

3 - El paper de uPA en el procés de la regeneració muscular.

3.1 – El paper de uPA després d’una lesió experimental:

3.1.1 - Inducció de l’expressió del mRNA de uPA després d’una lesió muscular:

Tres dies després de lesionar el grup muscular del gastrocnemi (GMG) dret de ratolins normals amb glicerol 50% es va analitzar l’expressió de uPA en aquest múscul regenerant i en el GMG contralateral no lesionat mitjançant RT-PCR semiquantitativa i Northern blot. També es va analitzar l’expressió de GAPDH com a control (vàlid per lesió aguda, no per lesió crònica), i MyoD i miogenina com a marcadors de regeneració (Fuchtbauer EM 1992, Grounds MD 1993). Es van comparar el nombre de cicles als que apareixia banda en cada amplificació, comparant múscul lesionat i múscul no lesionat. Mentre que GAPDH apareix en el mateix nombre de cicles entre lesionat i no lesionat, MyoD, miogenina i uPA apareixen abans en el múscul lesionat que en el no lesionat, suggerint l’existència d’una inducció de la seva expressió durant la regeneració muscular (a 3 dies post-lesió) (Fig. 35). De forma similar, quan es lesiona un múscul per congelació-aixafament (*freeze-crush*), l’expressió del mRNA de uPA, MyoD i miogenina es veuen també clarament induïts per Northern blot (Fig. 36).

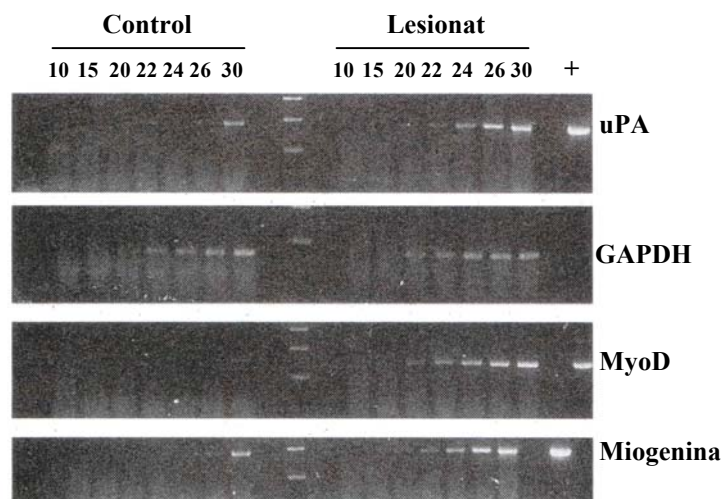


Figura 35 - Inducció de l'expressió de uPA després d'una lesió en ratolins normals. Una desena part del producte de PCR va ser separat després de 10, 5, 20, 22, 24, 26 i 30 cicles i resolt en un gel d'agarosa al 2%. uPA apareix abans en els ratolins lesionats que en els no lesionats (control), mentre que els marcadors de regeneració Myo D i miogenina apareixen a més cicles de PCR. Com a control es va utilitzar l'expressió de GAPDH. +: control positiu

3.1.2 - Expressió dels mRNAs de MyoD i miogenina en el múscul en regeneració del ratolí deficient en uPA:

Per tal d'avaluar la importància de uPA (i tPA) per la regeneració muscular vam portar a terme experiments de regeneració després de lesió induïda en ratolins deficientes en uPA i tPA. Els nivells del RNA missatger per MyoD i miogenina de ratolins controls uPA^{-/-} i tPA^{-/-} van ser examinats tres dies després de la lesió mitjançant Northern blot (Fig. 36). L'expressió de MyoD es manté per sota de nivells detectables en músculs no lesionats dels ratolins, però s'indueix fortament en els múscul lesionats. El transcrit de MyoD s'indueix en menor grau en els ratolins uPA^{-/-} que en els controls i en els tPA^{-/-} després de la lesió. De forma similar l'inducció de l'expressió del mRNA de la miogenina en el ratolí uPA^{-/-} es veu augmentat, però amb un augment més discret comparat al dels ratolins control i els tPA^{-/-}. Els nivells del RNA 18S es mantenen estables en tots els carrils. Tal i com era d'esperar, els transcrits de uPA estan absents en els músculs dels ratolins uPA^{-/-}.

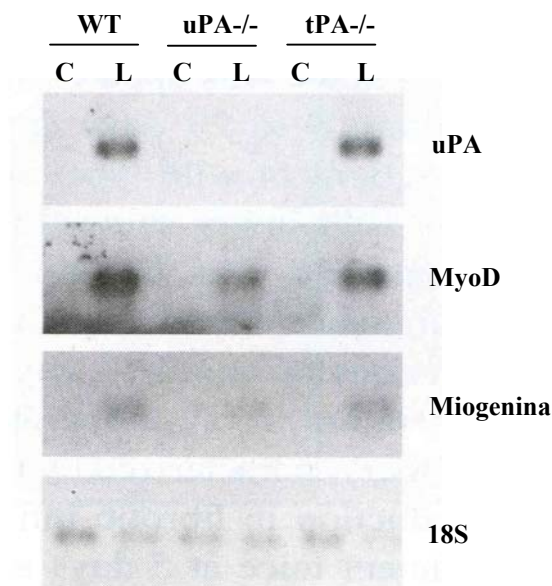


Figura 36 - Northern-blot mostrant la inducció de l'expressió de uPA després d'una lesió i el decrement de l'expressió de MyoD i miogenina en el ratolí deficient en uPA. WT: ratolí control (C57BL6), uPA^{-/-}: ratolí deficient en uPA, tPA^{-/-}: ratolí deficient en tPA^{-/-}, C: no lesionat, L: lesionat.

3.1.3 – La regeneració muscular sense uPA:

Per tal de determinar la importància funcional de l'increment de uPA en el múscul esquelètic després d'una lesió, es van analitzar comparativament els canvis histològics observats després d'una lesió muscular amb glicerol en ratolins control, uPA^{-/-} i tPA^{-/-}. Tal com es mostra en la Figura 37, el defecte en la regeneració comença a mostrar-se aparent a partir dels 5 dies després de la lesió, però es va convertint en molt evident a mesura que la regeneració dels controls i tPA^{-/-} va avançant (entre 7 i 20 dies). L'anàlisi detallat de les seccions tenyides amb hematoxilina/eosina ens mostra com els músculs abans de ser lesionats (0) amb glicerol tenen aspectes normals. Als dos dies després de la lesió (2) tots els músculs presenten una morfologia semblant, amb aspecte edematós amb infiltrat inflamatori entre les fibres en necrosi.

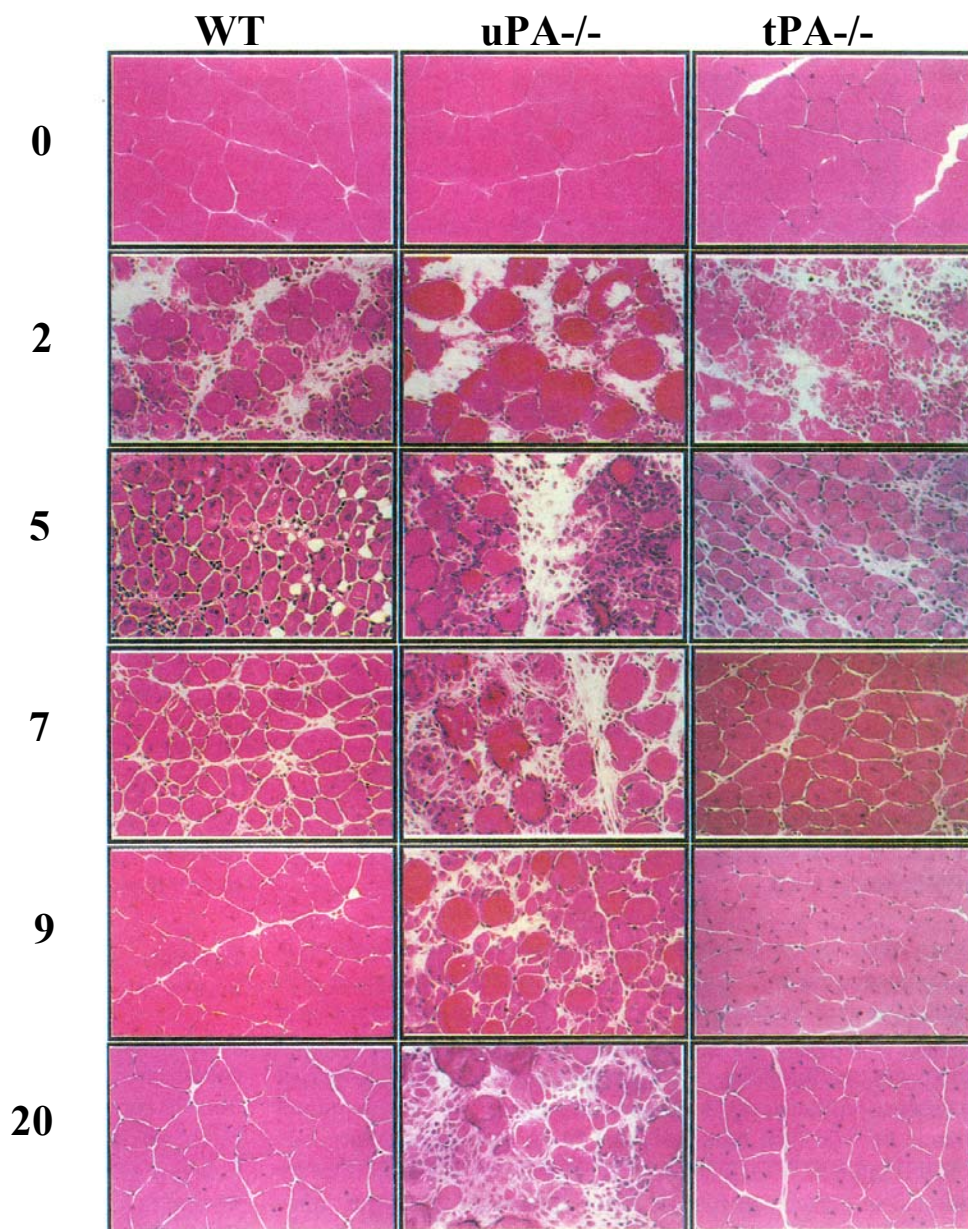


Figura 37 - Retard en la regeneració muscular de la soca uPA^{-/-} després d'una lesió induïda amb glicerol. Tan la soca control com la soca deficient en tPA presenten una regeneració normal, mentre que la soca deficient en uPA presenta un retard molt important en la regeneració inclús 20 dies després de la lesió, quan la regeneració normal ja fa dies que ha estat completada. Els nombres de l'esquerra indiquen dies després de la lesió amb glicerol. WT: ratolins soca control (C57BL6), uPA^{-/-}: ratolins deficients en uPA^{-/-}, tPA^{-/-}: ratolins deficients en tPA.

L'anàlisi de les seccions 5 dies després de la lesió (5) ens mostra com els ratolins controls i els tPA^{-/-} mostren un curs normal de la regeneració, amb presència de fibres regenerants de petit tamany, amb nuclis no perifèrics i una clara reducció de l'infiltrat inflamatori. En canvi, en els ratolins uPA^{-/-} en el dia 5 després de la lesió encara no es distingeixen fibres regenerants, la presència de l'infiltrat inflamatori és clarament patent i resta encara edema.

