

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**  
**FACULTAT DE MEDICINA**  
**UNIVERSITAT DE LLEIDA**

**EL PÈPTID RELACIONAT AMB EL GEN DE LA  
CALCITONINA (CGRP) I LA SEVA RELACIÓ AMB LA  
PLASTICITAT DEL SISTEMA NEUROMUSCULAR**

**Tesi presentada per Olga Tarabal Mostazo per tal d'accedir**

al



ia

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**  
**FACULTAT DE MEDICINA**  
**UNIVERSITAT DE LLEIDA**



Universitat de Lleida  
Registre General

- 3 MAIG 1996

E: 1928

S:



**EL PÈPTID RELACIONAT AMB EL GEN DE LA  
CALCITONINA (CGRP) I LA SEVA RELACIÓ AMB LA  
PLASTICITAT DEL SISTEMA NEUROMUSCULAR**

**Tesi presentada per Olga Tarabal Mostazo per tal d'accedir  
al grau de Doctora en Biologia**

*A l'Alex*

## AGRAÏMENTS

*Al Dr. Josep Enric Esquerda i al Dr. Jordi Calderó, professors del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de Lleida i directors d'aquesta tesi. Els hi voldria agrair el suport i els ànims que m'han donat en tot moment i que m'hagin transmès el seu entusiasme per la recerca. Gràcies per la vostra paciència i la vostra amistat.*

*Als companys de la Unitat de Recerca de Neurobiologia Cel·lular; al Joan Ribera per la seva col·laboració en la part d'aquest treball d'hibridació in situ, a la Dolors, la Neus, la Jeronia, la Victoria i molt especialment a l'Anna. El vostre ajut incondicional i la vostra amistat ha fet que el dia a dia sigui molt agradable. Espero poder compartir amb vosaltres moltes coses durant molts, molts anys.*

*Als companys de la Unitat de Recerca de Neurobiologia Molecular pel seu ajut en la part d'aquest treball de cultius cel·lulars i per la col·laboració que rebut en tot moment. Agraïxo especialment al Joan Comella, a la Rosa Soler i al Victor Yuste pel suport tècnic i pels seus suggeriments.*

*Als nostres tècnics de laboratori: Xavier Calomarde i Anna Ñaco, i al Ricard López. La vostra col·laboració ha estat molt important per poder finalitzar aquesta tesi. He disfrutat molt treballant amb vosaltres.*

*A l'Albert Sorribas per a la seva orientació i consells que han contribuït en l'anàlisi estadística d'aquest treball.*

*A tota la resta de companys del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, per fer que hagi bon ambient al laboratori.*

*Als meus pares i al meu germà, pel seu recolzament durant tots els anys que he estat estudiant.*

*A l'Alex, per animar-me en els moments difícils i per tot el que hem compartit.*



# ÍNDIX

## ABREVIATURES

|  |    |
|--|----|
| <b>I. OBJECTIUS</b>  | 1  |
| <b>II. INTRODUCCIÓ</b>   | 4  |
| <b>1. El pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP).</b>                | 5  |
| 1.1. Introducció.  | 5  |
| 1.2. Distribució del CGRP al sistema nerviós central (SCN).                        | 7  |
| 1.3. Distribució del CGRP al sistema nerviós perifèric (SNP) i al sistema endocrí. | 8  |
| 1.4. El CGRP en les motoneurones espinals.   | 9  |
| 1.4.1. Expressió i localització en el soma de les motoneurones.                    | 9  |
| 1.4.2. Transport.  | 10 |
| 1.4.3. Localització en els terminals nerviosos.                                    | 11 |
| 1.4.4. Alliberació.  | 12 |
| 1.4.5. Localització dels receptors del CGRP.                                       | 12 |
| 1.5. Funcions biològiques del CGRP al sistema neuromuscular.                       | 13 |
| 1.6. Regulació del CGRP durant el desenvolupament.                                 | 16 |
| 1.7. Regulació del CGRP en motoneurones lesionades.                                | 17 |
| 1.8. Regulació hormonal del CGRP.  | 20 |
| <b>2. Creixement dels nervis motors.</b>   | 21 |
| 2.1. Creixement nerviós fisiològic.  | 21 |
| 2.2. Creixement nerviós induït.  | 22 |
| 2.3. Inducció del creixement nerviós amb toxina botulínica (BoTx).                 | 26 |
| 2.4. Inducció del creixement nerviós amb factors neurotròfics.                     | 31 |
| 2.4.1. Factor neurotròfic ciliar (CNTF).   | 31 |
| 2.4.2. Factor de creixement de la insulina (IGF).                                  | 34 |
| 2.4.3. Factor de creixement fibroblàstic (FGF).                                    | 35 |
| 2.4.4. Neurotrofina 4 (NT-4).  | 36 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>II. MATERIAL I MÈTODES</b>   | <b>38</b> |
| <b>1. Experiments <i>in vivo</i></b>  | <b>39</b> |
| 1.1. Animals i anestèsia.   | 39        |
| 1.2. Aplicació exògena de productes.  | 39        |
| 1.2.1. Injecció de BoTx.  | 39        |
| 1.2.2. Injecció de CNTF.  | 40        |
| 1.2.3. Injecció de CGRP.  | 40        |
| 1.3. Axotomia del nervi ciàtic.   | 40        |
| 1.4. Traçat retrògrad de motoneurons.   | 41        |
| 1.4.1. Preparació dels traçadors.   | 41        |
| 1.4.2. Injecció dels traçadors.   | 41        |
| 1.5. Perfusió intracardíaca i obtenció dels teixits.  | 41        |
| 1.6. Tinció amb hematoxilina-eosina.  | 42        |
| 1.7. Immunohistoquímica.  | 44        |
| 1.7.1. Doble immunofluorescència en la medul·la espinal.  | 44        |
| 1.7.2. Immunofluorescència en els músculs soli, tibial anterior i gluti.  | 45        |
| 1.7.3. Immunohistoquímica pel mètode peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).   | 46        |
| 1.8. Impregnació argèntica dels terminals nerviosos intramusculars.   | 47        |
| 1.9. Hibridació <i>in situ</i> .  | 49        |
| 1.9.1. Extracció de les mostres.  | 49        |
| 1.9.2. Pretractament del teixit.  | 49        |
| 1.9.3. Hibridació.  | 50        |
| 1.9.4. Rentats estridents.  | 50        |
| 1.9.5. Detecció de la hibridació.   | 51        |
| 1.10. Quantificació dels resultats en les medul·les processades per immunofluorescència i per hibridació <i>in situ</i> . | 51        |
| 1.10.1. Microscopis, filtres i estàndards.  | 51        |
| 1.10.2. Mesures.  | 52        |
| 1.10.3. Processament de les dades i l'anàlisi estadística.  | 52        |
| 1.11. Valoració de la immunoreactivitat en el teixit muscular.  | 53        |

|   |    |
|---|----|
| 1.12. Material fotogràfic.  | 54 |
| <b>2. Experiments <i>in vitro</i></b>   | 54 |
| 2.1. Cultiu de motoneurons.   | 54 |
| 2.1.1. Purificació de les motoneurons.  | 54 |
| 2.1.2. Condicions de cultiu.  | 55 |
| 2.1.3. Preparació de l'extracte de múscul denervat (MEX).   | 56 |
| 2.2. Estudi de la supervivència.  | 56 |
| 2.3. Estudi del creixement neurític.  | 57 |
| <b>IV. RESULTATS</b>  | 58 |
| <b>1. Creixement dels terminals nerviosos i canvis en el contingut de CGRP de les motoneurons tractades amb BoTx.</b> | 59 |
| 1.1. Creixement dels terminals nerviosos.   | 59 |
| 1.2. Canvis en el CGRP del soma de les motoneurons induïts per la BoTx.   | 63 |
| 1.2.1. Traçat de les motoneurons.   | 63 |
| 1.2.2. Immunoreactivitat del CGRP en el soma de les motoneurons.  | 66 |
| 1.2.3. Expressió del CGRP en el soma de les motoneurons.  | 72 |
| 1.3. Canvis en el CGRP de les plaques motores induïts per la BoTx.  | 74 |
| <b>2. Canvis en el CGRP de les plaques motores després de l'axotomia del nervi ciàtic.</b>                            | 80 |
| <b>3. Canvis en el CGRP de les plaques motores durant el desenvolupament.</b>   | 82 |
| <b>4. Canvis en el CGRP de les plaques motores després del tractament amb CNTF.</b>                                   | 84 |
| <b>5. Efectes de l'aplicació exògena de CGRP sobre els terminals nerviosos en rates paralizades amb BoTx.</b>         | 88 |
| <b>6. Efectes del CGRP sobre la supervivència i el creixement neurític de motoneurons en cultiu.</b>                  | 89 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.1. Supervivència.  | 89  |
| 6.2. Creixement neurític.  | 90  |
| <b>V. DISCUSSIÓ</b>  | 94  |
| <b>1. Consideracions metodològiques.</b>   | 95  |
| 1.1. Traçat de les motoneurons.  | 95  |
| 1.2. Valoració de la immunoreactivitat al CGRP.  | 97  |
| <b>2. Regulació del CGRP i plasticitat sinàptica.</b>  | 97  |
| 2.1. Variacions en el contingut del CGRP de les motoneurons relacionades amb la inducció de creixement axonal reactiu (canvis plàstics a les sinapsis neuromusculars) provocats per la BoTx. | 97  |
| 2.2. Canvis del CGRP després de l'axotomia del nervi ciàtic.   | 105 |
| 2.3. Canvis del CGRP durant el desenvolupament.  | 105 |
| 2.4. Variacions del CGRP induïdes pel CNTF.  | 107 |
| <b>3. Efectes del CGRP exogen sobre el creixement axonal.</b>  | 109 |
| <b>III. CONCLUSIONS</b>  | 111 |
| <b>IV. BIBLIOGRAFIA</b>  | 115 |

