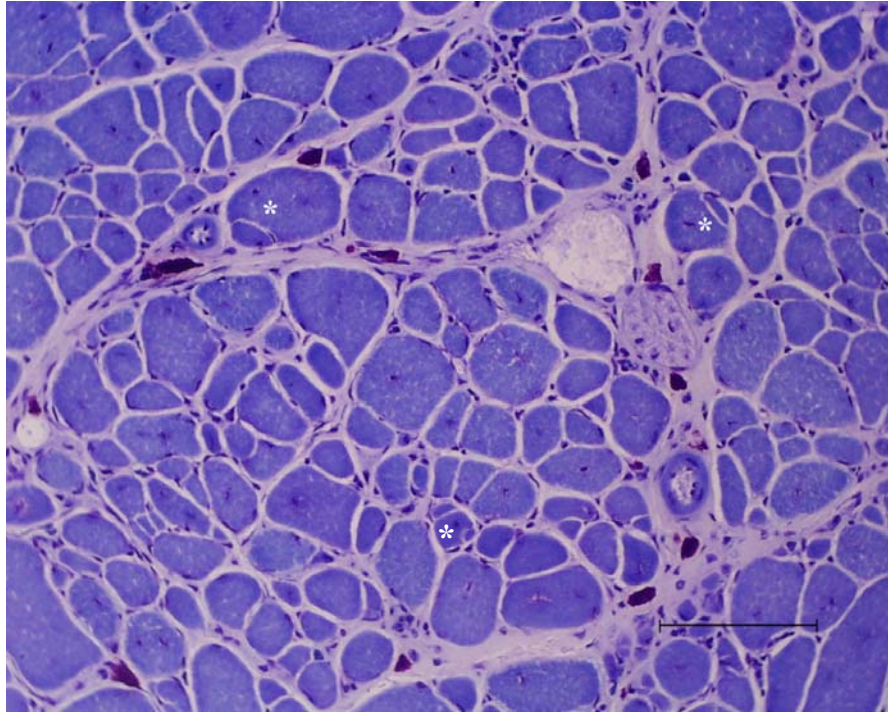


Figura 23 - Presència de mastòcits en el múscul dels ratolins mdx. Tinció de blau de Toluidina en un múscul mdx de 12 mesos d'edat. Els mastòcits s'aprecien clarament tenyits de color violeta fosc. Els asteriscs indiquen fibres en procés de partició (*splitting*).

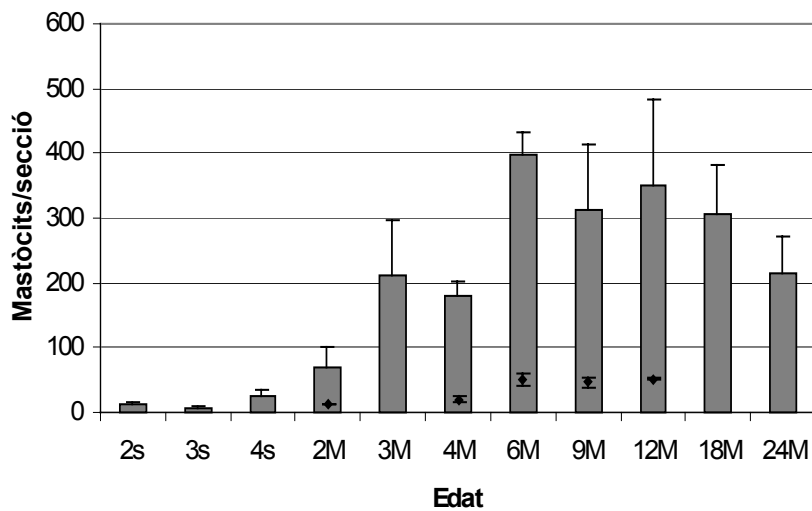
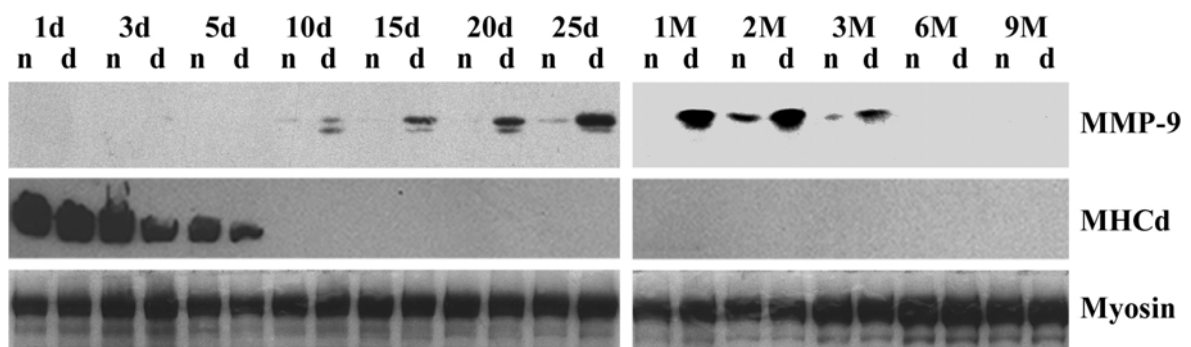