Set dies després de la lesió (7), les fibres regenerants en els ratolins control i tPA^{-/-} ja s'acosten al seu tamany normal, i es reconeixen pel seu nucli central, mentre que en el uPA^{-/-} l'aspecte del múscul és encara necròtic, restant-hi encara multitud de fibres necròtiques que no han estat eliminades. Als 9 dies (9), la regeneració ja es pot dir que ha estat completada en controls i tPA^{-/-} ja que només es poden distingir les fibres regenerades pel seu nucli central, mentre que en els uPA^{-/-} el múscul encara no ha completat la regeneració. Inclús 20 dies després de la lesió (20) el múscul uPA^{-/-} no ha pogut completar la seva regeneració. És de destacar la presència de fibres necròtiques no fagocitades a temps molt distants de la lesió en els ratolins uPA^{-/-} (Fig. 37). La immunohistoquímica dels músculs de ratolins control i uPA^{-/-} 5 i 9 dies després de la lesió amb un anticòs monoclonal contra la miosina del desenvolupament (MHCd), una isoforma de la miosina expressada durant l'etapa embrionària i en regeneració muscular, ens indica la presència de miotubs en regeneració (Fig. 38). Als 5 dies, veiem com en els ratolins control la seva expressió és generalitzada en la zona de regeneració, mentre que en els mutants de uPA la seva expressió és més aïllada; en contrast, a 9 dies després de la lesió, els músculs normals ja no presenten expressió de MHCd perquè ja han completat la regeneració, mentre que en els ratolins uPA^{-/-} encara veiem un cert grau d'expressió, en un múscul que encara no han pogut completar la regeneració.

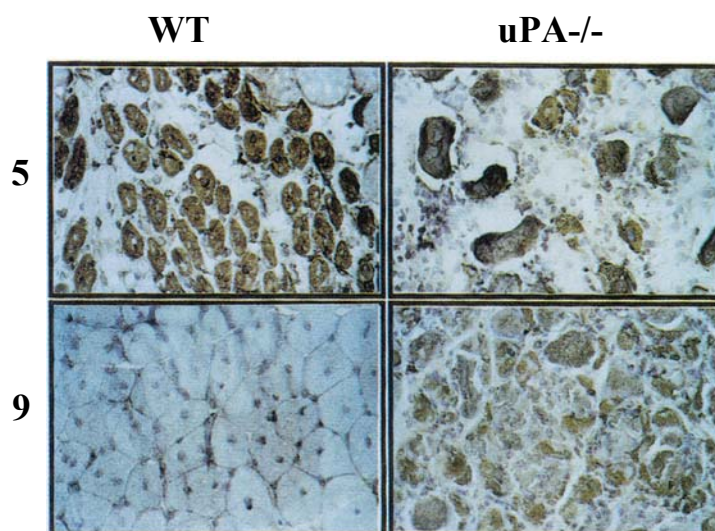


Figura 38 - Expressió de MHCd durant la regeneració en ratolins controls i deficients en uPA 5 i 9 dies després de la lesió. Com es pot observar, el ratolí control (WT) expressa MHCd de forma molt clara als 5 dies post-lesió però ja no l'expressa als 9 dies. En canvi en el ratolí deficient en uPA (uPA^{-/-}) als 9 dies encara queden restes de tinció per MHCd. Els nombres de l'esquerra indiquen dies post-lesió.

3.1.4 - Efectes de la carència de uPA en la resposta inflamatòria després d'una lesió muscular:

Després d'una lesió muscular multitud de monòcits-macròfags són atrets cap a la zona de la lesió. Aquestes cèl.lules desenvolupen un paper principal en la fagocitosi de les restes cel.lulars derivades de la necrosi (Pimorady-Esfahani A 1997). Per tal d'analitzar la distribució dels macròfags en els músculs en regeneració de ratolins uPA^{-/-} i controls, es van portar a terme estudis immunohistoquímics utilitzant l'anticòs contra el marcador de macròfags Mac-1, en músculs no lesionats i en músculs regenerants dos dies després de la lesió. En els músculs no lesionats es van poder comptabilitzar un petit nombre de macròfags residents (sempre inferior a 5 macròfags per camp) tan en ratolins controls com en ratolins uPA^{-/-}. Als dos dies post-lesió, es va detectar un fort increment del nombre de cèl.lules Mac-1 positives en els músculs de ratolins control. També es va detectar un increment en els uPA^{-/-}, però en aquest cas l'increment va ser un 50% menor que en els controls, suggerint que el

reclutament dels macròfags vers la zona necrosada estaria reduïda en absència de uPA (Fig. 39).

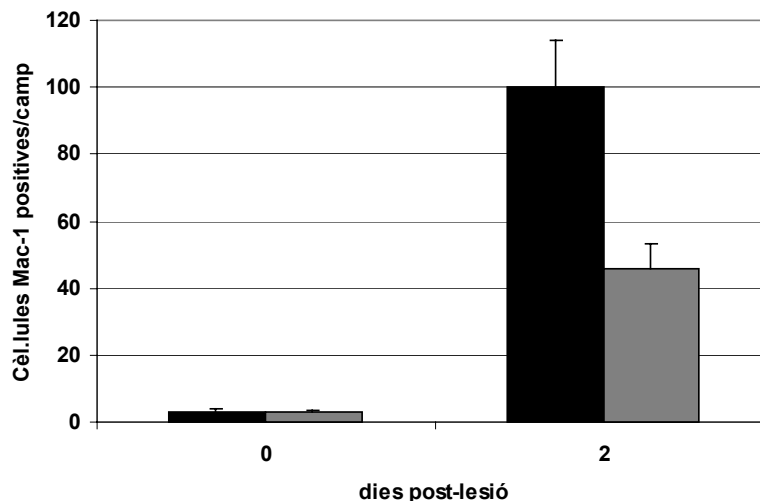


Figura 39 - Presència de cèl·lules Mac-1 positives durant la regeneració. Es van realitzar comptatges de cèl·lules Mac-1 positives a 0 i 2 dies després de la lesió en ratolins control (barres negres) i uPA-/- (barres grises). Es van triar 10 camps a l'atzar dins de la zona lesionada, en 12 seccions per cada múscul, en un mínim de tres ratolins per cada temps i condició.

Tot i que els macròfags han estat identificats com el tipus cel·lular predominant en l'infiltrat inflamatori en lesions experimentals del múscul, els neutròfils també estan presents en el període postnecròtic inicial (Pimorady-Esfahani A 1997). És ben conegut que uPA té funcions importants en la neovascularització i en l'angiogènesi capil·lar que té lloc, per exemple, després d'un infart cardíac (Heymans S 1999). Per tal d'esbrinar si l'angiogènesi en el múscul regenerant dels ratolins carents de uPA presentava també algun tipus d'anomalia, es va portar a terme una immunohistoquímica amb un marcador de les cèl·lules endotelials vasculars, CD31/PECAM-1 (Vecchi A 1994). Amb aquest anticòs, no es van poder trobar diferències significatives entre controls i uPA-/- en el nombre de vasos CD31-positius. No es pot descartar, però, que existeixin petites diferències que s'escapin als nivells de detecció de la tècnica (Lluís F 2001).

3.1.5 - Increment en l'acúmul de fibrina en el múscul lesionat del ratolí

deficient en uPA:

Ja que està ben establert que la funció principal del plasminògen és la fibrinolisi (Lijnen HR 1990), vam estudiar si la pèrdua de uPA en el múscul esquelètic murí podia donar lloc a un acúmul de fibrina després d'una lesió.

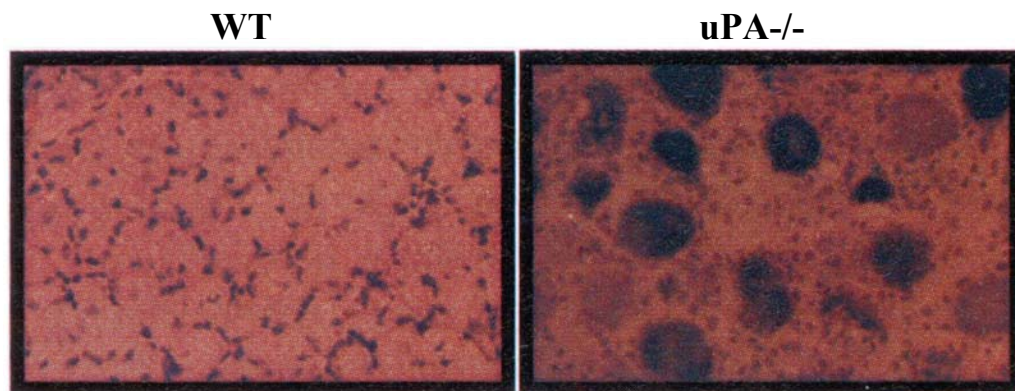


Figura 40 - Presència de fibrina 9 dies post-lesió. Seccions de múscul de ratolins control (WT) i deficients en uPA (uPA^{-/-}) van ser incubats amb anticòs anti-fibrina. El resultat ens mostren la presència d'abundants dipòsits de fibrina en el ratolí uPA^{-/-}, no observats en els controls (a 9 dies post-lesió).

El contingut de fibrina en el múscul regenerant de ratolins controls i uPA^{-/-} es va analitzar amb un anticòs contra fibrina/fibrinògen. 9 dies després de la lesió, els músculs de ratolins control no presenten immunoreactivitat per aquest anticòs. En canvi, es van detectar abundants dipòsits de fibrina en els músculs dels ratolins deficients en uPA, els mateixos dies després de la lesió. Aquests resultats concorden amb el retard en la regeneració observat en ratolins uPA^{-/-}, 9 dies després de la lesió (Fig. 40).

L'administració d'Ancrod (proteasa fibrinolítica extreta d'un verí de serp) s'ha demostrat efectiva en la degradació del fibrinògen sistèmic (Bell W 1978). Unes mini-bombes

osmòtiques que deixaven anar 3U/dia d'Ancrod o de sèrum salí fisiològic van ser implantades als ratolins uPA-/- 3 dies abans de ser lesionats i mantingudes fins 9 dies després de la lesió.

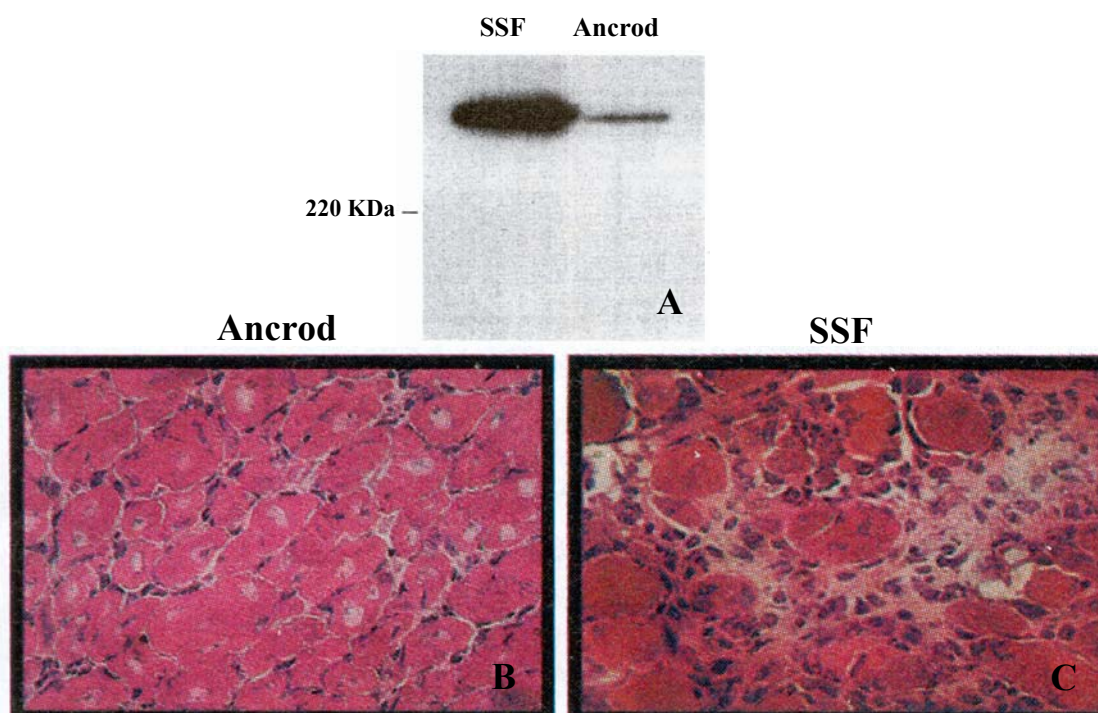


Figura 41 - Efecte de la defibrinogenació sistèmica en la regeneració del ratolí deficient en uPA. La figura A mostra com el tractament amb ancrod és efectivament capaç de reduir els nivells sistèmics de fibrinògen. La defibrinogenació amb ancrod dels ratolins uPA-/- porta a una millora de la seva capacitat regenerativa (B) enfront dels ratolins uPA-/- tractats amb sèrum salí fisiològic (SSF) (C) 9 dies post-lesió. Així veiem com els tractats amb ancrod ja presenten miotubs als 9 dies, mentre que els tractats amb SSF mostren una fase molt més primerenca de la regeneració.