## ABREVIATURES

|               |  |
|---------------|--|
| <b>Ach</b>    | Acetilcolina                                   |
| <b>AchE</b>   | Acetilcolinesterasa                            |
| <b>AchR</b>   | Receptor d'acetilcolina                        |
| <b>BDNF</b>   | Factor neurotròfic derivat del cervell         |
| <b>BGTX</b>   | Bungarotoxina                                  |
| <b>BoTx</b>   | Toxina botulínica                              |
| <b>BSA</b>    | Albumina de serum boví                         |
| <b>CCK</b>    | Colecistoquinina                               |
| <b>CGRP</b>   | Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina |
| <b>CNTF</b>   | Factor neurotròfic ciliar                      |
| <b>CTB</b>    | Subunitat B de la toxina colèrica              |
| <b>DAB</b>    | 3, 3'diaminobenzidina                          |
| <b>E</b>      | Dia embrionari                                 |
| <b>ECM</b>    | Matriu extracel·lular                          |
| <b>EDL</b>    | Extensor digitorum longus                      |
| <b>EDTA</b>   | Àcid etilendiaminotetracètic                   |
| <b>MEX</b>    | Extracte de múscul denervat                    |
| <b>ENK</b>    | Encefalina                                     |
| <b>EPP</b>    | Potencial de la placa motora                   |
| <b>IGF</b>    | Factor de creixement de la insulina            |
| <b>IGF-BP</b> | Proteïnes d'unió a IGF                         |
| <b>FITC</b>   | Isotiocianat de fluoresceïna                   |
| <b>FGF</b>    | Factor de creixement fibroblàstic              |
| <b>GAL</b>    | Galanina                                       |
| <b>GAP</b>    | Proteïnes associades al creixement             |
| <b>GHEBS</b>  | Tampó de dissecció                             |
| <b>LDCV</b>   | Vesícules de nucli dens                        |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>LD50</b>   | 50 dosis letals                           |
| <b>LSM</b>    | Microscopi confocal de rastreig per làser |
| <b>MEPP</b>   | Potencial miniatura de la placa motora    |
| <b>NGF</b>    | Factor de creixement neurotròfic          |
| <b>NGS</b>    | Serum normal de cabra                     |
| <b>NMS</b>    | Serum normal de ratolí                    |
| <b>NT</b>     | Neurotrofina                              |
| <b>P</b>      | Dia postnatal                             |
| <b>PAP</b>    | Complex peroxidasa antiperoxidasa         |
| <b>PB</b>     | Tampó fosfat                              |
| <b>PBS</b>    | Tampó fosfat salí                         |
| <b>SDS</b>    | Sulfat dodecil sòdic                      |
| <b>SNB</b>    | Nucli espinal bulbocavernós               |
| <b>SNC</b>    | Sistema nerviós central                   |
| <b>SNP</b>    | Sistema nerviós perifèric                 |
| <b>SOL</b>    | Soli                                      |
| <b>SOM</b>    | Somatostatina                             |
| <b>SP</b>     | Substància P                              |
| <b>SSC</b>    | Salí citrat estàndard                     |
| <b>SSV</b>    | Vesícules sinàptiques petites             |
| <b>TA</b>     | Tibial anterior                           |
| <b>Tc</b>     | (+) Tubocuranina                          |
| <b>TRITC</b>  | Isotiocianat de tetrametil rodamina       |
| <b>TTX</b>    | Tetradotoxina                             |
| <b>TX-100</b> | Tritó X-100                               |
| <b>VIP</b>    | Pèptid intestinal vasoactiu               |
| <b>WGA</b>    | Aglutinina de la llavor de blat           |

## **I. OBJECTIUS**

---

Malgrat que el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) es troba present en les motoneurones, la seva funció no és encara ben coneguda. No obstant, hi ha algunes evidències experimentals que relacionen aquest neuropèptid amb el processos de diferenciació i manteniment de les sinapsis neuromusculars.

Per tal de contribuir al coneixement del significat del CGRP com a agent mediador tròfic anterògrad i la seva relació amb la plasticitat neuronal, en aquest treball hem examinat el comportament del CGRP a les motoneurones en distintes situacions on s'indueixen canvis importants en el creixement dels terminals nerviosos i durant la remodelació de les sinapsis neuromusculars. Si en realitat el CGRP és un neuropèptid implicat en la plasticitat sinàptica dels nervis motors, la seva regulació es modificarà després de la inducció experimental del creixement dels terminals nerviosos. Amb aquesta finalitat s'ha induït la paràlisi muscular amb la toxina botulínica (BoTx), s'ha produït una lesió nerviosa mitjançant l'axotomia d'un nervi perifèric i s'ha realitzat un tractament amb el factor neurotròfic ciliar (CNTF). Per portar a terme aquests estudis s'han realitzat experiments tant *in vivo* com *in vitro* utilitzant tècniques morfològiques, immunocitoquímiques i d'hibridació *in situ*.

Els aspectes concrets abordats en aquest treball experimental han estat bàsicament:

- 1) L'estudi del curs temporal de l'aparició del CGRP durant el desenvolupament de les motoneurones.
- 2) L'avaluació dels canvis del CGRP en motoneurones després de dues manipulacions experimentals, l'axotomia mitjançant l'aixafament del nervi ciàtic i la paràlisi amb BoTx. A més, hem efectuat l'estudi paral·lel morfològic del creixement dels terminals nerviosos en rates paralizades amb BoTx.
- 3) L'anàlisi amb tècniques d'hibridació *in situ* dels canvis en l'expressió del CGRP en motoneurones de músculs paralizats.



4) L'estudi dels canvis en el CGRP dels terminals nerviosos de les motoneurons després de l'aplicació muscular d'un factor neurotròfic, el CNTF, que promou el creixement dels terminals motors.

5) Atès que la bibliografia prèvia relaciona el CGRP aplicat exògenament amb un efecte "antisprouting", és a dir, amb la inhibició del creixement axonal, nosaltres ens hem proposat d'analitzar *in vivo* i *in vitro* els efectes de l'aplicació exògena de CGRP en el nostre model experimental.

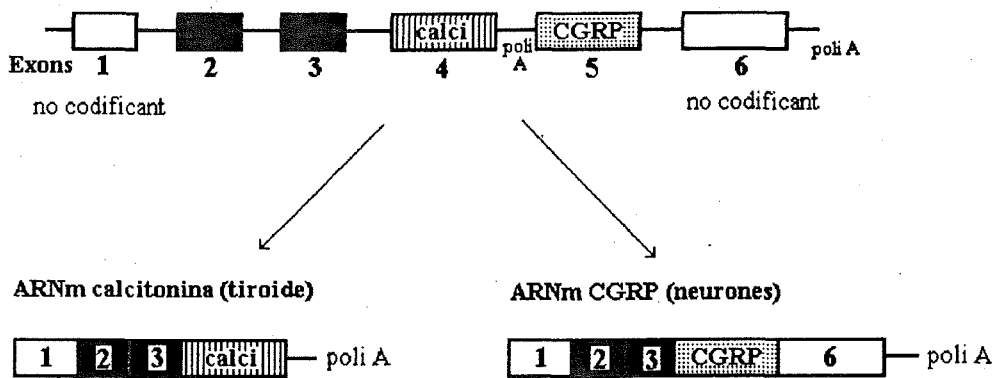
## **II. INTRODUCCIÓ**

---

# 1. EL PÈPTID RELACIONAT AMB EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP)

## 1.1. Introducció.


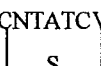
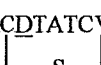
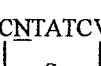
A principis dels anys vuitanta es va descobrir el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP). Els seus ARNm van ser aïllats per primera vegada d'un càncer de rata productori de calcitonina, similar a un carcinoma medul·lar de tiroide humana (Amara et al., 1982; Rosenfeld et al., 1983). El processament alternatiu del gen de la calcitonina dona dos productes diferents: l'hormona calcitonina que s'expressa preferentment a les cèl·lules C de la glàndula tiroide i el CGRP que predomina en el teixit nerviós. Aquest gen va ser un dels primers exemples coneguts amb un processament alternatiu dels transcrits primaris específic de teixit (Fig. 1).