Figura 24 - Evolució del nombre de mastòcits. Les barres grises indiquen el nombre de mastòcits per secció presents en cada una de les edats dels ratolins mdx visualitzats mitjançant les tincions de blau de Toluidina i Giemsa. Els rombes negres indiquen els valors dels controls de la mateixa edat. Es van analitzar un mínim de 3 ratolins controls i 8 ratolins mdx per cada edat de l'estudi. s: setmanes, M: mesos.

1.6 – Anàlisi de l'expressió de la metaloproteasa-9 (MMP-9) i Miosina del desenvolupament (MHCd):

L'expressió de MMP-9 va ser visualitzada per Western blot tan en ratolins mdx com controls entre 1 dia i 9 mesos d'edat (Fig. 25). Els resultats obtinguts ens mostren com els nivells de MMP-9 experimenten un increment a partir dels 10-15 dies, moment en el que les ratios superen el valor de 0,2, arribant a un màxim entre 1 i 2 mesos amb ratios



van normalitzar amb la banda de miosina tenyida amb coomassie. n: ratolí normal (control), d: ratolí distròfic (mdx), d: dies de vida, M: mesos de vida.

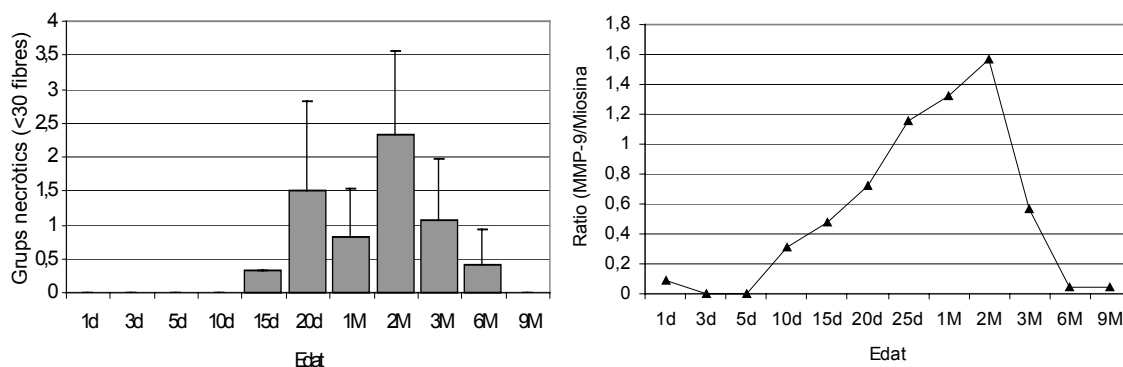


Figura 26 - Correlació entre la necrosi muscular i l'expressió de MMP-9. Si observem conjuntament l'evolució dels grups necròtics afectant més de 30 fibres (A) i la inducció de l'expressió de MMP-9 (B), podem veure com l'increment de la necrosi de grans grups va relativament paral·lel a l'increment de la MMP-9, ambdues experimenten un pic als dos mesos i un posterior descens.