Tal i com es mostra en el Western blot de la Figura 41 A, l'administració d'Ancrod provoca una reducció dels nivells plasmàtics de fibrinògen, sense cap efecte sobre la supervivència dels ratolins. A més, s'observen signes de millora en la regeneració muscular al tractar els ratolins uPA-/- amb Ancrod, ja que nou dies després de la lesió ja apreciem fibres en regeneració amb els seus nuclis en posició no perifèrica i sense infiltrat inflamatori (Fig. 41 B i C). Per la seva banda, els ratolins uPA-/- tractats amb sèrum salí fisiològic, no han avançat

tant en la seva regeneració i mantenen encara l'infiltrat inflamatori. Aquesta observació dóna suport a la idea de que el dipòsit de fibrina-fibrinògen durant la regeneració muscular pot donar lloc a un retard en la regeneració.

3.2 - El doble mutant mdx-uPA-/-:

Donada la rellevància del paper de uPA en la regeneració muscular es va decidir obtenir un ratolí doble mutant, carent de distrofina i de uPA (soca mdx-uPA-/-). El primer fet destacable va ser l'elevada mortalitat que ens va dificultar enormement l'obtenció de la soca de forma estable. Una mortalitat sorprenentment concentrada gairebé exclusivament entre la quarta i la novena setmana de vida dels ratolins. També es va detectar un cert decrement en la seva grandària, perceptible per la simple observació i objectivable amb la mesura del seu pes. La morfologia del seu múscul evidenciava un múscul relativament semblant al del ratolí mdx però amb un aspecte més desestructurat i amb unes característiques distròfiques més accentuades. A més destacava especialment la presència de fibres necròtiques que semblaven no poder ser fagocitades, una característica observada ja en els ratolins uPA-/- lesionats amb glicerol. A més, probablement degut al major temps de residència dels grups necròtics, la seva comptabilització ens va donar un valor superior que en els ratolins mdx.

3.2.1 - Mortalitat de la soca:

Degut a l'elevada mortalitat de la soca doble mutant a partir de la generació en que s'obtenien els dobles mutants purs es va decidir portar un control setmanal de la mortalitat per tal d'establir exactament quina era i quan es produïa la mort d'aquests ratolins. Es va utilitzar la soca mdx com a control. Els resultats van posar de manifest que la mortalitat del ratolí doble mutant mdx-uPA-/- estava al voltant del 80% mentre que en el ratolí mdx era de l'ordre del 5% fins la setmana 25 de vida. A més en el doble mutant la mortalitat es concentra entre la

cinquena i la novena setmanes de vida, coincidint temporalment amb l'inici del període de màxima necrosi del ratolí mdx (Fig. 42).

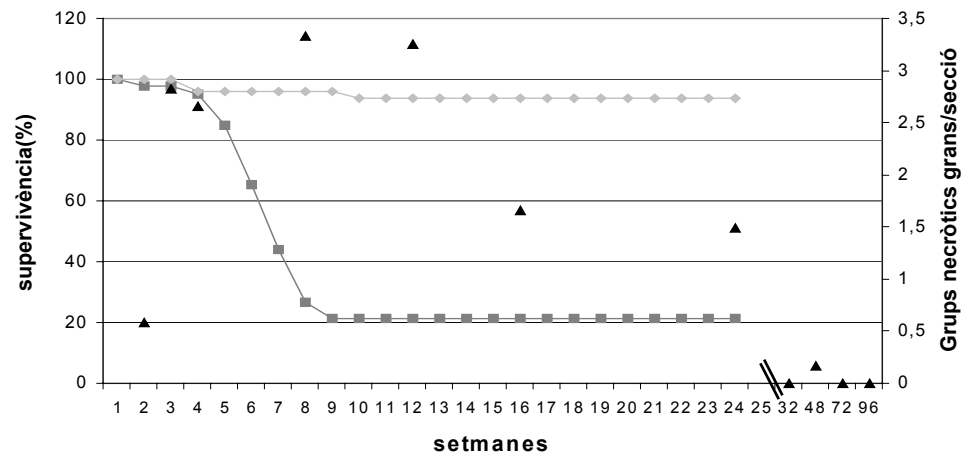


Figura 42 - Elevada mortalitat del doble mutant mdx-uPA-/-. Mentre que en el ratolí mdx la mortalitat fins la setmana 25 és de l'ordre del 5% (línia i triangles gris clar), en el doble mutant mdx-uPA-/- (línies i quadrats gris fosc) aquesta arriba al 80% i es concentra totalment entre la cinquena i la novena setmanes de vida, coincidint temporalment amb l'inici del període de màxima necrosi del ratolí mdx. Els triangles negres indiquen el nombre de grups necròtics de gran temen (involucrant a més de 30 fibres) presents en el ratolí mdx en les edats corresponents (unitats en l'eix Y dret). (nombre de ratolins: 98 per mdx-uPA-/-, 49 per mdx)

Aquesta coincidència de la mortalitat amb l'inici del període de màxima necrosi del ratolí mdx suggeriria que la necrosi muscular podia ser la causa directa de l'elevada mortalitat d'aquests ratolins. Malgrat la coincidència de l'inici de la necrosi amb l'inici de la mortalitat, el descens de la mortalitat no coincideix tan exactament amb la màxima disminució de la necrosi, ja que aquesta es manté encara unes tres setmanes a nivell elevat. Ja que la variació en l'afectació muscular entre diferents individus és elevada, es possible que els ratolins més afectats per la malaltia morin en la fase inicial i per això es detecti una menor mortalitat de la que seria esperable entre 9 i 12 setmanes aproximadament.

3.2.2 - Creixement de la soca:

Durant la cria dels ratolins es va evidenciar que els ratolins de la soca *mdx-uPA*^{-/-} presentaven una grandària menor del que hauríem esperat per la seva edat en comparació amb els ratolins de les soques *mdx* i *uPA*^{-/-}. Per tal d'objectivar numèricament aquesta disminució de grandària, es va decidir portar un control periòdic dels pesos dels animals. El resultat obtingut d'aquest seguiment evidencien que els ratolins dobles mutants *mdx-uPA*^{-/-} presenten uns pesos significativament menors respecte les soques *mdx* i *uPA*^{-/-}.

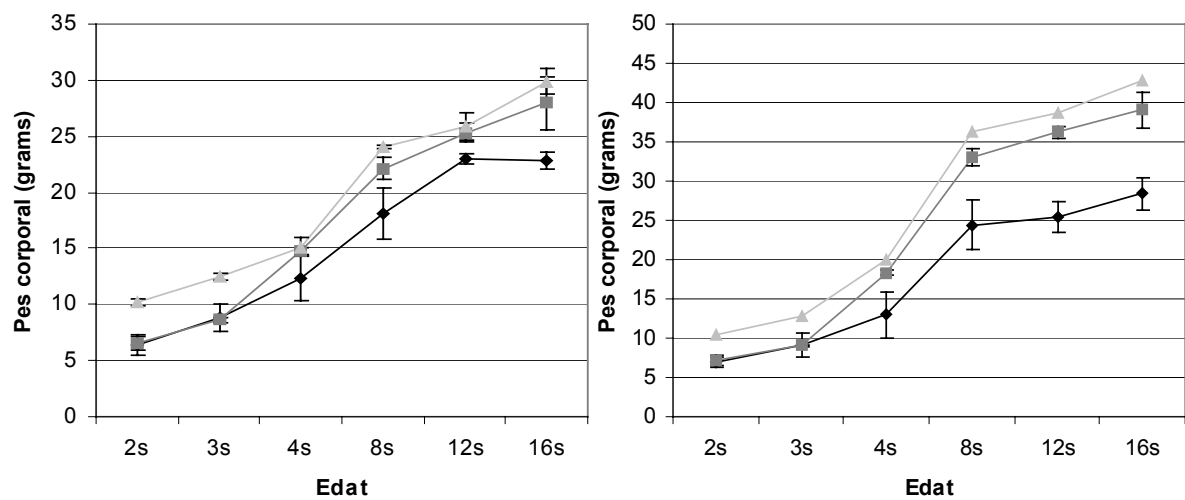


Figura 43 - Disminució del pes en el doble mutant *mdx-uPA*^{-/-}. Es van mesurar els pesos de ratolins de les soques *uPA*^{-/-} (línies i triangles gris clar), *mdx* (línies i quadres gris fosc) i del doble mutant *mdx-uPA*^{-/-} (línies i rombes negres) en femelles (A) i mascles (B) per separat. Es pot observar com els ratolins dobles mutants *mdx-uPA*^{-/-} presenten uns pesos significativament menors respecte les dues altres soques. Es van analitzar entre 3 i 9 ratolins per cada edat i condició, excepte pels mascles *uPA* amb només 1 sol exemplar.

3.2.3 - Característiques patològiques musculars del doble

mutant mdx-uPA-/-:

Tal i com es mostra mostrat en l'apartat 1 d'aquests resultats, s'ha portat a terme una caracterització acurada de la cronopatologia del grup muscular del gastrocnemi del ratolí mdx. Per aquest motiu s'han pogut comparar les característiques distròfiques del ratolí mdx amb les del doble mutant mdx-uPA-/- (Fig. 44). S'ha observat que tan en el doble mutant mdx-uPA-/- com en el mdx, la patologia no es manifesta mai abans dels 15 dies, i el múscul presenta un aspecte totalment normal. En el ratolí mdx-uPA-/-, un cop començada la necrosi trobem les característiques distròfiques més remarcades que no el ratolí mdx, amb un múscul amb un aspecte més desestructurant i uns grups necròtics més nombrosos (veure comptabilització en el següent apartat) i amb un aspecte molt més caòtic que no pas els dels mdx. Aquest aspecte més caòtic del múscul doble mutant es deu a que els grups necròtics del ratolí mdx presenten una certa sincronia en l'eliminació de les fibres i en la posterior regeneració, mentre que en els grups del ratolí mdx-uPA-/- trobem fibres per fagocitar enmig d'infiltrat inflamatori i fibres ja regenerades, tot en el mateix grup necròtic, probablement degut al bloqueig parcial en la regeneració que aquest doble mutant presenta. Aquest desordre dels grups necròtics fa fàcil la distinció visual d'un múscul de ratolí mdx d'un de ratolí mdx-uPA-/-. A més, s'aprecia un engruiximent més destacable dels endomisis en el ratolí mdx-uPA atribuïble a la fibrosi. La diferència més remarcable, però, entre el ratolí mdx i el mdx-uPA-/- és la presència habitual, en el segon, de fibres necròtiques no fagocitades molts dies després de l'establiment del grup necròtic que les conté.