**Fig. 1.** Estructura del gen calcitonina/CGRP de rata. Les línies i els rectangles representen els introns i els exons respectivament. Els rectangles 2 i 3 són les regions codificants comunes a la calcitonina i al CGRP. El rectangle 4 és l'exó específic de la calcitonina i el 5 és l'específic del CGRP (modificat de Roesser et al. 1993).

S'han descrit dos pèptids CGRP diferents però que mantenen una estreta homologia, són l' $\alpha$ -CGRP i el  $\beta$ -CGRP (Amara et al., 1985). Els dos pèptids estan formats per 37 aminoàcids i difereixen només en un aminoàcid a la rata i en tres a l'home. A causa de l'alta homologia que hi ha entre l' $\alpha$ -CGRP i el  $\beta$ -CGRP, molts dels anticossos utilitzats en estudis immunohistoquímics no poden diferenciar entre els dos pèptids. En altres espècies (porc,

pollastre, conill, etc.) no s'han aïllat encara variants intraespecífiques, però en tots els casos els pèptids aïllats estan formats per 37 aminoàcids i conserven el pont disulfur (Fig.2).

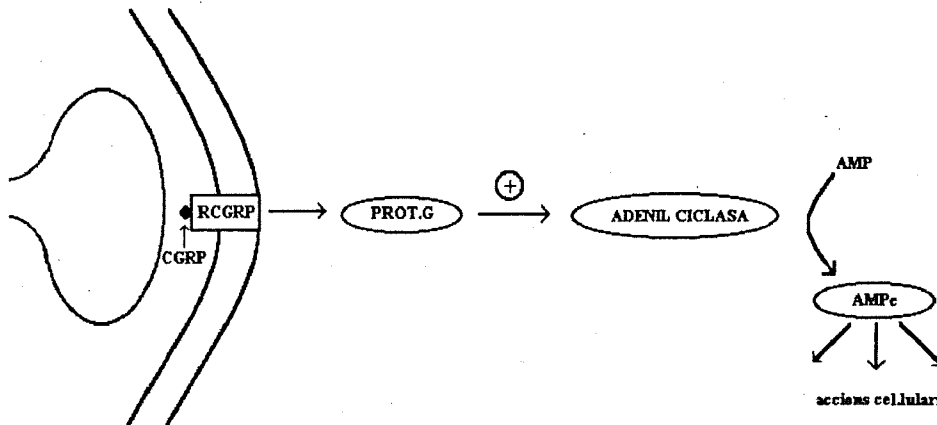
|   |                          |
|---|--------------------------|
| SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF- amida<br>               | $\beta$ -CGRP<br>(rata)  |
| SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF- amida<br>               | $\alpha$ -CGRP<br>(rata) |
| ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF- amida<br>               | $\beta$ -CGRP<br>(home)  |
| ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS <sup>N</sup> NFVPTNVGSKAF- amida<br> | $\alpha$ -CGRP<br>(home) |

**Fig. 2.** Seqüència d'aminoàcids del CGRP de l'home i de la rata. Els aminoàcids estan representats per un codi de lletra. Les diferències en les seqüències homòlogues de les formes  $\alpha$  i  $\beta$  s'indiquen subratllades (modificat de Goodman i Iversen, 1986).

L'amilina és un polipèptid de 37 aminoàcids que presenta entre el 40-50% d'homologia amb el CGRP, però que està codificat per un gen diferent. En canvi, la calcitonina procedent del mateix gen només presenta un 20% d'homologia amb el CGRP. De la mateixa manera que el CGRP, la seqüència d'aminoàcids de l'amilina varia poc entre diferents espècies de mamífers. L'amilina i el CGRP comparteixen algunes funcions biològiques comunes, com per exemple, la regulació del metabolisme de la glucosa (Cooper, 1994).

L'estructura del receptor del CGRP no ha estat determinada fins el moment, ja que encara no s'ha aconseguit el seu clonatge. S'ha considerat l'existència de diversos tipus de receptors, que es diferencien per la seva afinitat a agonistes (Dennis et al., 1989; Quirion et al., 1992). El receptor del CGRP és diferent del receptor de la calcitonina, però tant el CGRP com la calcitonina són capaços d'unir-se amb menys afinitat amb el receptor de l'altre. Això es pot explicar per les similituds entre els dos pèptids, el pont disulfur aminoterminal i el grup amida carboxiterminal. L'estimulació de receptors de CGRP en diferents cèl·lules i teixits

incrementa la concentració cel·lular d'AMPc i l'activitat adenil ciclase (Ishikawa et al., 1988; Laufer i Changeux, 1987). Així doncs, sembla ser que els receptors de CGRP desencadenen la seva acció cel·lular, com per exemple, la modificació de la permeabilitat de canals iònics, a través de proteïnes G. Aquestes, a la vegada, activen l'adenil ciclase i incrementen l'AMPc intracel·lular que actua com a segon missatger.



**Fig.3.** Mecanisme d'acció del CGRP. Es representa la cèl·lula presinàptica i la postsinàptica. El CGRP alliberat en el terminal nerviós s'uneix al seu receptor activant una proteïna G, que a la vegada estimula la síntesi d'AMPc a través de l'adenil ciclase. L'increment d'AMPc intervé en diferents accions cel·lulars.

## 1.2. Distribució del CGRP al sistema nerviós central (SNC).

Mitjançant tècniques immunohistoquímiques i d'hibridació *in situ* es van analitzar l'expressió i la distribució del pèptid CGRP (Rosenfeld et al., 1983; Kresse et al., 1992). La intensitat de la immunoreactivitat varia segons el tipus de població, i dins la mateixa població es troben cèl·lules amb intensitats variables.

També es van realitzar estudis de la localització dels receptors, en general, la distribució dels receptors es corresponia amb la immunoreactivitat del CGRP (Henke et al. 1985).

L'àmplia distribució del CGRP en el SNC fa suposar que és important en diverses funcions nervioses. Al cervell de mamífer s'hi ha localitzat en molts nuclis: el nucli ambigu, el nucli del nervi facial, el nucli del nervi hipoglòs, el nucli peripeduncular, el nucli parabrànquial,

etc. (Ronsenfeld et al., 1983). La distribució de la immunoreactivitat al CGRP en els cossos cel·lulars i en les fibres nervioses del cervell de rata va ser estudiada extensament per Kawai et al. (1985). També s'han trobat cèl·lules i fibres immunoreactives al CGRP en el cerebel: en les cèl·lules de Purkinje, en les fibres trepadores (aquestes només contenen CGRP de forma transitòria durant el desenvolupament) i en les cèl·lules del nucli de l'oliva inferior durant l'estadi perinatal (Kubota et al., 1987). A la medul·la espinal, concretament a la banya dorsal, són molt evidents les fibres positives al CGRP (Gibson et al. 1984). En moltes espècies estudiades, molts grups de motoneurons craneals i espinals són intensament reactives. En la zona toracolumbar de la medul·la espinal els grups de motoneurons immunoreactives s'ubiquen a la columna intermedilateral i intermedimedial, no obstant, a nivell lumbosacre només es troben a la columna intermedilateral (Rosenfeld et al., 1983; Gibson et al., 1984; Kruger et al., 1988).

### **1.3. Distribució del CGRP al sistema nerviós perifèric (SNP) i al sistema endocrí.**

Les fibres nervioses perifèriques contenen una important concentració de CGRP, en la innervació perivascular, en les vísceres, en el tracte gastrointestinal, en l'aparell respiratori, en l'epidermis, en els ulls, en els teixits orals i en la faringe, etc. En moltes d'aquestes fibres el CGRP coexisteix amb la substància P (SP).

Al gangli raquidi dorsal el CGRP està present en un gran nombre de neurones. Malgrat que el CGRP és més abundant en les cèl·lules petites, també s'ha demostrat la seva presència en les neurones mitjanes i grans. A partir d'aquestes cèl·lules es formen les fibres intensament immunoreactives que es troben a la banya dorsal de la medul·la espinal. Altres ganglis simpàtics i parasimpàtics també contenen cèl·lules immunoreactives amb diferents graus d'intensitat: el paraventral, el ciliar, el submandibular, el mientèric i el submucós de l'intestí, etc.

També, dins el sistema endocrí s'ha trobat cèl·lules immunoreactives en les cèl·lules parafoliculars de la glàndula tiroide, en la hipòfisis, en la medul·la adrenal i en els illots pancreàtics.

Entre els efectes biològics coneguts del CGRP destaca la regulació cardiovascular ja que és un potent vasodilatador. A més, inhibeix la secreció gàstrica, actua en el metabolisme glicídic i intervé en la neuromodulació sensorial (Ishida-Yamamoto i Tohyama, 1989).