Tal com es mostra en la Figura 26A el ratolí mdx no presenta necrosi durant el seu període postnatal (2 primeres setmanes). A més, aquest ratolí es veu sotmès a una fase aguda amb un pic als 2 mesos on predomina l'afectació de grans grups de fibres. Un cop passada aquesta etapa, es manté sempre un cert grau de necrosi però molt menor, i restant només petits grups necròtics. També es van estudiar els nivells de MHCd però només vam detectar la seva presència fins el cinquè dia de vida dels ratolins. D'aquesta edat en endavant, la transitòria i molt localitzada expressió de MHCd que es pot observar per immunohistoquímica en els focus regenerants probablement no es suficient com per donar una banda detectable en el Western blot (Fig. 25). Els resultats de la densitometria per MMP-9 i MHCd van ser normalitzats utilitzant la banda de miosina tenyida amb Coomassie.

2 – La utrofina com a substitut de la distrofina en el múscul del ratolí mdx:

2.1 - Evolució de l'expressió d'utrofina a nivell de proteïna:

Els nivells de utrofina van ser analitzats per Western blot en diferents edats del ratolí mdx i els seus respectius controls (Figs. 27 i 28). Els resultats obtinguts ens permeten dividir en diferents fases el comportament de la utrofina en aquests ratolins. En una primera fase, que inclou el període que va desde el naixement fins els 14 dies de vida postnatal, els nivells d'utrofina dels ratolins mdx i dels controls segueixen un comportament similar, mantenint uns nivells més o menys estables, amb ratios (utrofina/miosina) sempre per sobre de 1,0. Al voltant del dia 15 comença una segona fase en la que tan els ratolins mdx com els controls pateixen una dràstica reducció dels nivells de utrofina, donant lloc a ratios per sota de 0,2 fins als 25 dies després del naixement (Figs. 27 i 28).