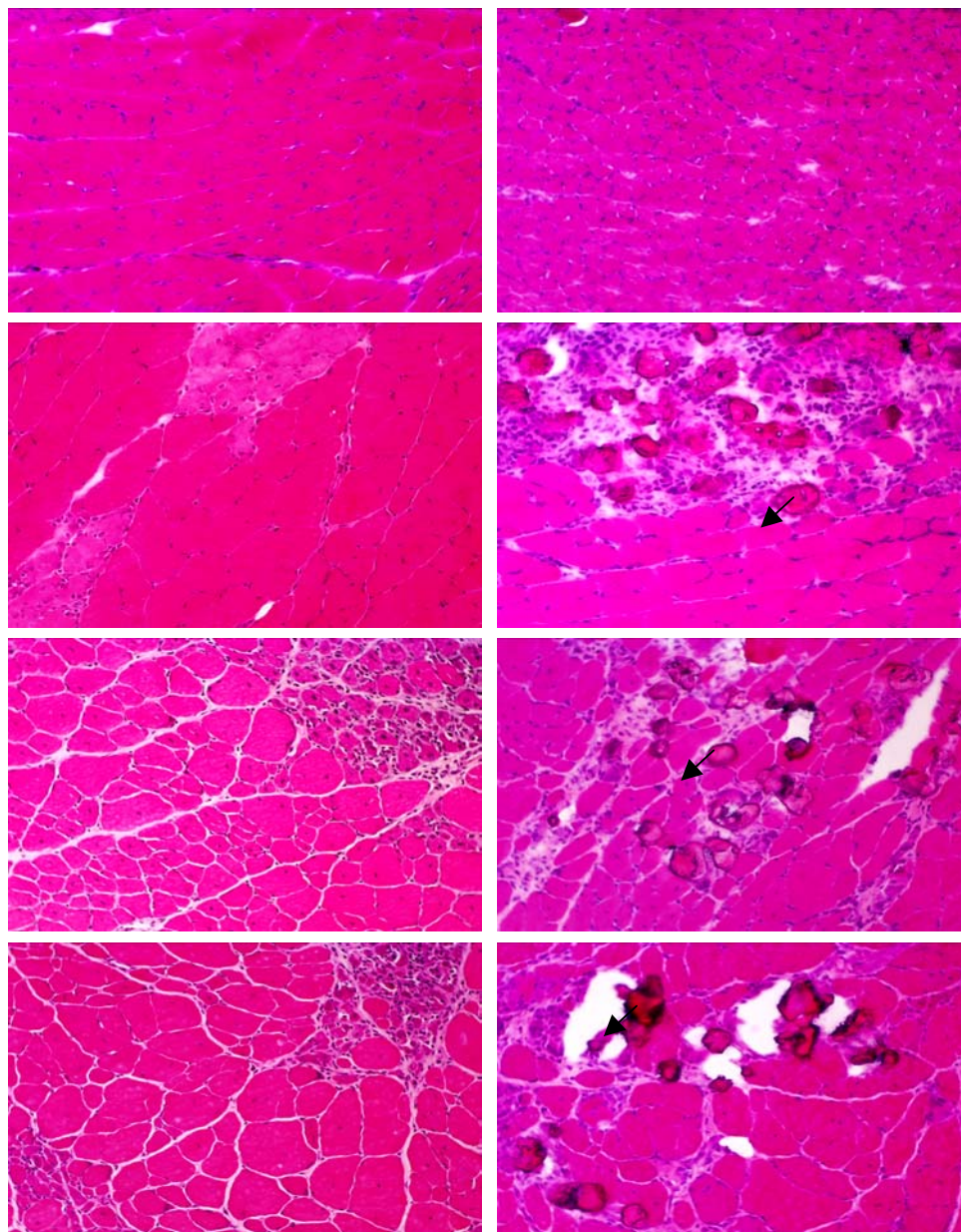


Figura 44 - Característiques musculars distròfiques en el doble mutant mdx-uPA^{-/-}: Fotocomposició comparativa entre els fenotips distròfics dels ratolins de la soca mdx i els dobles mutants mdx-uPA^{-/-}. En la columna de l'esquerra ratolins mdx de 15 dies, 1 mes, 2 mesos i 4 mesos. En la columna dreta ratolins dobles mutants de les mateixes edats. Es pot apreciar com el fenotip distròfic és més accentuat en els ratolins dobles mutants presentant com a tret molt característic un gran nombre de fibres necrosades no fagocitades entre els grups regeneratius que mai s'aprecien en els ratolins mdx. Aquestes fibres no fagocitades presenten un mal ancoratge en el teixit doncs sovint es troben desplaçades de la seva posició original (exemples indicats amb fletxa negra). A més, en el doble mutant s'aprecia un engruiximent més accentuat dels espais endomisials.

Aquestes fibres, que també són fàcilment observables en el ratolí uPA^{-/-} lesionat experimentalment amb glicerol, es mantenen en el teixit durant un temps molt llarg, de fins a més de 20 dies, quan en un ratolí amb el gen de uPA intacte no són detectades més enllà de 3 o 4 dies després de la lesió. A més, presenten una unió més laxa amb el teixit que no pas les fibres normals, ja que a l'obtenir els talls criostàtics sovint perden la seva posició original, tal i com es pot veure en la figura 44.

3.2.4 - Presència de grups necròtics:

Malgrat que la observació del múscul del ratolí mdx-uPA^{-/-} mostrava una afectació muscular més severa que no pas el ratolí mdx, es va decidir objectivar aquesta impressió visual mitjançant un comptatge de grups necròtics. Donat que s'havien classificat i caracteritzat els grups necròtics del ratolí mdx segons la seva grandària (Apartat 1 d'aquests resultats), es va realitzar un comptatge de grups necròtics involucrant a més de 15 fibres, ja que la seva contribució al fenotip distròfic és molt més important que la dels grups necròtics petits. Tal i com es pot veure en la figura 55, el nombre de grups necròtics que involucren a més de 15 fibres segueix una evolució similar en el ratolí mdx que en el mdx-uPA^{-/-}, iniciant-se a partir de les dues setmanes de vida, presentant un màxim entorn dels 2 mesos i un posterior i gradual decrement. Malgrat aquesta similitud en l'evolució general d'aquests grups degeneratius-regeneratius el nombre sempre és més elevat en els dobles mutants mdx-uPA^{-/-} que no pas en els mdx. Ens vam plantejar la hipòtesi de que potser observàvem més grups necròtics en el doble mutant, degut a que aquests es mantenen durant més temps en el teixit, però que el nombre de grups necròtics que es donaven era aproximadament el mateix.

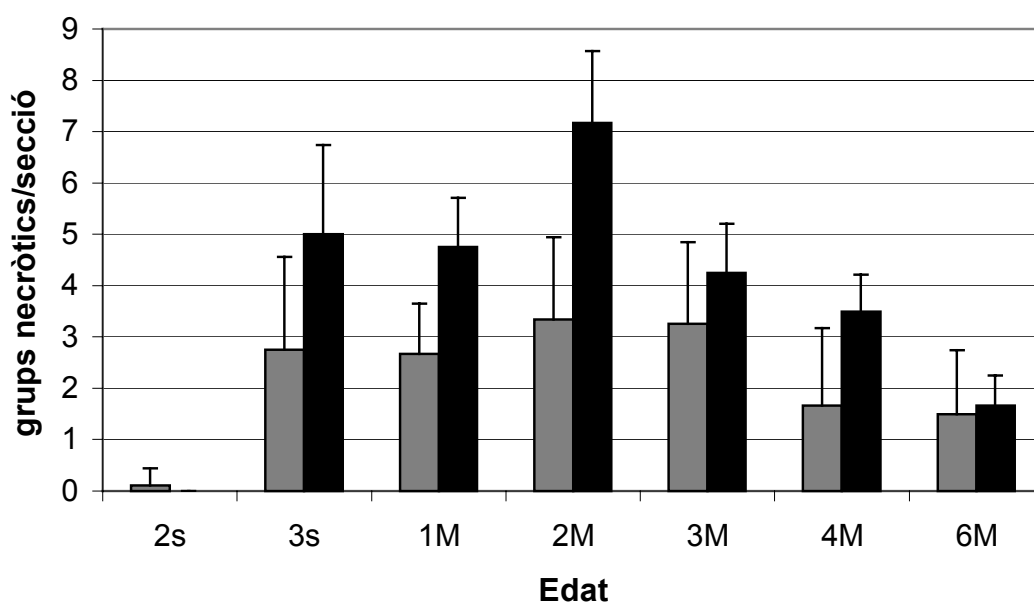


Figura 45 - Comparació del nombre de grups necròtics entre ratolins mdx i mdx-uPA^{-/-}. A través del microscopi òptic i amb seccions tenyides amb hematoxilina-eosina es va comptabilitzar el nombre de grups necròtics grans (que involucraven a més de 15 fibres) en ratolins mdx (barres grises) i en ratolins dobles mutants mdx-uPA^{-/-} (barres negres). Tal i com es pot veure en la gràfica ambdues soques no comencen a necrosar abans de les dues setmanes, pateixen un ràpid increment de la necrosi i una posterior i gradual disminució. El nombre de grups necròtics és superior en els ratolins dobles mutants que en els ratolins mdx en totes les edats analitzades entre 3 setmanes i 6 mesos. s: setmanes de vida, M: mesos de vida.

3.2.5 – Percentatge de fibres amb nuclis no perifèrics (NNP):

Per tal de verificar que les diferències observades entre les soques mdx i mdx-uPA^{-/-} eren degudes a un retard en la regeneració, es va comparar el percentatge de fibres amb nucli no perifèric (NNP) present en ambdues soques a 1 mes d'edat, quinze dies després del començament de la necrosi-regeneració (Fig. 46). Mentre que en el ratolí mdx el nombre de fibres amb NNP està al voltant del 30%, en el ratolí doble està al voltant del 12%. Això és equivalent a dir que en el ratolí mdx un 30% de les fibres ja han superat almenys un cicle de necrosi-regeneració, mentre que en el doble mutant només un 12 % han aconseguit fer-ho. El nombre de grups necròtics que es troben a aquesta edat ja és superior en el ratolí doble mutant que en el ratolí mdx. Aquestes dades suggereixen que el ratolí doble mutant no necrosa més

que el mdx, sinó que regenera pitjor que aquest, tal i era d'esperar segons els resultats previs sobre el paper de uPA en la regeneració muscular.

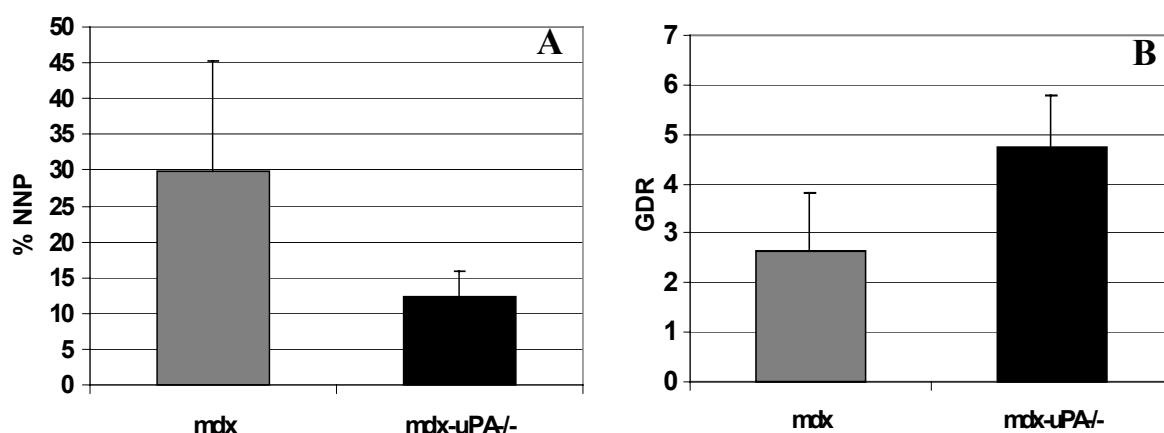


Figura 46 - Nuclis centrals i grups necròtics a 1 mes en ratolins mdx i mdx-uPA^{-/-}. El percentatge de fibres amb nuclis no perifèrics (%NNP) en el ratolí mdx és bastant superior que el percentatge observat en el doble mutant **(A)**. En canvi, el nombre de grups degeneratius-regeneratius és sensiblement superior en els ratolins dobles mutants que en els mdx **(B)**.