#### **1.4. El CGRP en les motoneurons espinals.**

##### **1.4.1. Expressió i localització en el soma de les motoneurons.**

L'any 1984 Gibson et al. van fer un estudi exhaustiu de la distribució del CGRP en la medul·la espinal de diferents espècies. En la banya ventral de la majoria de les espècies que van estudiar hi havien neurones de mida gran que presentaven immunoreactivitat al CGRP. Aquestes descobertes suggerien que el CGRP estava present en motoneurons. Gràcies a la utilització d'un traçador retrògrad "True Blue" injectat dins el nervi ciàtic, van poder comprovar que la majoria de motoneurons en la medul·la espinal lumbar són immunoreactives al CGRP. Així i tot, les motoneurons positives són només una subpoblació del conjunt de motoneurons totals i la intensitat de l'immunomarcatge és heterogènia. La raó fisiològica d'aquesta heterogeneïtat es desconeix actualment.

Gibson et al. (1984) també van estudiar l'increment de la immunoreactivitat al CGRP després del tractament amb colquicina, un fàrmac que en alterar l'estructura dels microtúbuls inhibeix el transport axonal sense afectar la síntesi proteica. Aquest increment va fer suposar que el neuropèptid es sintetitzava en el soma neuronal. Efectivament, més endavant es va demostrar, mitjançant hibridació *in situ*, que el CGRP és sintetitzat en el soma de les motoneurons (Gibson et al., 1988; Rethelyi et al., 1989). Van observar també que en l'expressió del CGRP predomina la forma  $\alpha$  ( $\alpha$ -CGRP) sobre la  $\beta$  ( $\beta$ -CGRP).

La immunoreactivitat al CGRP, a nivell de microscòpia òptica, en el cos neuronal recorda una espècie de xarxa molt semblant al patró característic dels cossos de Nissl. La immunoreactivitat també va ser estudiada sota el microscopi electrònic (Sreit et al., 1989; Calderó et al., 1992) on van localitzar la immunoreactivitat en el complex de Golgi concretament associada a la membrana interna d'algunes cisternes de la regió trans. Aquestes cisternes immunoreactives estan envoltades de petites vesícules de 50-150 nm de diàmetre i

de cossos multivesiculars de 200-450 nm, totes immunoreactives al CGRP. Tanmateix, distribuïdes pel citoplasma es troben vesícules fortament marcades de 200-300 nm que semblen grànuls secretors. La localització ultraestructural de la distribució del pèptid suggereix una compartimentació específica en estructures tubulovesiculars que, connectades amb el complex de Golgi, formen una xarxa en el citoplasma neuronal. El patró de distribució podria estar relacionat amb la classificació i amb el repartiment del CGRP en vesícules secretores.

S'ha demostrat la colocalització del CGRP amb altres neuropèptids. La colecistoquinina (CCK) s'ha colocalitzat en una petita subpoblació de motoneurons adultes (Cortes et al., 1990). A més, s'han trobat motoneurons espinals durant el desenvolupament embrionari amb CGRP i somatostatina (SOM), o amb CGRP i pèptid intestinal vasoactiu (VIP) (Villar et al., 1988). Més endavant es va observar que motoneurons craneals contenien CGRP i galanina (GAL) (Moore, 1989), però en estudis més recents s'ha demostrat també la colocalització amb GAL en una subpoblació de motoneurons espinals (Johnson, 1992). És interessant la diferència que s'observa entre motoneurons CGRP positives i negatives respecte a les seves aferències sinàptiques. Segons Hietanen et al. (1990), només les motoneurons CGRP negatives reben terminals sinàptics que són immunoreactius per la encefalina (ENK), però tant les positives com les negatives reben aferències immunoreactives per l'SP. En les neurones sensorials s'ha visualitzat la presència de CGRP i d'SP en les mateixes cèl·lules, però en motoneurons no s'ha trobat SP.

#### **1.4.2. Transport.**

El CGRP és transportat des del soma de les motoneurons fins als terminals nerviosos (Kashihara et al., 1989; Böj et al., 1989; Raivich et al., 1992). Kashihara et al., (1989) van analitzar el CGRP endogen acumulat en el nervi ciàtic després de realitzar-li una lligadura. Quantificant el CGRP al costat proximal de la lligadura després de diferents dies de la lesió, van poder determinar la velocitat del transport axonal anterògrad del CGRP en fibres motores i sensorials. Van calcular que es transportava a una velocitat aproximada de 1 mm/h. També van observar un increment moderat en el costat distal de la lligadura, molt menys important



que en el costat proximal, suggerint que una petita proporció del CGRP axonal es transporta retrògradament.

#### **1.4.3. Localització en els terminals nerviosos.**

Amb tècniques de microscòpia electrònica es va localitzar ultraestructuralment el CGRP en els terminals nerviosos de granota. Mentre el CGRP a la granota es troba dins les vesícules grans amb nucli dens (LDCV), el transmissor clàssic, l'acetilcolina (Ach), es localitza en vesícules sinàptiques petites (SSV) (Matteoli et al., 1988). Els mateixos investigadors van tractar els terminals nerviosos amb  $\alpha$ -latrotoxina, una proteïna activa purificada del verí de la vídua negra, que indueix la depleció de l'Ach de les SSV, però no indueix la depleció paral·lela del CGRP de les LDCV. L'efecte de l' $\alpha$ -latrotoxina sobre les vesícules sinàptiques fa suposar que l'exocitosi de les dues poblacions vesiculars està mitjançada per dos mecanismes bioquímics distints, que podrien ésser diferencialment regulats per estímuls fisiològics.

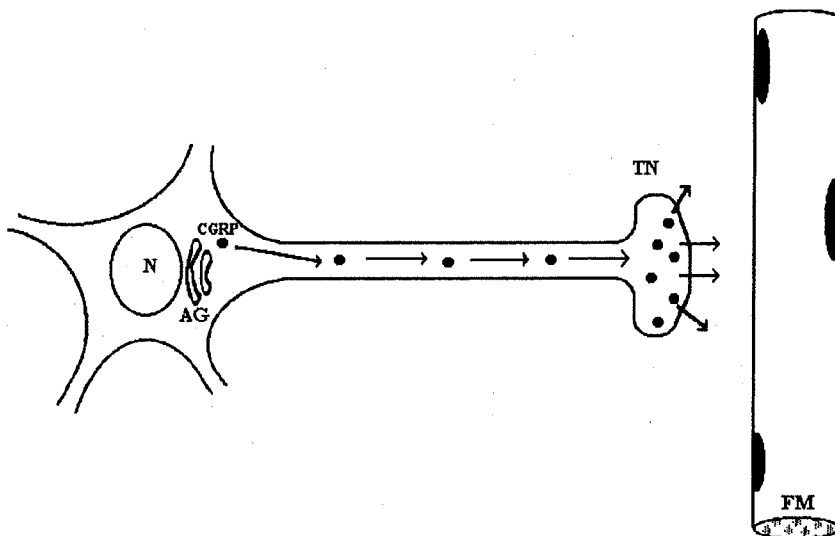
La presència del CGRP en les aferències sinàptiques nicotíniques de neurones postganglionars va ser determinada per Peng i Cheng (1988). Més endavant tot un conjunt d'estudis han demostrat la distribució del CGRP en les unions neuromusculars adultes de diferents músculs i espècies (Takami et al., 1985; Mora et al., 1989; Forsgren et al., 1992; Csillik et al., 1993; Forsgren et al., 1993). Malgrat la presència de plaques immunoreactives en alguns músculs, la majoria de músculs d'animals adults no manifesten positivitat al CGRP. El percentatge de plaques positives varia molt segons el tipus de múscul. Forsgren et al. (1993) van suggerir una relació entre la positivitat al CGRP i el tipus de fibres que formen els músculs. Un cop estudiades les diferències de reactivitat entre un múscul lent, el solí (SOL) i dos músculs ràpids, el tibial anterior (TA) i l'extensor digitorum longus (EDL), van observar que el múscul SOL pràcticament no presenta plaques immunoreactives, en canvi, el TA i l'EDL sí que en presenten. Entre els dos músculs ràpids, TA i EDL, també hi ha variacions en la immunoreactivitat, que podrien ser degudes a les variacions intramusculars pel que fa als tipus de fibres que presenten aquests dos músculs.

#### **1.4.4. Alliberació.**

Anys després, Uchida et al. (1990) van estudiar l'alliberació del CGRP en preparats de nervi frènic i d'hemidiafragma de rata. Si estimulaven elèctricament el nervi o afegien elevades concentracions de  $K^+$ , observaven alliberació de CGRP. L'alliberació era  $Ca^{2+}$  dependent, ja que només es produïa si no hi havia  $Ca^{2+}$  en el medi. Segons Sakaguchi et al. (1991), l'estimulació d'un nervi muscular amb la intensitat suficient per activar les fibres motores, no incrementa la quantitat de CGRP alliberat en el preparat de múscul. Amb microscòpia electrònica s'ha estudiat la disminució de la immunoreactivitat al CGRP en els terminals nerviosos després de l'estimulació del nervi ciàtic (Csillik et al., 1992). De tota manera, caldrien més estudis per conèixer els mecanismes de l'alliberació del CGRP en condicions fisiològiques.