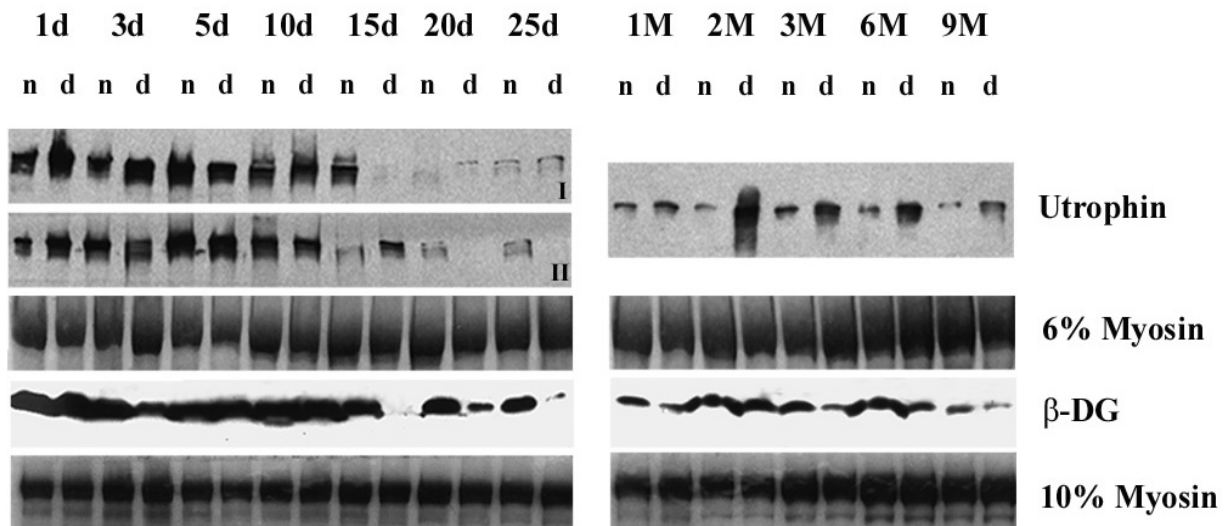


Figura 27 - Western utrofina i β -distroglicà. En els Western blots mostrats es van córrer 50 μ g de proteïna en gel de SDS-poliacrilamida al 6% per la utrofina i 10% pel β -distroglicà (β -DG). Degut a la seva rellevància els resultats per la utrofina entre 1 i 25 dies es mostren per duplicat (I i II, mostres corresponents a diferents ratolins) mostrant que la desaparició de la utrofina al voltant dels 15 dies de vida es dona paral·lelament en els mdx i en els controls. Els resultats es van normalitzar amb la banda de miosina tenyida amb Coomassie. n: ratolí normal (control), d: ratolí distròfic (mdx), d: dies de vida, M: mesos de vida.

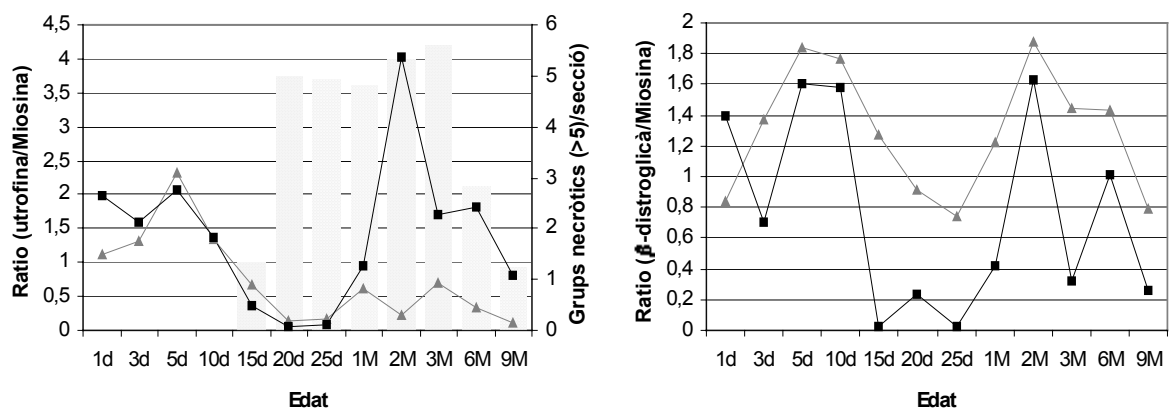


Figura 28 - Densitometria utrofina. A: Resultats de l'anàlisi densitomètric del Western de la utrofina en ratolins mdx (línia i quadres negres) i en controls (línia i triangles grisos). Unitats en l'eix Y esquerre. En segon terme, les barres puntejades ens mostren l'evolució dels grups necròtics afectant a més de 5 fibres (eix Y dret). B: Resultats de l'anàlisi densitomètric del β -distroglicà en ratolins mdx (línia i quadres negres) i en controls (línia i triangles grisos).

Després d'aquest moment comença una tercera fase, en que l'evolució dels nivells de utrofina segueix un curs diferent quan comparem mdx i controls. Així, mentre que en els controls els nivells de utrofina es mantenen a nivells moderadament baixos (ratios per sota de 0,8), en els mdx els seus nivells arriben a ratios molt més altes (entre 1,5 i 4,5) (Figs. 27 i 28).