3.2.6 – Caracterització anatòmica de les fibres necròtiques no fagocitades:

3.2.6.1 – Tincions de Von Kossa, Pearls i PAS:

Una de les característiques anatòmiques més sorprenents del múscul dels ratolins mdx-uPA^{-/-} va ser la presència de les fibres necròtiques no fagocitades. Teníem la sospita de que poguessin estar calcificades o que acumulessin ferro o carbohidrats en el seu interior, i per aquest motiu es van realitzar les tincions histològiques pertinents. La tinció de Von Kossa dóna un fort marcatge de color negre en presència de calci i la tinció de Pearls dóna un precipitat del mateix color en presència de ferro (Fig. 47).

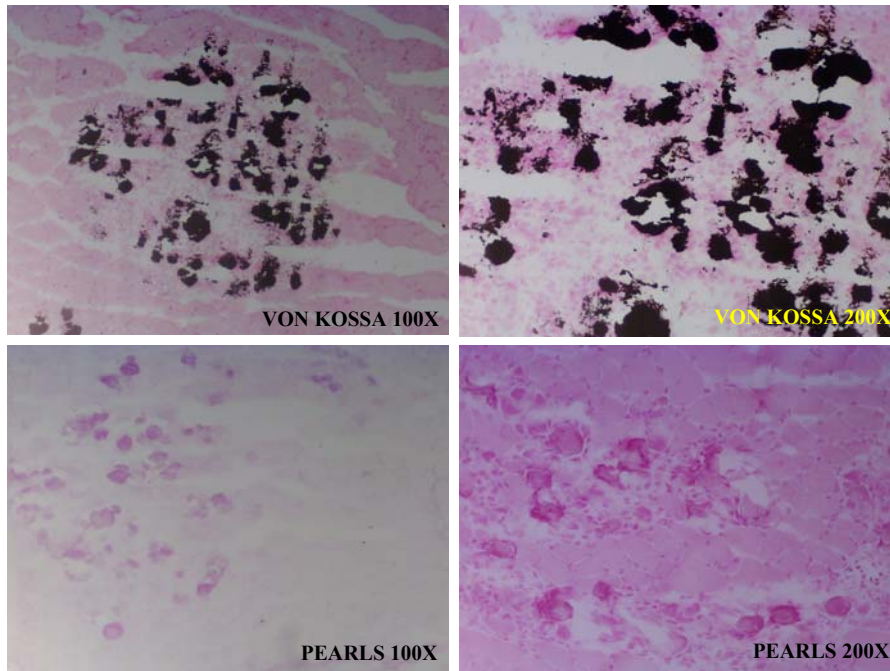


Figura 47 - Demostració de la presència anormal de dipòsits càlcics en les fibres no fagocitades dels ratolins mdx-uPA^{-/-}. Tal i com es pot veure en la tinció de Von Kossa, les fibres no fagocitades presenten un acúmul molt clar de calci (en color negre). La tinció de Pearls ens permet descartar acúmuls fèrrics en aquestes mateixes fibres (donarien també tinció de color negre). La tinció de Pearls, al donar resultat negatiu, ens permet també visualitzar aquestes fibres no fagocitades ja que es tenyeixen amb un marcatge rosat més fort que la resta de fibres.

El resultat obtingut, mostra clarament com les fibres en qüestió es troben fortament calcificades, mentre que no es detecten acúmuls ni de ferro ni de carbohidrats. En la figura 47 es mostren les tincions de Von Kossa amb un resultat positiu i la tinció de Pearls (resultat negatiu) es mostra ja que permet de distingir les fibres necròtiques no fagocitades gràcies a la seva contratinció amb eosina. Tan la tinció de Pearls com la de PAS (no es mostra) van donar resultat negatiu. Per tan vam poder concloure que aquestes fibres presentaven un important acúmul de calci en el seu interior.

3.2.6.2 - Microscopia electrònica:

En el microscopi electrònic (Fig. 48), les fibres necròtiques no fagocitades del ratolí mdx-uPA^{-/-} van presentar una marcada desorganització del patró miofibril·lar amb acumulacions focals de grans mitocòndries, sense inclusions proteiques. Va destacar especialment la presència d'espícules electrodenses no rodejades de membrana, compostes de material finament filamentós o granular i compatibles amb dipòsits càlcics, confirmant els resultats de la tinció de Von Kossa.

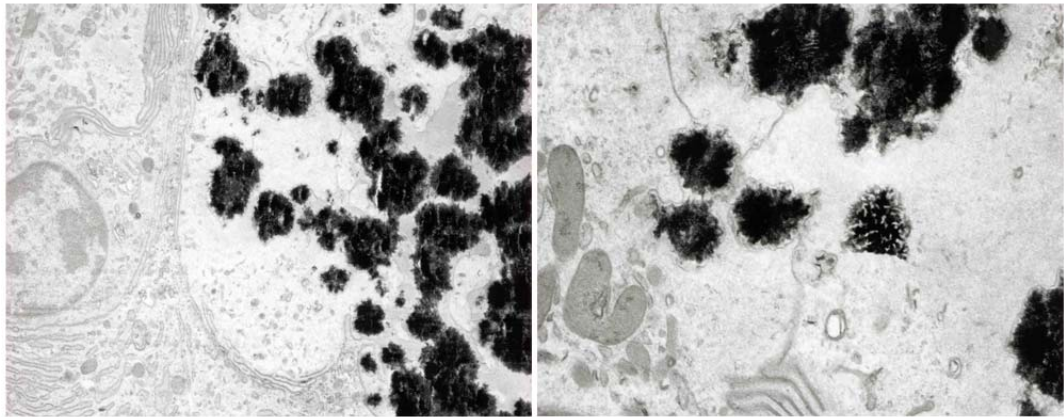


Figura 48 - Fotografies al microscopi electrònic de les fibres no fagocitades del ratolí mdx-uPA^{-/-}. En el microscopi electrònic, les fibres no fagocitades del ratolí mdx-uPA^{-/-} presenten espícules electrodenses no rodejades de membrana, compostes de material finament filamentós o granular i compatibles amb dipòsits càlcics.

4 - Expressió diferencial de gens en el múscul esquelètic del

ratolí mdx:

Mitjançant a la tècnica de RAP-PCR (*random arbitrarily primed-PCR*) vam poder detectar l'expressió diferencial de gens comparant el ratolí mdx amb la seva soca control. Totes les bandes, seleccionades per la seva diferencialitat, presentaven una expressió superior en ratolins mdx que en controls. Ja que els mRNA's que van ser identificats com a diferencials corresponen a proteïnes d'estructura i funció molt diversa, han estat agrupades en diferents grups per una major claredat dels resultats.

4.1 - Seqüències amb homologia amb enzims:

Banda 1: Aquesta banda, de 363 parells de bases presenta un aliniament del 100% amb el clon de ratolí 748005 que és un clon del que l'únic que es coneix és que presenta homologia amb un enzim de *E.Coli* anomenat 2-hidroxihepta-2,4-diè-1,7-dioat isomerasa, enzim que catalitza un pas en la via catabòlica de l'àcid homoprotocatecuic (HPC) (Roper DI 1993). Recentment s'ha publicat la seva estructura cristal·lina i se sap que la proteïna està dividida en dues meitats molt similars entre sí (Fig. 49) i que la comparació del seu plegament amb els bancs de dades dóna lloc a un gran nombre d'homologies amb proteïnes en moltes espècies, la majoria d'elles no caracteritzades, però que aparentment la majoria d'elles estarien implicades en el metabolisme de compostos aromàtics (Tame JR 2002).

Banda 8: Aquesta banda (Fig. 49), de 514 parells de bases presenta un alineament del 100% amb la S-Adenosilmetionina descarboxilasa de ratolí (AF052604.1|AF052604) (EC

4.1.1.50) Aquest enzim participa en la síntesi de poliamines, les quals s'ha demostrat que són indispensables per la proliferació de les cèl·lules de mamífer (Shantz LM 1999). En concret, per convertir la putrescina a espermidina i espermina cal disposar de S-adenosilmetionina descarboxilada com a donador del grup aminopropil. Aquesta descarboxilació és un dels passos claus de la via i està catalitzat per la S-adenosilmetionina descarboxilasa (Pegg AE 1992). A més, ha estat descrit que després d'una denervació, el teixit muscular esquelètic del diafragma incrementa la seva concentració de poliamines (Hopkins D 1981).

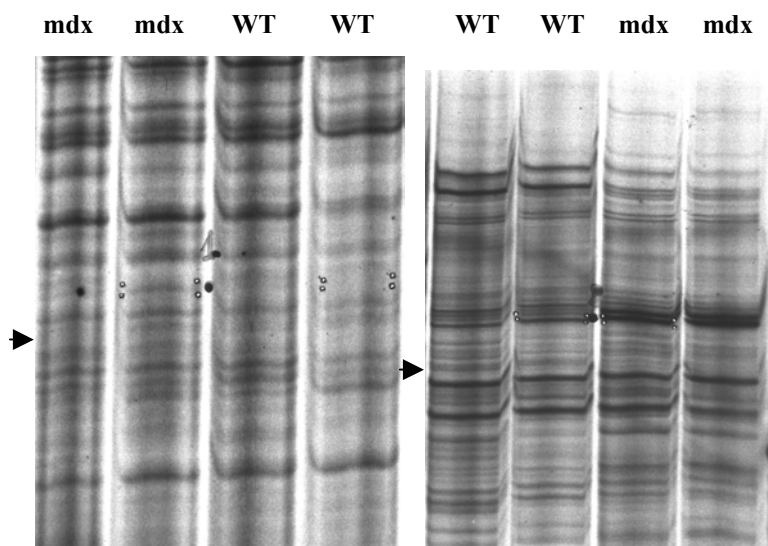


Figura 49. Detall dels films autoradiogràfics corresponents als gels del *differential display* dels quals s'ha obtingut la banda 1 (A) i la banda 8 (B). Mdx: Soca de ratolí mdx. WT: Soca de ratolí control. Les bandes seleccionades com a diferencials s'indiquen amb fletxes negres.

4.2 - Seqüències amb homologia amb interleuquines:

Banda 5: Banda de només 150 parells de bases que presenta un alineament del 100% amb la *petita citoquina induïble A6 (Scya6 o C10)* de ratolí (NM 009139.1). El gen d'aquesta citoquina presenta 4 exons. El segon, de 48 nucleòtids, codifica per un elevat nombre

d'aminoàcids carregats i no ha estat trobat en cap altre citoquina. Els seus exons 3 i 4 contenen quatre cisteïnes distribuïdes de la mateixa forma que en els exons 2 i 3 d'altres membres de la família a la que pertany, les beta-citoquines (Berger MS 1993). Sobre la seva funcionalitat se sap que es produeix molt activament durant processos d'inflamació crònica, on actua com a quimioatracient de macròfags especialment en la fibrosi pulmonar on sembla tenir un paper important en la regulació de l'acúmul de proteïnes fibrogèniques (Belperio JA 2002, Johnston CJ 2002). Fins el moment no s'ha descrit la seva expressió a múscul, però l'elevada expressió que hem detectat en el ratolí mdx suggereix que podria tenir alguna funció important en aquest teixit (Fig. 50).