#### **1.4.5. Localització dels receptors del CGRP.**

L'existència de llocs d'unió d'alta afinitat pel CGRP va ser demostrada en cultius de miotubs de pollastre mitjançant tècniques d'autoradiografia (Jennings i Mudge, 1989). La constant de dissociació d'aquests llocs d'unió és aproximadament de  $2-4 \times 10^{-10}$  i estan uniformement distribuïts en tota la superfície dels miotubs. A diferència dels receptors d'acetilcolina (AChR) que formen normalment agrupacions en cultius, els receptors del CGRP es distribueixen sense cap indicatiu d'agrupació. Per altra banda, el mateix any Popper i Micevych (1989a) van estudiar la distribució dels receptors al CGRP en el múscul. El patró observat amb tècniques d'autoradiografia es limita a una banda que coincideix amb la distribució de les plaques motores, les quals es van posar de manifest amb tècniques immunocitoquímiques i amb marcatge de l'acetilcolinesterasa (AChE).



**Fig. 4.** Es representa la síntesi, el transport i l'alliberació del CGRP en les motoneurons. El CGRP es sintetitza en el soma cel·lular, es transporta retrògradament al llarg de l'axó a l'interior de vesícules, s'acumula al terminal nerviós i es creu que s'allibera a l'espai sinàptic. (AG) Aparell de Golgi, (N) nucli, (TN) terminal nerviós, (FM) fibra muscular.

### 1.5. Funcions biològiques del CGRP al sistema neuromuscular.

Estudis realitzats durant els últims anys, suggereixen que el CGRP juga un paper molt important en la diferenciació i en el manteniment de les cèl·lules musculars i les seves sinapsis neuromusculars. Es creu que el CGRP actua com a neuromodulador i com a senyal tròfic anterògrad.

El CGRP produeix una acció en les sinapsis neuromusculars que no tenen conseqüències immediates (efectes a llarg termini). Hi ha d'altres accions que es manifesten més ràpidament (efectes a curt termini).

Efectes a llarg termini:

a) Estimulació de la síntesi i acumulació dels AchR en la superfície de miotubs de pollastre en cultiu (Fontaine et al., 1986; New i Mudge, 1986).

Està descrit que l' $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BGTX) s'uneix específicament als AchR. Després d'afegir CGRP i  $\alpha$ -BGTX marcada radioactivament als cultius de miotubs van

quantificar els AchR (Fontaine et al., 1986; New i Mudge, 1986). Van determinar que el CGRP produïa un increment de la síntesi d'aquest receptor.

La tetradotoxina (TTX) és una toxina que inhibeix l'activitat elèctrica dels miotubs i produeix un bloqueig dels canals de  $\text{Na}^+$  voltatge-depenents. Si s'afegeix a un cultiu de miotubs TTX també augmenta la síntesi d'AchR. S'ha observat que tractant simultàniament els cultius de miotubs amb CGRP i TTX es produeix un efecte additiu en l'increment de la síntesi de receptors. Aquests resultats suggereixen que el CGRP i la TTX regulen el nombre d'AchR per diferents vies, el CGRP ho fa per un mecanisme independent de l'activitat muscular. A més, Fontaine et al. (1987) van comprovar que després d'afegir CGRP als cultius, s'incrementaven els nivells d'ARN missatger de la subunitat  $\alpha$  de l'AchR.

b) Augment de l'acumulació d'AMPC en cultius de miotubs de pollastre com a conseqüència de l'estimulació de l'adenil ciclase després del tractament dels cultius amb CGRP. Es creu que l'AMPC actuaria com a segon missatger del CGRP que activaria factors de transcripció responsables de l'increment d'AchR (Laufer i Changeux, 1987).

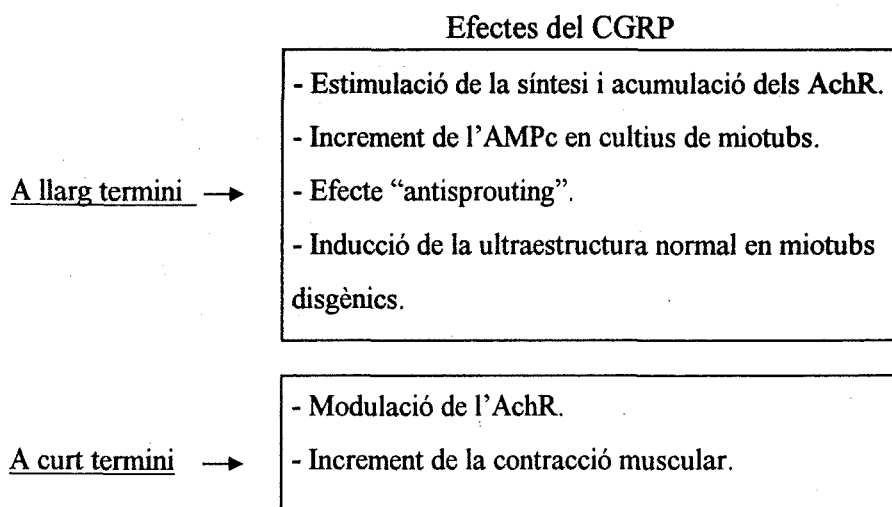
c) Regulació del creixement nerviós intramuscular actuant com un agent "antisprouting" (Tsujimoto i Kuno, 1988). La TTX, una toxina que bloqueja l'activitat muscular, sembla que produeix un creixement dels terminals nerviosos, també anomenat "sprouting". El tractament diari amb CGRP de rates paralitzades amb TTX, causa la inhibició dels "sprouts" terminals d'una forma dosi-depenent.

d) Inducció de l'ultraestructura normal de miotubs disgènics mdg/mdg (Garcia et al., 1990). Els cultius de miotubs disgènics, que provenen d'una mutació de ratolí, tenen una organització ultraestructural immadura i alteracions en l'activitat contràctil. Si aquests miotubs són tractats amb CGRP, es reestableix l'ultraestructura normal que inclou una organització en triades normals, en canvi, l'activitat contràctil no es recupera. Els autors suggereixen que el CGRP podria actuar com un factor tròfic necessari per a la maduració, l'estabilització i el manteniment de les interaccions cel·lulars en el sistema neuromuscular.

## Efectes a curt termini:

a) La regulació de la transmissió neuromuscular per modulació de l'AchR (Eusebi et al., 1988; Mülle et al., 1988; Miles et al., 1989; ). S'ha vist que en miotubs primaris de rata el CGRP és capaç d'incrementar la fosforilació de les subunitats  $\alpha$  i  $\delta$  de l'AchR. Els efectes del CGRP i la forskolina, un activador de l'adenil ciclase, en la fosforilació del AchR no són additius, suggerint que el CGRP i la forskolina utilitzen el mateix mecanisme bioquímic per aconseguir la fosforilació del receptor. Per tot això, en presència de CGRP, la fosforilació i la conseqüent desensibilització de l'AchR sembla estar mitjançada per un increment en els nivells d'AMPc, que provocaria una activació d'una proteïna quinasa dependent d'AMPc. A més, Lu et al. (1993) van determinar que en plaques motores durant el desenvolupament el CGRP prolonga el temps d'apertura dels canals dels AchRs.

b) Augment de la contracció muscular induïda a través del nervi o per estimulació directa (Takami et al., 1985). En una preparació de diafragma i nervi frènic, la contracció muscular va ser analitzada després d'estimular elèctricament el nervi o bé després d'estimular directament el múscul. Es va poder determinar que l'efecte del CGRP en la musculatura estriada no està mitjançat pels receptors nicotínics, ja que la (+) tubocuranina (Tc), una toxina que s'uneix a l'AchR i inhibeix l'acció de l'Ach, no bloqueja l'increment de la contracció durant l'estimulació directa. Els mateixos resultats van ser obtinguts en estudis *in vivo*.



Taula 1.

## 1.6. Regulació del CGRP durant el desenvolupament:

S'ha suggerit que el CGRP podria tenir un paper important durant la formació i la maduració de les sinapsis neuromusculars. Diferents autors han demostrat que l'inici de l'expressió del CGRP es produeix durant el desenvolupament, coincidint amb la maduració de les plaques motores.