2.2 - Evolució dels nivells de β -dístroglicà:

L'anàlisi de l'expressió del β -dístroglicà en el ratolí mdx ens mostra una evolució paral·lela a la de la utrofina. Així, es pot distingir un període (fins els 15 dies) durant el qual els seus nivells són bastant constants i molt similars entre els mdx i els controls (amb ratios β -dístroglicà/miosina al voltant de 1,5). A partir del dia 15 post-natal els nivells de dístroglicà pateixen una reducció dràstica (arribant a ratios de 0,03) i que s'allarga fins els 25 dies en ratolins mdx però no en els ratolins control (ratios entre 0,7 i 1,3). Des de els 25 dies després del naixement en endavant els nivells de β -dístroglicà es veuen parcialment restaurats, mantenint-se però sempre a nivells més baixos que els controls de la mateixa edat (Figs. 27 i 28).

2.3 - Correlació entre els nivells de utrofina i els de β -dístroglicà:

La correlació entre els nivells d'utrofina i β -dístroglicà en el ratolí mdx a partir del moment en que la utrofina és reexpressada després de la fase post-natal (és a dir, en ratolins de 15, 20 i 25 dies i 1, 2, 3, 6 i 9 mesos d'edat) és elevada ($R^2 = 0.87$). La tendència lineal de la correlació creua la intersecció dels eixos X i Y, suggerint la total dependència entre la presència d'utrofina i la de β -dístroglicà. Aquesta dependència lineal no és observable en els ratolins control de les mateixes edats (Fig. 29).

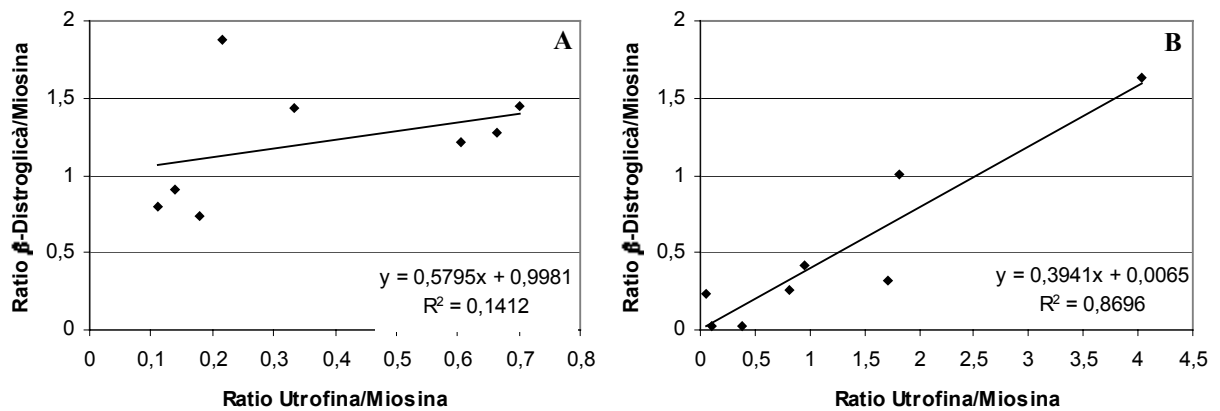


Figura 29 - Gràfiques de correlació entre l'expressió d'utrofina i la de β -distroglicà. Es van analitzar ratolins controls (A) i mdx (B) de 15, 20 i 25 dies, 1, 2, 3, 6 i 9 mesos. La recta de regressió es va calcular gràcies al paquet estadístic del programa Excel de Microsoft. La fórmula de les rectes de regressió i els valors dels factors R^2 es troben inserits dins de cada gràfica.