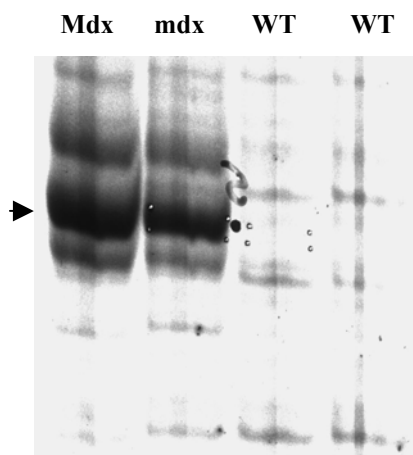


Figura 50. Detall del film autoradiogràfic corresponent al gel del *differential display* del qual s'ha obtingut la banda 5. Mdx: Soca de ratolí mdx. WT: Soca de ratolí control. Les banda seleccionada com a diferencial és la que s'indica amb la fletxa negra.

4.3 - Seqüències amb homologia amb proteïnes transmembrana:

Banda 3: Banda de 377 parells de bases, que presenta un alineament del 100% amb la proteïna de ratolí de la família de les tetraspanines anomenada CD63 (NM 007653.1). És una proteïna amb quatre dominis transmembrana i un gran *loop* extracel·lular que s'associa a la integrina β_1 . S'ha demostrat que està implicada en processos d'adhesió a matriu extracel·lular

i diferenciació de cèl.lules epitelials intestinals (Halldén G 1999) No se li ha demostrat fins el moment cap funció en el teixit muscular (Fig. 51).

Banda 9: Banda de 197 parells de bases, que presenta un 96% d'homologia amb un clon que segons s'ha predit codificaria per una putativa glicoproteïna transmembrana (NMB), de funció totalment desconeguda (AI429397) (Fig. 51). La recent publicació del genoma de ratolí (Mouse Genome Consortium, 2002) ens ha permès de saber que la nostra seqüència s'alinea en un 97% amb una part del cromosoma 6 del ratolí, en concret en la banda B3 de l'esmentat cromosoma (segons el Mouse Genome Sequence Consortium-ContigView). No s'ha descrit l'existència de la proteïna per la que codificaria aquest clon.

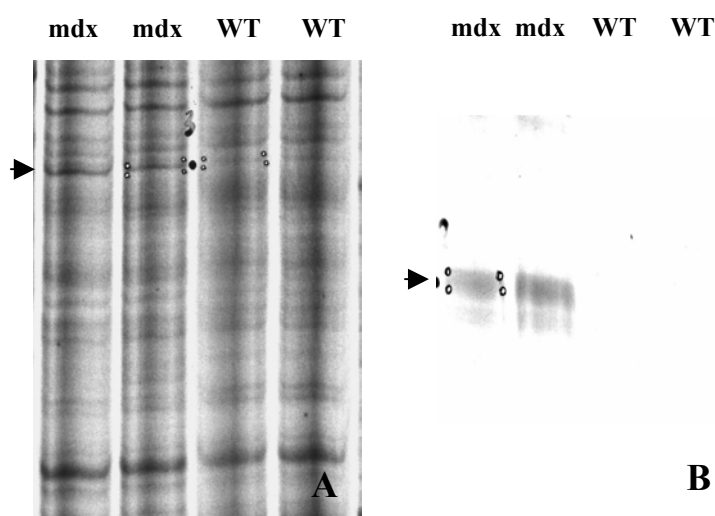


Figura 51. Detall dels films autoradiogràfics corresponents als gels del *differential display* dels quals s'ha obtingut la banda 3 (A) i la banda 9 (B). Mdx: Soca de ratolí mdx. WT: Soca de ratolí control. Les bandes seleccionades com a diferencials s'indiquen amb fletxes negres.

4.4 - Seqüències amb homologia amb clons:

Dues de les seqüències obtingudes presentaven homologia amb clons dels quals se'n coneix només la seqüència. En concret, **la banda 7** (Fig. 52), de 442 parells de bases, s'alinea en un 98% amb el clon AW539558 de ratolí. La recent publicació del genoma de ratolí

(Mouse Genome Consortium, 2002) ens ha permès de saber que la nostra seqüència s'alinea en un 100% amb una part del cromosoma 2 del ratolí, en concret entre les bandes E2 i E3 de l'esmentat cromosoma (segons el Mouse Genome Sequence Consortium-ContigView). No es coneix cap proteïna que correspongui a aquest clon.

La **banda 10**, de 233 parells de bases (Fig. 52), també presenta homologia amb el clon AA423022.1 de ratolí. La recent publicació del genoma de ratolí (Mouse Genome Consortium, 2002) ens ha permès de saber que la nostra seqüència s'alinea en un 98% amb una part del cromosoma 13 del ratolí, en concret dins de la banda A5 de l'esmentat cromosoma (segons el Mouse Genome Sequence Consortium-ContigView). No es coneix cap proteïna que correspongui a aquest clon. (Fig. 38).

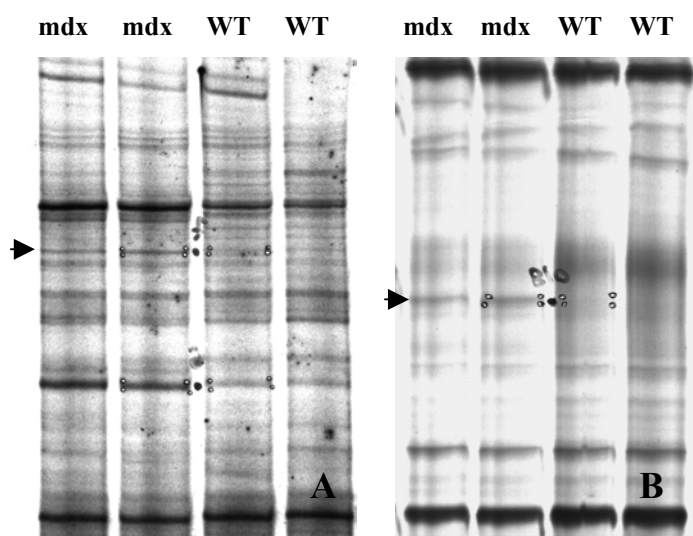


Figura 52. Detall dels films autoradiogràfics corresponents als gels del *differential display* dels quals s'ha obtingut la banda 7 (A) i la banda 10 (B). Mdx: Soca de ratolí mdx. WT: Soca de ratolí control. Les bandes seleccionades com a diferencials s'indiquen amb fletxes negres.

4.5 - Seqüències sense identitat inicial significativa amb cap seqüència coneguda:

Finalment, es van trobar també dues bandes sense identitat significativa amb cap de les seqüències introduïdes fins el moment (setembre de 2000) en les bases de dades. Corresponen a les que hem anomenat **banda 2** (de 234 parells de bases) i **banda 4** (de 254 parells de bases)

(Fig. 53). Ambdues bandes presenten una elevada diferencialitat. Per tal de disposar de més informació sobre elles vam decidir realitzar experiments addicionals per tal de disposar d'un fragment més llarg de la seva seqüència.

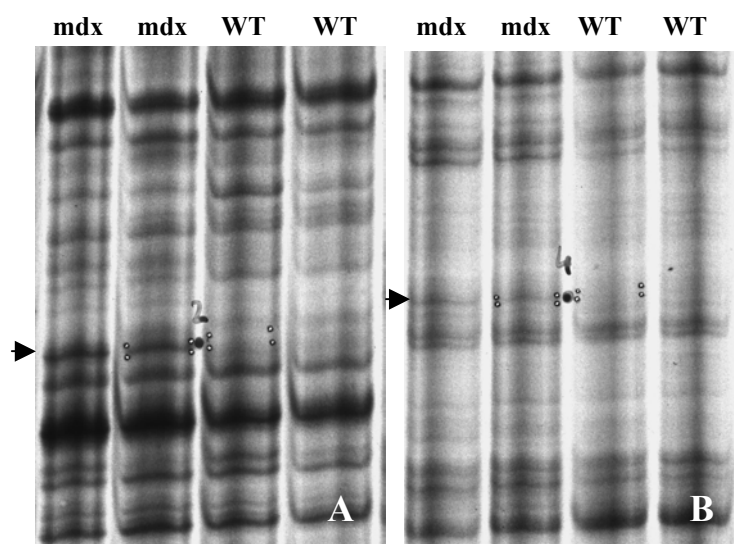


Figura 53. Detall dels films autoradiogràfics corresponents als gels del *differential display* dels quals s'ha obtingut la banda 2 (A) i la banda 4 (B).
Mdx: Soca de ratolí mdx. WT: Soca de ratolí control. Les bandes seleccionades com a diferencials s'indiquen amb fletxes negres.

Amb posterioritat, es va realitzar la tècnica de 5'-RACE per tal de tenir la seqüència sencera o almenys una part de d'ella per les bandes 2 i 4. Per la banda 2 no va ser possible d'obtenir una amplificació correcte mitjançant aquesta tècnica. Si que vam obtenir, en canvi, resultats positius per la banda 4 (Fig. 54). Per la banda 4 vam obtenir una seqüència d'aproximadament 3 Kb. La seva clonació i seqüenciació ens va permetre entrar en zona codificant i trobar un alineament del 100% amb la citrat sintasa de ratolí un cop dins de la zona codificant. Per tan la que originalment vam anomenar com a banda 4 resulta ser la citrat sintasa, que es troba regulada a l'alça en el ratolí distròfic. Per altre banda, la recent publicació del genoma de ratolí (Mouse Genome Consortium, 2002) ens ha permès de saber que la nostra seqüència corresponent a la banda 2 s'alinea en un 99% amb una part del cromosoma 14 del ratolí, en concret entre les bandes E2 i E3 de l'esmentat cromosoma (segons el Mouse Genome Sequence Consortium-ContigView). No s'ha descrit cap proteïna que correspongui a aquest clon.

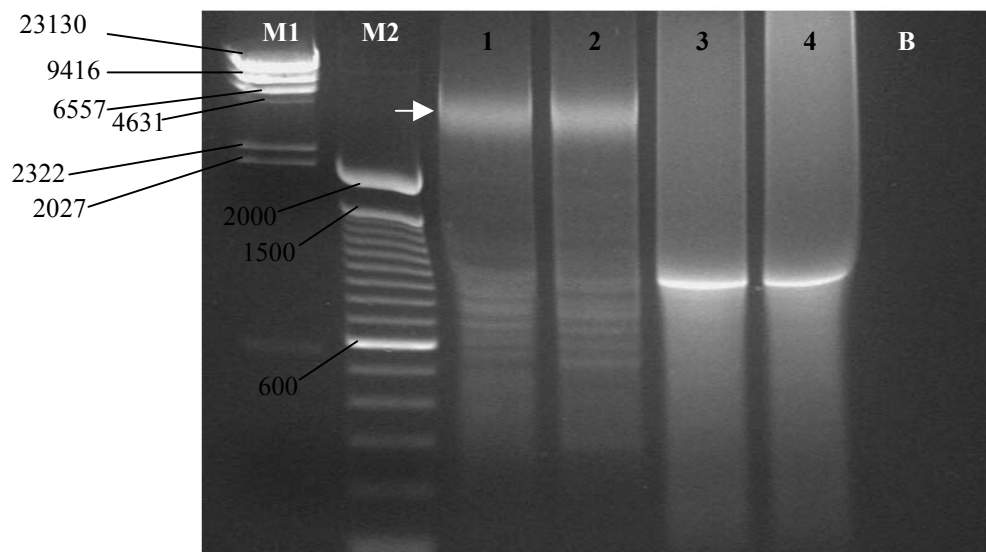


Figura 54 - Allargament de la seqüència per 5'-RACE de la banda 4. De la PCR del RACE es va obtenir una banda de unes 3 Kb (fletxa blanca) que va ser clonada i seqüenciada donant lloc a un alineament del 100% amb la citrat sintasa de ratolí (carrils 1 i 2). Carrils 3 i 4: control +, B: blanc. S'indiquen els tamanys en parells de bases de les bandes més significatives dels marcadors (carrils M1 i M2).