En el pollastre el CGRP es detecta en el soma de les motoneurons entre els dies embrionaris E7-E9, i arriba als nivells màxims entre E12-16, posteriorment disminueix fins a uns nivells que es mantenen després del naixement. Tanmateix, a E14 ja es detecta CGRP a les plaques motores (New and Mudge, 1986; Fontaine et al., 1986; Villar et al., 1988, 1989; Esquerda et al., 1989). En la rata es comença a observar en el soma a E15 però els màxims es troben tant al soma com a les plaques durant la primera setmana postnatal. Segueix amb una recuperació gradual quan les plaques motores passen a tenir les característiques de les plaques ja madures (Marti et al., 1987; Matteoli et al., 1990; Li and Dahlström, 1992, 1993; Andreose et al., 1994). En la majoria de plaques motores de músculs adults no s'hi troba CGRP. En la rata l'increment és posterior que en el pollastre ja que la sinaptogènesi i la maduració de les plaques es produeixen en etapes posteriors del desenvolupament.

L'administració a embrions de pollastre de Tc, un agent bloquejador de la transmissió sinàptica que augmenta la supervivència durant el període de mort fisiològica, no interfereix en l'expressió primerenca de CGRP a E10 (Mason and Mudge, 1992). Curiosament, la Tc aboleix totalment el CGRP en etapes posteriors del desenvolupament, entre E14-E16. És probable que l'absència d'immunoreactivitat al CGRP en els animals tractats amb Tc, reflecteixi un increment en l'ús perifèric del CGRP com a conseqüència de la inducció d'acumulació d'AchR i la concomitant formació de sinapsis neuromusculars (Esquerda et al., 1989).

Durant el desenvolupament també es van analitzar els canvis de les LDCV en les plaques motores de rata. Van observar que es produïa un augment en la proporció d'LDCV durant el desenvolupament, en canvi, en les plaques adultes les observaven en molt baixa proporció (Pécot-Dechavassine i Brouard, 1993). La coincidència durant el desenvolupament

de l'increment de les LDCV i dels nivells de CGRP està correlacionat amb els estudis realitzats per Matteoli et al. (1988). Aquests autors van localitzar el CGRP a l'interior d'aquestes vesícules en plaques motores de granota, però fins ara no s'ha demostrat la presència a les plaques motores d'altres espècies.

### **1.7. Regulació del CGRP en motoneurons lesionades**

Després d'una lesió en un nervi perifèric es produeixen un conjunt de canvis moleculars i estructurals que condueixen a un procés regeneratiu per tal de reparar els axons danyats. En conjunt, aquests canvis que es produeixen en el cos cel·lular després de la lesió són anomenats cromatolisi, "resposta axonal" o "reacció retrògrada" (Lieberman, 1971). Morfològicament, les manifestacions més importants són l'inflament del cos cel·lular, el desplaçament perifèric del nucli, i la disminució de la grandària i de la intensitat de la tinció dels grànuls citoplasmàtics basofílics (cossos de Nissl) degut a la desorganització i dispersió del reticle endoplasmàtic rugós (cromatolisi). Bioquímicament, s'incrementa la síntesi d'algunes proteïnes citoesquelètiques (tubulina i actina). A més, apareixen proteïnes associades al creixement nerviós (GAP-43) (Skene, 1992), en canvi, disminueixen els enzims relacionats amb el metabolisme i la síntesi de neurotransmissors.

Estudis recents han demostrat que es produeix un increment de CGRP en motoneurons craneals i espinals després de l'axotomia de nervis perifèrics (Streit et al. 1989; Arvidson et al., 1990; Dumoulin et al., 1991; Calderó et al., 1992; Taquet et al., 1992; Borke et al., 1993 i Piehl et al., 1993b; Wang et al., 1993). Van observar que els increments en la immunoreactivitat al CGRP, estan acompanyats per increments en els nivells d'ARNm, però únicament augmenten els nivells d' $\alpha$ -CGRP mentre que els nivells de  $\beta$ -CGRP no es modifiquen (Haas et al., 1990; Saika et al., 1991). L'expressió de CGRP és clarament bifàsica (Dumoulin, 1991; Borke et al., 1993; Grothe, 1993): hi ha una primera pujada poc després de la lesió, seguida d'un segon pic més important. Posteriorment hi ha una disminució gradual del CGRP, coincidint amb la recuperació morfològica i funcional de la innervació motora. El temps de recuperació depèn del tipus de lesió produïda; si es realitza una agressió més forta (denervació, impeding la reinnervació) la recuperació es més lenta que si es realitza una lesió

menys important (aixafament, amb posterior reinnervació). No obstant, la reinnervació funcional no és un requisit per a la recuperació dels nivells normals de CGRP (Calderó et al., 1992).

Molt recentment s'han investigat les implicacions dels factors tròfics de la família del factor de creixement fibroblàstic (FGF) en l'increment de l'expressió de CGRP després de l'axotomia (Piehl et al., 1995). Als tres dies de realitzar una axotomia del nervi ciàtic i d'injectar FGF, s'inhibeixen els increments d' $\alpha$ -CGRP que es produeixen normalment en motoneurons axotomitzades. Tanmateix, el tractament amb FGF de cultius de motoneurons redueix l'expressió basal de CGRP. Aquests resultats indiquen que l'FGF té una influència reguladora negativa que contraresta part dels efectes de l'axotomia, i fan suposar que els membres de la família FGF presents en el múscul esquelètic ofereixen a les motoneurons suport tròfic derivat de la diana. Els mateixos autors (Piehl et al., 1995) van estudiar els efectes del factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) sobre el CGRP de motoneurons axotomitzades i van determinar que els efectes d'aquest factor són poc importants comparats amb els de l'FGF.

Els increments de CGRP en motoneurons després de l'axotomia corresponen a un intens marcatge nuclear de c-jun, un factor de transcripció primerenca. L'estreta relació temporal i espacial entre l'expressió de c-jun i del CGRP suggereix que el c-jun podria estar involucrat en el control transcripcional de gens que codifiquen el CGRP en neurones lesionades (Herdegen et al., 1993).

La transecció crònica de la medul·la espinal, tant a la rata com al gat, provoca un important decrement en els nivells de CGRP en motoneurons situades per sota de la lesió (Arvidsson, 1989; Marlier et al., 1990; Li et al., 1992 i Melinek et al., 1994). En els gats, als qual se'ls ha realitzat una transecció de la medul·la espinal, i a la vegada una rizotomia unilateral de totes les arrels dorsals per sota de la transecció, el CGRP en les motoneurons dels segments lesionats és aparentment normal i contenen la mateixa quantitat de CGRP que els animals no lesionats. Es pot considerar que el CGRP en motoneurons pot estar influenciat diferencialment pels aferents descendents i pels perifèrics. S'ha postulat que en



condicions normals hi ha un equilibri entre l'efecte positiu produït en les motoneurons per la innervació descendent i l'efecte negatiu que arriba de les dianes perifèriques, el múscul esquelètic. Aquest equilibri es trenca per la desconexió de les motoneurons de les seves dianes després de l'axotomia, i com a conseqüència s'incrementa l'expressió de CGRP (Arvidsson et al., 1989). D'altra banda, estudis molt recents han demostrat que motoneurons preganglionars parasimpàtiques que en condicions normals no expressen CGRP poden arribar a fer-ho. Si es realitza una anastomosi creuada del nervi hipoglòs i del nervi vague cervical de rata, es veu que les motoneurons vagals creixen fins a innervar la musculatura de la llengua (que en condicions fisiològiques està innervada pel nervi hipoglòs). Aquestes motoneurons vagals que acaben innervant la llengua expressen CGRP, en canvi, les motoneurons vagals que es seccionen i es lliguen amb el seu corresponent extrem distal no presenten CGRP, demostrant que la inducció de l'expressió de CGRP no és una conseqüència de la secció del nervi per si mateixa. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de CGRP en les motoneurons no depèn únicament de les seves aferències, ja que també sembla estar influïda per l'òrgan diana. Un senyal produït pel múscul que es transporta retrògradament a través dels axons podria ser l'inductor dels canvis en l'expressió del CGRP de les motoneurons (McWilliam et al., 1995).

A més de les alteracions produïdes en l'expressió gènica, en el metabolisme i en l'estructura del soma de motoneurons lesionades, també es produeix una reacció glial perineuronal que es creu que podria afavorir la regeneració neuronal. S'ha suggerit que les cèl·lules glials perineuronals podrien ser les dianes primàries del CGRP neuronal i que aquest actuaria com a missatger de les interaccions neurona-glia. Experiments realitzats *in vitro* recolzen aquesta idea. S'ha descrit que l'addició de CGRP en cultius primaris de cervell de rata neonatal, produeixen canvis morfològics ràpids en astròcits, i són canvis molt semblants als que es produeixen en tractar els cultius amb AMPc (Lazar et al., 1991). A més, s'ha observat que el CGRP estimula l'acumulació d'AMPc en astròcits cultivats i també incrementa l'expressió de gens de resposta primerenca; c-fos, jun-B però no c-jun (Haas et al., 1991a, b). Aquestes dades fan suposar que l'AMPc podria actuar com a segon missatger activant els

gens d'expressió primerenca, que a la vegada estimularien la síntesi d'altres gens diana desconeguts fins ara.