2.4 – Presència d'una possible isoforma alternativa de la utrofina en els ratolins mdx:

2.4.1 – Detecció de doble banda per Western blot:

En els Westerns blot de la utrofina, s'observa com en els ratolins mdx de més de 1 mes apareix una banda addicional una mica més petita que la única banda d'utrofina observada en els controls (Figura 30). Aquest fet ens indica la possibilitat de que existeixi una isoforma de la proteïna una mica més petita que la seva forma habitual. Això ens va suggerir la possibilitat de l'existència d'un procés alternatiu del mRNA que donés lloc a una isoforma una mica més curta, tot i que no es podia descartar l'ús d'un promotor alternatiu que també donés lloc a un

producte menor, o que la banda fos el producte d'un altre gen diferent al de la utrofina que fos reconegut pel mateix anticòs. Tampoc es pot descartar que la banda extra fos deguda a un estat de glicosilació diferent.

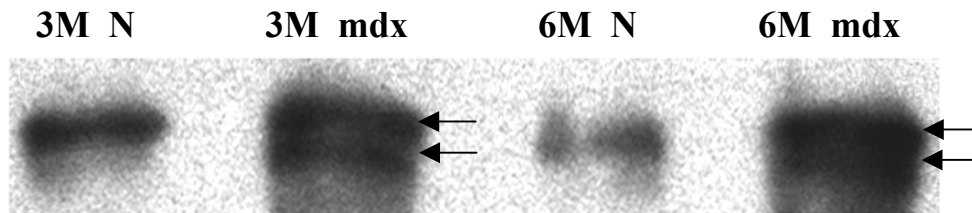


Figura 30 - Detall del Western de la utrofina. Observat amb detall, podem veure com en els ratolins mdx es poden apreciar dues bandes. En la imatge es mostren resultats a 3 (3M) i 6 (6M) mesos d'edat. La banda addicional no s'aprecia en els ratolins normals (N).

2.4.2 - Búsqueda de isoformes de mRNA produïdes per processament alternatiu (splicing):

Es van dissenyar 6 parelles de primers, els productes de PCR dels quals es solapaven i cobrien entre els nucleòtids 41 i el 10958 del mRNA de la utrofina. Malauradament, no vam poder detectar cap processament alternatiu del mRNA ja que la majoria d'amplificacions van donar banda única (Fig. 31). Només la amplificació entre els nucleòtids 5858 i 7679 ens va donar bandes addicionals que van ser clonades i seqüenciades, però cap d'elles va correspondre a cap isoforma de l'utrofina. Així doncs, no vam detectar cap *splicing* alternatiu per la utrofina ni en el teixit muscular del ratolí control ni en el del ratolí mdx.

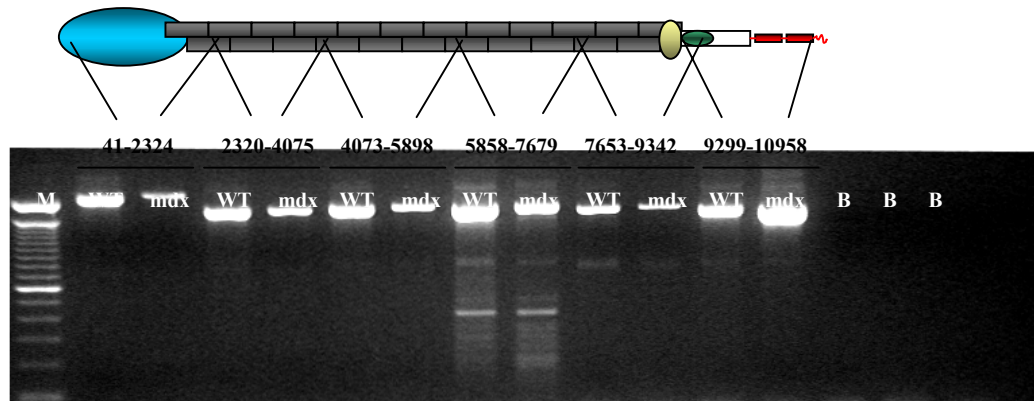


Figura 31 - Sèrie de RT-PCRs per detectar possibles processaments alternatius del mRNA de la utrofina. Els nombres indiquen la posició dels nucleòtids primer i últim de cada amplificació. El final de cada PCR i l'inici de la següent es troben solapats, per tal de cobrir la pràctica totalitat de la llargada del mRNA. El gràfic superior ens indica la part de la proteïna per la codificarien els nucleòtids continguts en cada amplificació. M: marcador, WT: ratolí normal (control), mdx: ratolí mdx (distròfic), B: blancs.