5 - Caracterització de l'expressió de la Banda 2 (B2)

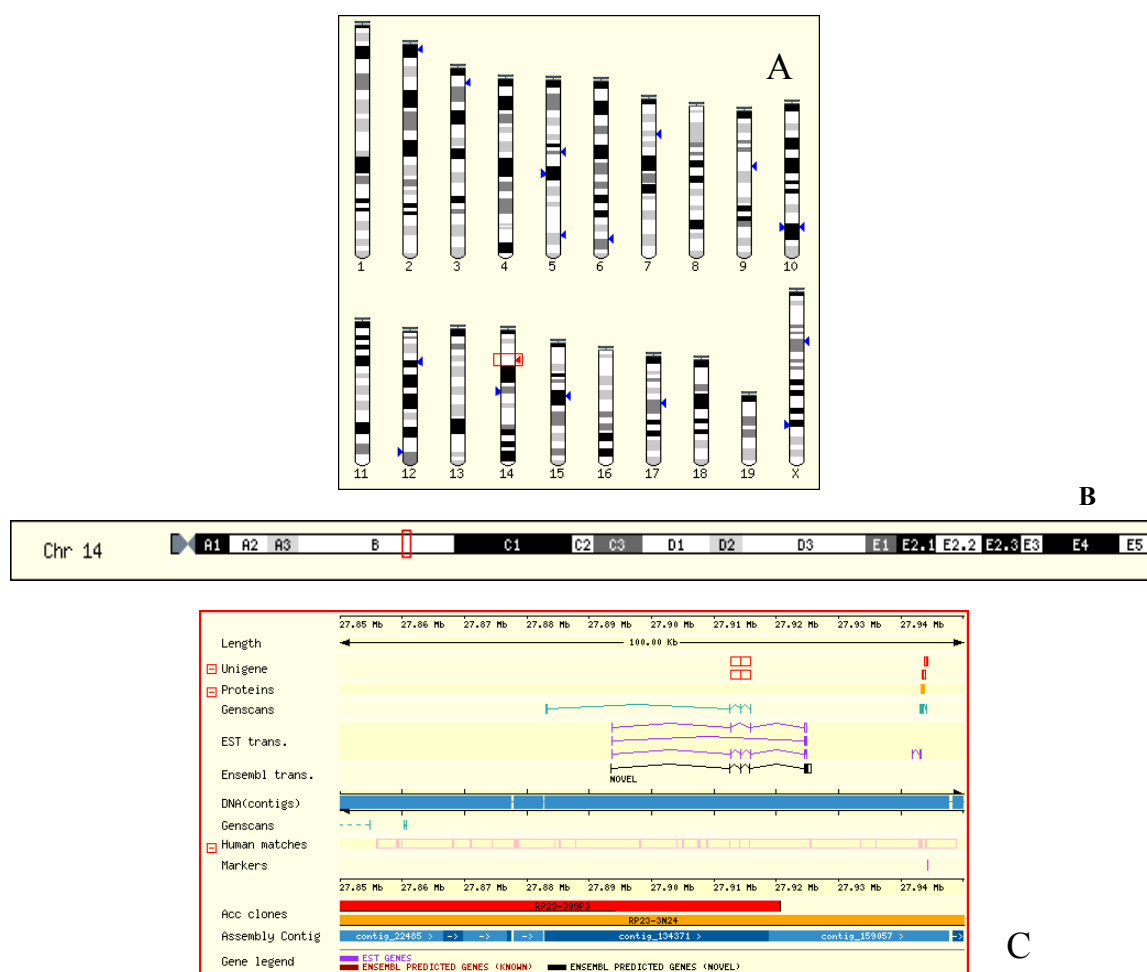


Figura 55 – La banda 2 i el genoma del ratolí. A: Homologies de la banda amb els cromosomes del ratolí. La fletxa vermella indica alineament preferent (99%). Les fletxes blaves indiquen alineaments molt menys significatius (inferiors al 35%). B: Localització exacta en el cromosoma 14 de la zona d'identitat màxima amb la banda 2. en el gràfic s'indiquen les bandes cromosòmiques existents en la zona. C: Alineament de la regió cromosòmica entre 27.850.860 Mb i 27.950.860Mb amb seqüències prèviament descrites a les diferents bases de dades existents (indicades a l'esquerra de la figura). A la part superior i inferior s'indica el nombre de Megabases respecte a l'inici del cromosoma. La banda 2 correspon a la zona entre 27.900747Mb i 27.900973Mb. (Mouse Genome Sequence Consortium) i per tan correspondria a una regió intrònica segons les prediccions de ENSEMBL.

La recent publicació del genoma de ratolí (Mouse Genome Consortium, 2002) ens ha permès de saber que la nostra seqüència corresponent a la banda 2 s'alinea en un 99% amb una part del cromosoma 14 del ratolí, en concret entre les bandes E2 i E3 de l'esmentat cromosoma (segons el Mouse Genome Sequence Consortium-ContigView). Presenta també altres identitats amb diferents zones cromosòmiques però aquestes són inferiors en tots els casos al 35% i per tant són molt menys significatives (Fig. 55 A i B). Alineament d'aquesta zona cromosòmica amb totes les seqüències disponibles en els bancs de dades (Fig. 55 C) ens indica que la zona d'aquest cromosoma 14 compresa entre 27.850.860 Mb i 27.950.860Mb presenta una zona amb identitats significatives a un clon de GenScan, tres ESTs (*expressed sequence tag*) i un gen predit per ENSEMBL. El gen al que correspondrien aquests clons correspon al gen ENSMUSG00000041707, però no es disposa de informació sobre la proteïna per la que codificaria ni es detecten homologies amb altres gens. A més, la banda 2 correspon a una regió intrònica en aquestes prediccions.

Per tal de fer una primera caracterització per obtenir una primera informació de B2 vam estudiar l'expressió del seu transcrit en ratolins mdx i controls de la mateixa edat, així com en la línia mioblàstica C2C12 en diferenciació per tal d'esbrinar si trobàvem alguna inducció de la seva expressió que ens pogués donar una primera pista sobre si tenia una funció concreta durant alguna de les múltiples etapes de la diferenciació de mioblast a miotub.

5.1 - Expressió *in vivo* en ratolins mdx i controls:

L'expressió de la banda 2 va ser quantificada per RT-PCR en ratolins mdx de diferents edats i en els seus corresponents controls (Fig. 56). Els resultats obtinguts ens mostren com en els ratolins de 10 dies no es pot apreciar banda, mentre que en els ratolins de 1, 2, 3, 5 i 8 mesos s'aprecia una banda clara, encara que no molt intensa. En la majoria dels ratolins

control no es detecta banda o es veu molt més tènue (5 mesos) que en el ratolí distròfic de la mateixa edat. Això ens suggereix que, tal i com era d'esperar, l'expressió de B2 va lligada a necrosi-regeneració, i que la diferencialitat trobada mitjançant la tècnica del *differential display* es confirma per RT-PCR i que es manté en totes les edats analitzades, excepte a 10 dies. El fet de que no es detecti B2 als 10 dies de vida del ratolí mdx reforça la hipòtesi de que podria participar en la necrosi-regeneració doncs, tal i com hem demostrat prèviament, als 10 dies, el ratolí mdx encara no ha començat a necrosar i per tan tampoc a regenerar.

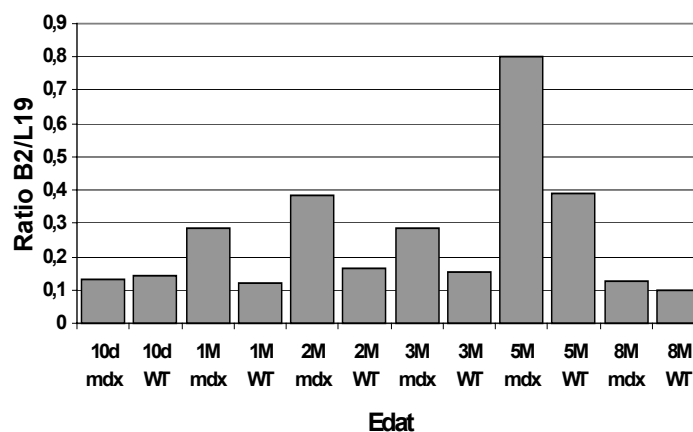
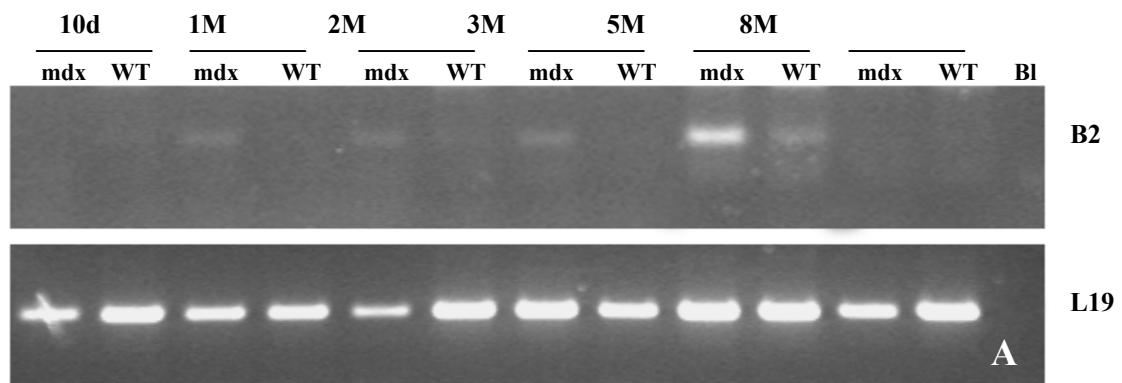


Figura 56 – Expressió de B2 en ratolins mdx i controls. A: La RT-PCR ens mostra com l'expressió de B2 és més alta en ratolins mdx que no pas en controls, on gairebé és indetectable a totes les edats analitzades. **B:** Histograma derivat de la densitometria de B2. Els resultats van ser normalitzats utilitzant l'expressió de L19. d: dies, M: mesos, mdx: soca de ratolins distròfics (mdx), WT: soca de ratolins normals, Bl: blanc.

5.2 - Expressió *in vitro* durant la diferenciació de la línia mioblàstica murina C2C12.

Per tal d'obtenir dades sobre l'expressió de B2 en mioblastes en diferenciació es va analitzar l'expressió del mRNA de B2 durant la diferenciació de la línia mioblàstica murina C2C12 (Fig. 57). Es van posar les cèl.lules en medi de diferenciació i es va anar extraient el seu mRNA a diferents temps.