Les cèl·lules de Schwann probablement són dianes del CGRP procedent de les neurites regenerants. La immunoreactivitat al CGRP es concentra en els extrems de les neurites en creixement que interactuen amb cèl·lules de Schwann adjacents durant la regeneració. L'axotomia del nervi ciàtic també provoca un increment de llocs d'unió pel CGRP en la part distal i denervada del nervi, suggerint una acció local del CGRP sobre les cèl·lules de Schwann (Raivich et al., 1992). Es també conegut que l'addició de CGRP en cultius de cèl·lules de Schwann provoca un increment d'AMPc en aquestes cèl·lules (Mudge et al., 1991).

Contràriament als increments de CGRP trobats en motoneurons després de l'axotomia, en el gangli dorsal sensorial s'observa una disminució en el contingut de CGRP (Dumoulin et al., 1991). És probable que aquesta disminució en neurones sensorials estigui produïda per la privació d'un factor tròfic de la perifèria i aquest podria ésser el factor de creixement neurotròfic (NGF). Cal esmentar que l'NGF indueix l'expressió de CGRP en cultius de neurones sensorials (Lindsay i Harmar, 1989).

### **1.8. Regulació hormonal del CGRP.**

L'expressió de CGRP en nuclis motors amb dimorfisme sexual està regulada per androgens, per exemple en el nucli espinal bulbocavernós (SNB) que innerva el múscul estriat bulbocavernós del penis. En animals postnats, l'aparició de CGRP a l'SNB està retardada respecte altres motoneurons de la medul·la espinal lumbar. A més, els mascles tenen un percentatge d'immunoreactivitat en aquestes motoneurons més elevat que les femelles (Forger et al., 1993). D'altra banda, en la rata adulta una reducció dels androgens circulants, com a resultat d'una castració, produeix un fort increment de l'ARNm i de la immunoreactivitat al CGRP. Si les mateixes rates castrades es tracten amb testosterona durant 4 setmanes, els nivells de CGRP disminueixen fins a valors similars als animals control. Es pot considerar, doncs, que en rates adultes l'estimulació andrògena inhibeix l'expressió de CGRP en motoneurons de l'SNB (Popper i Micevych, 1989b, 1990; Popper et al., 1992). En

contrast, la castració en el ratolí redueix el nombre de motoneurons de l'SNB positives al CGRP (Wagner et al., 1994). Actualment, per tot això, no està encara ben aclarida la funció dels androgens sobre l'expressió del CGRP. De fet, sembla que exerceixen accions antagòniques durant el desenvolupament i en l'animal adult. No obstant, podria ser que els androgens tinguessin una doble funció: primer augmentar la síntesi de factors reguladors del desenvolupament que promouen la inducció de CGRP, i més endavant, en músculs madurs, actuar com a factors supressors de la síntesi del CGRP.

## 2. CREIXEMENT DELS NERVIS MOTORS

### 2.1. Creixement nerviós fisiològic.

En condicions fisiològiques, les relacions entre els terminals de les motoneurons i les fibres musculars que innerven semblen ser relativament estables. Hi ha evidències que els terminals són cada vegada més elaborats quan els animals van incrementant l'edat. Estudis morfològics han demostrat que en situacions normals es pot produir creixement axonal (brots nerviosos), també anomenat "sprouting", és a dir, els terminals nerviosos s'estenen i són capaços d'originar nous contactes sinàptics. S'han investigat els canvis que es donen en els terminals quan els animals van incrementant l'edat: s'incrementa el nombre de fibres musculars innervades per més d'un axó, i també s'incrementa la longitud total i la complexitat dels terminals (Wernig i Herrera, 1986).

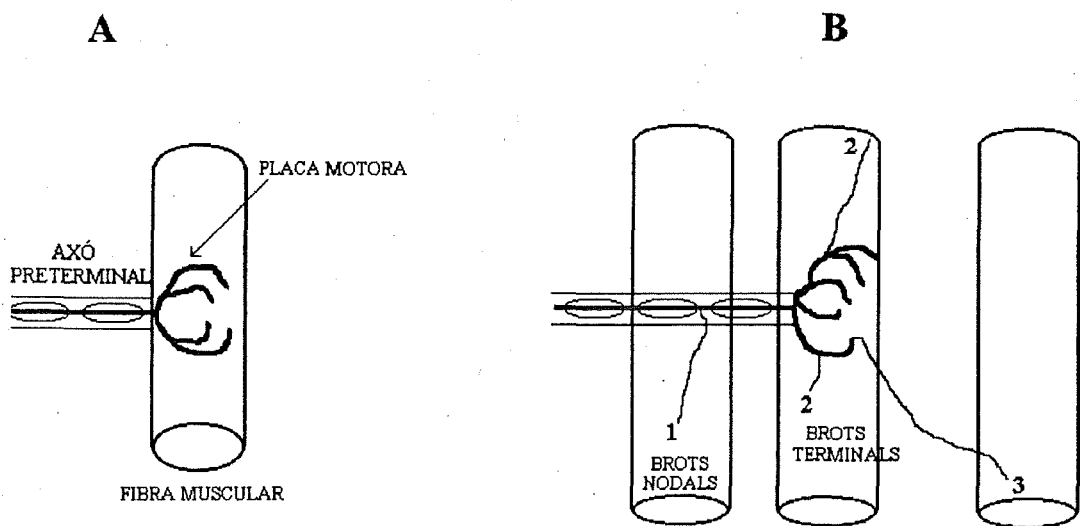
Recentment s'ha pogut fer un seguiment *in vivo* de l'evolució de les plaques motores de mamífer en diferents períodes de la vida de l'animal adult (Wigston, 1989). Realitzant un marcatge fluorescent amb  $\alpha$ -BGTX en animals vius i intactes es van poder localitzar les plaques motores. Aproximadament un 44% de sinapsis neuromusculars canviaven la forma en un període de 6 mesos. A més, la proporció de canvis en les sinapsis depenia del tipus de múscul.

Estudis realitzats amb el microscopi electrònic han demostrat en músculs normalment innervats la presència de plecsecundaris sinàptics abandonats que no conserven els elements presinàptics, però sí els plecsecundaris i AchE. No s'han descrit processos de degeneració

dels terminals, per tant, és més probable que les sinapsis quedin abandonades per retracció que per degeneració. Totes aquestes observacions reforcen la idea que les sinapsis neuromusculars no són estructures estàtiques, sinó que estan remodelant-se contínuament (Wernig et al., 1984). La remodelació inclou la retracció dels terminals nerviosos, la formació de brots, la reocupació d'antics contactes sinàptics i la formació de nous contactes (Wernig i Herrera, 1986).

## 2.2. Creixement nerviós induït.

En certes condicions es pot induir el rebrot dels terminals nerviosos, els axons comencen a créixer i són capaços d'innervar les fibres musculars veïnes. Els brots poden sorgir dels nòduls de Ranvier (brots colaterals o nodals) o del terminals nerviosos no mielinitzats (brots terminals) (Fig. 5). El creixement nerviós induït ha estat investigat per molts autors en diferents tipus d'experiments: després de la denervació parcial (quan únicament alguns axons que innerven un múscul són interromputs) i després del bloqueig farmacològic de l'activitat nervi-múscul (Ironton et al., 1978; Brown et al. 1981).



**Fig. 5.** Representació d'un terminal nerviós normal (A) i d'un terminal nerviós després de la inducció de brots nerviosos (B). En B s'indiquen els brots nodals que s'originen a partir d'un nòdul de Ranvier (1) i els brots terminals que emergeixen a partir de l'arborització terminal (2 i 3). Aquests brots terminals poden créixer en la mateixa fibra muscular (2) o poden dirigir-se cap a fibres musculars veïnes.

Alguns dels primers investigadors que van treballar en el creixement dels nervis motors van ser Edds (1949, 1950, 1953) i Hoffman et al. (1950). Van observar que després de varies setmanes de la denervació parcial d'un múscul es produïa una recuperació completa o gairebé completa de la tensió, tot i amb l'absència de la reinnervació per part dels axons lesionats. Utilitzant per tenir els nervis impregnacions d'or, van demostrar la presència de nervis fins que sorgien dels nòduls de Ranvier dels axons intactes, els brots nodals. Tanmateix, van demostrar el creixement de fines extensions en les branques de terminals intactes, els brots terminals, els dos tipus de brots innervaran les fibres musculars prèviament denervades. No tots els nòduls de Ranvier produeixen rebrots, únicament els intramusculars que es troben més pròxims a les plaques motores denervades. Aquests brots creixen i s'expandeixen dins la làmina basal de les cèl·lules de Schwann procedents dels axons que havien estat prèviament denervats. El mecanisme pel qual els brots nodals arriben a la beina perineural vacant és encara desconegut. Molts dels rebrots terminals que es formen finalitzen en les antigues plaques motores denervades (Brown i Ironton, 1978), però en molts músculs també és comuna la formació de noves plaques motores ubicades en altres zones de les fibres musculars.