2.5 – Evolució dels nivells de mRNA de proteïnes estructuralment relacionades amb la distrofina en els ratolins mdx i controls adults:

Per tal de portar a terme les RT-PCR semiquantitatives vam assajar diferents candidats a gen control. Així vam testar l'expressió de la GAPDH que es va mostrar disminuïda en ratolins distròfics (Figs. 33 i 34) i per tan va ser descartada. Més bon comportament van demostrar la ciclofilina-A (Cyp-A) i el mRNA de la proteïna ribosomal L-19 (L-19). Tal i com es mostra en la figura 32, la L19 presenta una expressió més constant que la Cyp-A al llarg de totes les edats analitzades. Per aquest motiu, en tots els nostres estudis en el ratolí mdx amb mRNA hem utilitzat la proteïna ribosomal L19 com a control.

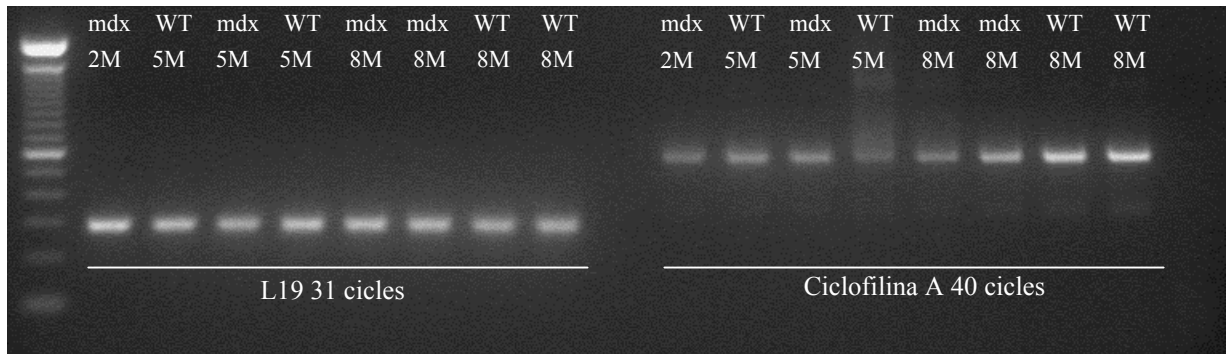


Figura 32 - Comparació gens control L19 i ciclofilina. Després d'optimitzar el nombre de cicles i la temperatura per la L19 i la ciclofilina es va portar a terme una comparació sobre la constància dels seus nivells en ratolins controls i mdx de diferents edats. Tal i com es pot veure, la ciclofilina experimenta certes variacions, mentre que la L19 es manté molt més constant. mdx: soca de ratolí mdx, WT: soca de ratolí control, M: mesos d'edat.

Tot i l'increment de la utrofina a nivell de proteïna detectat en els ratolins mdx adults, els nivells del seu transcrit es mantenen constants entre 1 i 9 mesos. Així mateix, també vam estudiar els nivells dels mRNA's d'altres proteïnes estructuralment relacionades amb la distrofina com DRP-2 i β -spectrina. Aquestes mostren un comportament similar, mantenint-se també el seus nivells de mRNA estables en totes les edats analitzades (1, 3 i 9 mesos) (Figs 33 i 34). Contràriament, tal i com s'apuntava anteriorment, el missatger de la GAPDH, utilitzat inicialment com a gen control, es veu molt disminuït en el ratolí mdx, especialment en les edats en que la activitat necròtica és més manifesta. Aquest resultat posa sota sospita l'ús de GAPDH com a gen control en el ratolí mdx i en general en patologies musculars cròniques, tot i que ha estat utilitzat satisfactòriament en múscul sa o lesionat de forma aguda (Lluís F 2001).