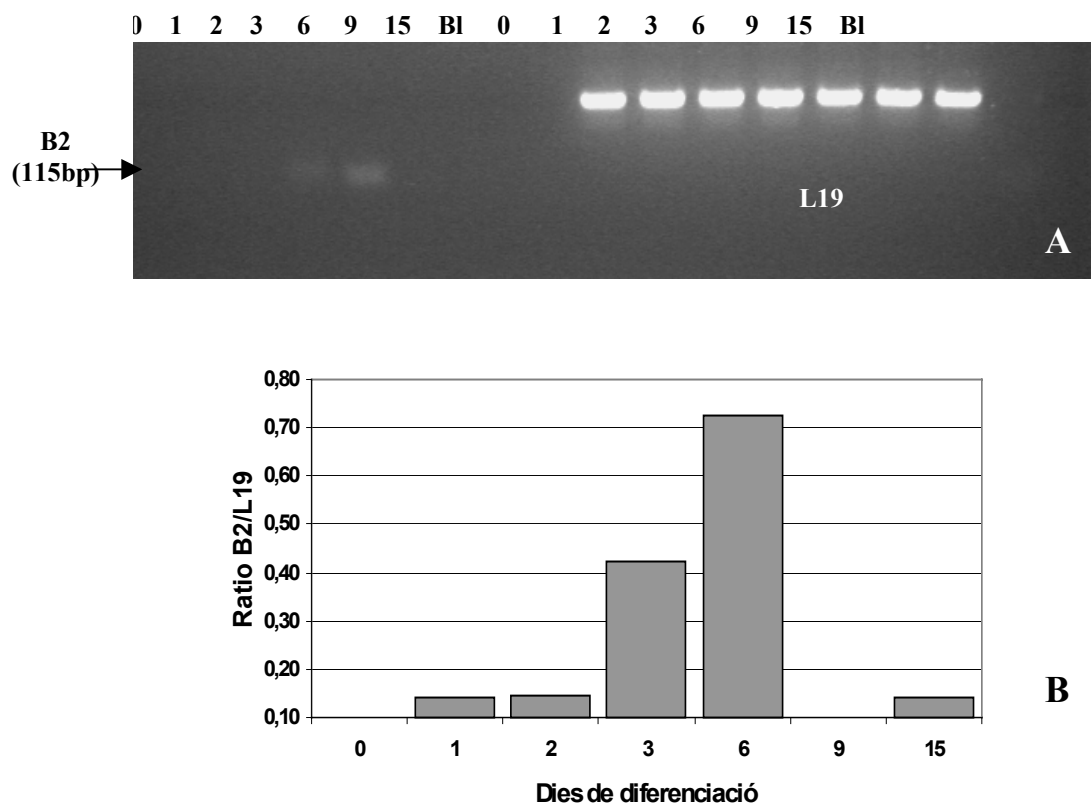


Figura 57 – Expressió de B2 a C2C12 en diferenciació. **A:** Malgrat que l'expressió de B2 determinada per RT-PCR no ens va donar una banda molt intensa, si que veiem una clara inducció entre el tercer i el sisè dia després de mantenir les cèl.lules en medi de diferenciació. **B:** Histograma derivat de la densitometria de la RT-PCR. Els resultats van ser normalitzats utilitzant l'expressió de L19. Les determinacions es van fer a 0, 1, 2, 3, 6, 9 i 15 dies després de l'inici de la diferenciació. Bl: blanc

El primer temps (0) correspon al moment just del canvi a medi de diferenciació. La resta de temps (1, 2, 3, 6, 9 i 15) corresponen a dies després de l'inici de la diferenciació. L'expressió de B2 no es detecta al moment de posar el medi de diferenciació i tampoc la detectem a 1 i 2 dies després de l'inici de la diferenciació. Al tercer dia s'indueix transitòriament, arribant al seu màxim als 6 dies, per deixar de ser detectada a partir dels 9 dies. El fet de que s'expressi en un espai de temps tan concret, afegeix dades en favor de la hipòtesi de que la proteïna per la que codificaria aquest mRNA estaria jugant una funció en un moment molt determinat de la diferenciació. És de destacar que l'expressió de B2 coincidiria en el temps amb la fase en que es pot observar la fusió de mioblastes per donar lloc a miotubs.

6 - Caracterització de l'expressió de CD63 (Banda 3)

Per tal de disposar d'una primera aproximació sobre la funció i el nivell d'expressió de CD63 al múscul esquelètic en general i en particular en el múscul distròfic del ratolí mdx vam portar a terme valoracions de la seva expressió mitjançant RT-PCR semiquantitativa en ratolins mdx i en controls, així com en la línia mioblàstica murina C2C12 en diferenciació.

6.1 - Expressió *in vivo* en ratolins mdx i controls:

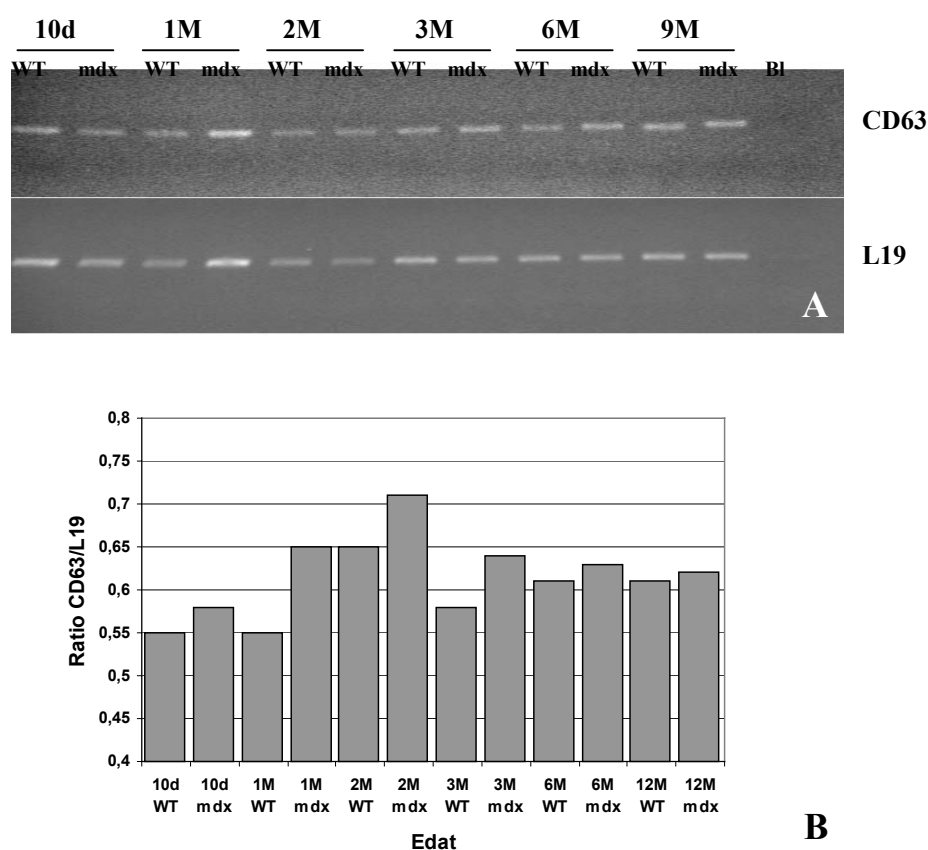


Figura 58 – Expressió de CD63 a ratolins mdx i controls (WT). **A:** RT-PCR semiquantitativa en ratolins mdx i controls (WT). Bl: blanc. **B:** Resultats de la densitometria de les bandes de la RT-PCR. Es pot apreciar un discret increment de l'expressió en els ratolins mdx respecte els controls, especialment en les edats en que la necrosi-regeneració és més important (1 a 3 mesos). d: dies, M: mesos. Bl: blanc.

L'expressió de CD63 en els ratolins mdx no va resultar presentar una diferencialitat tan clara com inicialment esperàvem. Malgrat aquest fet, sí que es detecta un nivell d'expressió discretament més elevat en els ratolins mdx que en els controls, especialment en les edats en que els fenòmens de necrosi-regeneració esdevenen més abundants (de 1 a 3 mesos, Fig. 58). Probablement, el fet de que en els ratolins normals detectem uns nivells tant elevats de CD63 pugui estar emmascarant una inducció important de la seva expressió que és possible que s'estigui produint en algun tipus concret de cèl.lula del teixit muscular, ja siguin fibres en un estadi concret de diferenciació o bé algunes cèl.lules de l'infiltrat inflamatori.

6.2 - Expressió *in vitro* durant la diferenciació de la línia mioblàstica murina C2C12

La verificació de l'expressió de CD63 en mioblastes en diferenciació es va portar a terme mitjançant l'anàlisi per RT-PCR de l'expressió del seu mRNA durant la diferenciació de la línia mioblàstica murina C2C12 (Fig. 59). Es va posar a les cèl.lules medi de diferenciació i es va anar extraient el seu mRNA a diferents temps (2 plaques per cada temps). El primer temps (0) correspon al moment just del canvi a medi de diferenciació. La resta de temps (1, 2, 3, 6, 9 i 15) corresponen al nombre de dies després del canvi a medi de diferenciació. Els resultats ens van mostrar com els seus nivells d'expressió eren relativament alts i constants entre el dia 0 i el dia 15 de diferenciació. El fet de que l'expressió sigui constant i que es detecti en cèl.lules en temps 0 (abans de l'inici de la diferenciació) ens indica que l'expressió de CD63 no es veu induïda durant la diferenciació dels mioblastes, sinó que es manté al mateix nivell d'expressió que en els mioblastes no diferenciats, és a dir que no presenta una regulació. Aquest resultat, si el relacionem amb els obtinguts *in vivo*, ens indica que la diferencialitat detectada *in vivo* no pot ser atribuïda a mioblastes en diferenciació, decantant-

nos cap algun dels components de l'infiltrat inflamatori per poder atribuir a algun tipus cel.lular l'increment d'expressió de CD63 en els ratolins mdx.

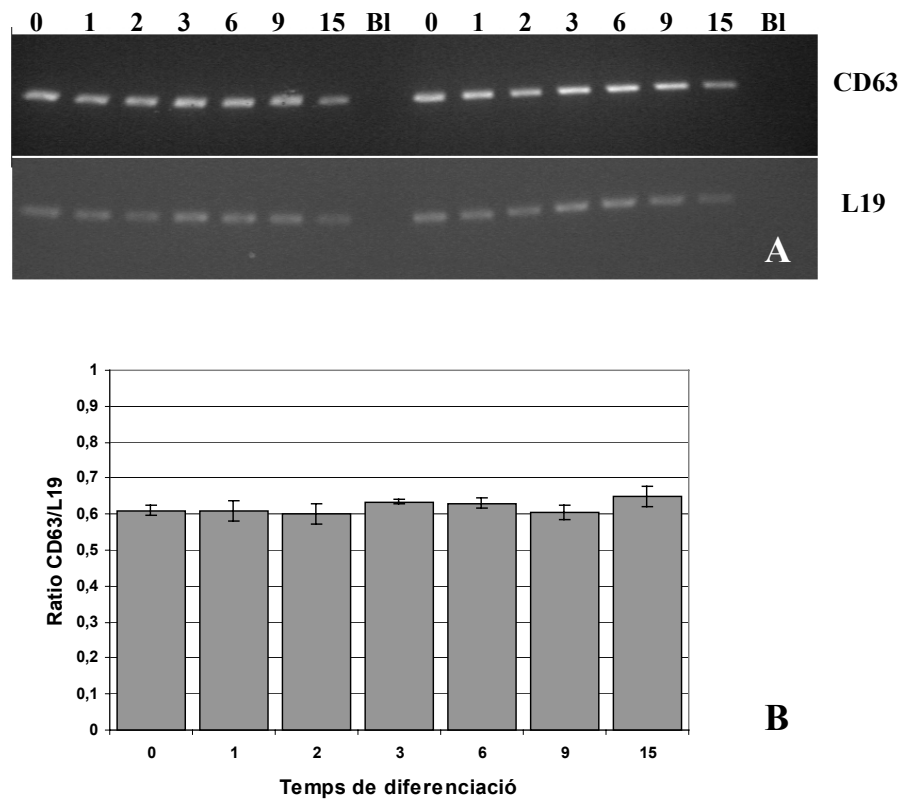


Figura 59 – Expressió de CD63 a la línia mioblàstica C2C12 en diferenciació. **A:** L'expressió de CD63 determinada per RT-PCR va donar lloc a una banda intensa, que ens va permetre observar la constància en l'expressió de CD63 durant la diferenciació de la línia C2C12. **B:** Histograma derivat de la densitometria de la RT-PCR. Els resultats van ser normalitzats utilitzant l'expressió de L19. Les determinacions es van fer a 0, 1, 2, 3, 6, 9 i 15 dies després de l'inici de la diferenciació. BL: blanc