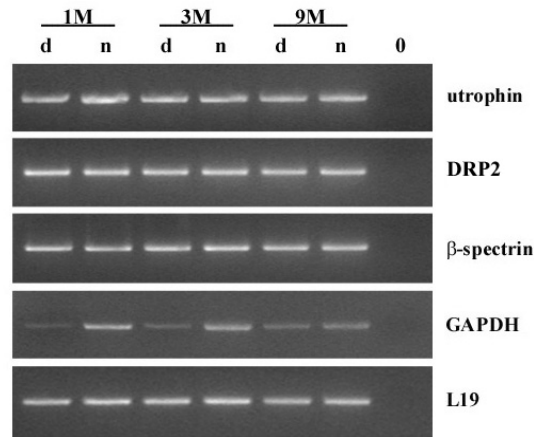


Figura 33 - RT-PCRs semiquantitatives comparant els nivells dels mRNAs de la utrofina, la proteïna relacionada amb la distrofina 2 (DRP2), la β-espectrina i la GAPDH en ratolins mdx versus els controls de les mateixes edats. Gels d'agarosa al 2% mostrant els productes de les amplificacions per RT-PCR per la utrofina, la DRP2, la β-espectrina, la GAPDH. La proteïna ribosomal L19 va ser usada com a control. 1M: 1 mes, 3M: 3 mesos, 9M: 9 mesos, d: ratolí distròfic (mdx) n: ratolí normal (control) 0: blanc.

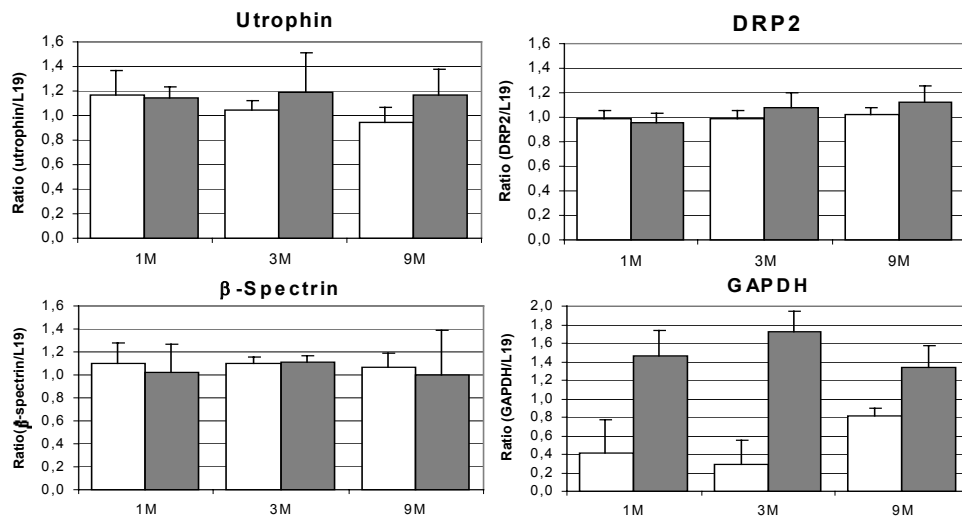


Figura 34 - Anàlisi densitomètrica de l'expressió de utrofina, DRP-2, β-espectrina i GAPDH: Gràfiques derivades de l'anàlisi densitomètric de les bandes de la RT-PCR per la utrofina, DRP2, β-espectrina i GAPDH fent servir l'expressió del mRNA de la proteïna ribosomal L19 com a control per normalitzar els resultats. Barres blanques: ratolí distròfic (mdx), barres grises: ratolí normal (control). 1M: 1 mes, 3M: 3 mesos, 9M: 9 mesos. Es van utilitzar un mínim de tres ratolins per cada edat i condició.