La recuperació de la tensió en músculs parcialment denervats depèn del tipus de múscul: en els músculs ràpids la recuperació s'inicia als 6-7 dies de la denervació, en els músculs lents l'inici de la recuperació es retarda algun dia. Tant els brots nodals com els terminals, en un principi no estan mielinitzats, però arriba un moment en què es mielinitzen. A llarg termini els terminals que no formen plaques motores desapareixen, però el procés de desaparició és encara desconegut. Aquest procés es creu que podria ser similar al que es produeix després del naixement en fibres musculars de mamífers, durant l'eliminació de la innervació múltiple, mitjançant processos de degeneració i retracció. És més probable que el fenomen d'eliminació dels brots sigui produït per retracció.

Els canvis induïts en el múscul després d'una denervació parcial podrien incloure la producció per part del múscul d'un factor estimulant dels brots nerviosos. Un dels factors inductors del rebrot nerviós podria ser el factor de creixement de la insulina (IGF); és conegut que es produeix un increment dels seus ARNm al múscul esquelètic després de la denervació

muscular (Ishii, 1989). D'altra banda, el senyal inductor no afecta per igual a totes les motoneurons, ja que una proporció de terminals no formen brots (Betz et al., 1980). S'ha observat que es pot prevenir o revertir els canvis induïts per la denervació parcial (Brown i Ironton, 1977a) i per la paràlisi amb toxina botulínica (BoTx) (Brown et al. 1977) mitjançant l'estimulació elèctrica directa del múscul. En aquestes circumstàncies els brots queden inhibits.

Hi ha manipulacions farmacològiques que redueixen o aboleixen l'activitat muscular i provoquen una denervació muscular funcional, tot i presevar les estructures histològiques. Aquests tòxics o fàrmacs que indueixen el rebrot nerviós inclouen:

a) El bloqueig presinàptic amb BoTx (Duchen i Strich, 1968).

b) El bloqueig de la conducció nerviosa amb TTX (Brown i Ironton, 1977b; Diaz i Pécot-Dechavassine, 1989).

c) El bloqueig postsinàptic amb  $\alpha$ -BGTX (Holland i Brown, 1980). Es va utilitzar per a poder descartar que en les manipulacions es redueixi el transport o l'alliberació de substàncies involucrades en el control de la formació de brots. L' $\alpha$ -BGTX és un blocador postsinàptic que no afecta el transport axonal ni els mecanismes presinàptics de l'alliberació.

d) La inhibició de la contracció muscular amb formamida, un agent farmacològic que produeix un desacoblament entre l'estímul i la contracció muscular però que no bloqueja la transmissió presinàptica o postsinàptica ni el potencial d'acció de la fibra muscular. S'indueix la formació de brots nerviosos per la inhibició de la contracció muscular, sense produir alteracions de les propietats electrofisiològiques dels axons, però la freqüència de formació de brots és menys important que amb els mètodes comentats anteriorment. Aquests resultats han suggerit que la inactivitat contràctil contribuiria només parcialment en la inducció del rebrot nerviós (Wines i Letinsky, 1988).

És molt probable que el múscul inactiu provoqui d'alguna manera l'estimulació de la formació de brots. La naturalesa d'aquest estímul no és encara coneguda, però hi ha diverses hipòtesis: a) una disminució en l'alliberació d'un agent inhibidor dels brots que normalment el

produiria el múscul actiu, b) un canvi en la superfície muscular que facilitaria el creixement nerviós, i c) l'alliberació d'un factor per part del múscul que afavoriria el creixement nerviós. D'altra banda, el creixement d'axons després de l'aixafament o transecció d'un nervi, òbviament no és una resposta a un estímul procedent del teixit denervat (el múscul esquelètic), perquè les distàncies entre les cèl·lules productores del factor i l'extrem proximal del nervi lesionat són excessivament grans. Probablement en aquests casos el creixement requereix algun factor o alguna substància present en les cèl·lules d'Schwann del mateix nervi lesionat.

En condicions normals la distribució i la forma del terminal nerviós és similar a la de matriu extracel·lular sinàptica (ECM). Si s'indueix la formació de brots nerviosos s'observen zones on l'ECM és més extensa que el terminal nerviós; en aquestes zones tampoc es troba AchE ni plecs postsinàptics. L'absència d'aquestes especialitzacions postsinàptiques en les regions d'ECM fa improbable que abans estiguessin ocupades per terminals amb posterior retracció. Aquests resultats suggereixen que l'ECM precedeix al creixement dels terminals nerviosos i que podria tenir un paper important en la remodelació sinàptica (Chen i Ko, 1994).

Estudis molt recents han demostrat que la implantació de cèl·lules de Schwann indueix en músculs innervats el rebrot nerviós (Son i Thompson, 1995). Van determinar que els brots terminals estan associats a l'extensió de processos de les cèl·lules de Schwann. Es pensa que aquests processos actuen com a guia dels axons que estan en creixement.

La implantació d'un segment de nervi perifèric en un múscul de granota normal indueix la formació de brots en els terminals nerviosos i en els nòduls de Ranvier del múscul. El rebrot nerviós es produeix en zones properes al nervi implantat, però amb el temps s'incrementa la distància en la qual la implantació del nervi produeix aquests efectes. A més, els brots tendeixen a dirigir-se cap al nervi implantat, i fins i tot poden arribar a fer contacte amb ell (Diaz i Pécot-Dechavassine, 1990). Aquestes investigacions suggereixen que podria existir un factor difusible, alliberat per les cèl·lules glials, inductor del rebrot nerviós.

Curiosament, després de realitzar una denervació d'un múscul de granota s'observa creixement nerviós en el múscul homòleg intacte del costat contralateral. S'ha suggerit que la denervació inicia un senyal de creixement nerviós en les motoneurons lesionades que és transferida transneuronalment a través de la medul·la espinal fins a les motoneurons intactes, on s'estimula la formació de brots (Rosthenker, 1978). En mamífers també s'ha detectat aquest efecte contralateral i s'ha determinat que el temps que tarda el nervi contralateral en produir brots és menor com més a prop de la medul·la espinal es realitza la denervació (Rotshenker i Tal, 1985).

### **2.3. Inducció de creixement nerviós amb toxina botulínica (BoTx).**

El bacteri anaerobi *Clostridium botulinum* produeix la BoTx, una de les toxines més potents fins ara conegudes. Aquesta neurotoxina és totalment neuroespecífica i actua sobre les unions neuromusculars inhibint l'alliberació de l'Ach (Simpson, 1981). Hi ha set tipus diferents de BoTx (des de la A fins a la G) que actuen sobre dianes específiques involucrades en el procés de la transmissió sinàptica. Són proteïnases que depenen de  $Zn^{2+}$  i que es sintetitzen com a proteïnes d'una única cadena (150 kDa) que posteriorment s'escindeixen en dues. Les dos cadenes polipeptídiques estan unides per un pont disulfur i per unions no covalents (Montecucco i Schiavo, 1993). La cadena pesada (H, 100 kDa) està involucrada en la unió de la toxina a la membrana presinàptica i en la penetració a l'interior del terminal nerviós, mentre que la cadena lleugera (L, 50 kDa) té l'activitat proteolítica que bloqueja l'exocitosi. Recentment s'ha demostrat que BoTx/B, /D i /F s'uneixen específicament a la sinaptobrevina, una proteïna localitzada a les vesícules sinàptiques (Schiavo et al., 1992). D'altra banda, BoTx/A i /E s'uneixen a l'SNAP-25, una proteïna localitzada a la membrana plasmàtica (Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1993a, 1993b). L'SNAP-25 i la sinaptobrevina es pensa que formen un complex proteic que permet l'acoblament i la fusió de les vesícules sinàptiques en la membrana plasmàtica.



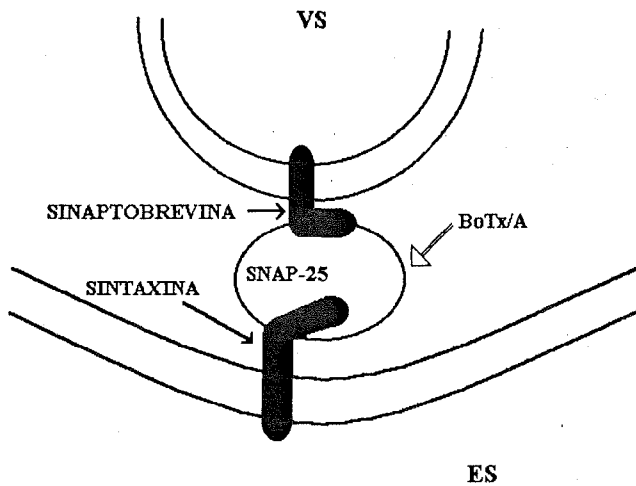


Fig. 6. Esquema d'algunes de les proteïnes involucrades en la fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica. Es mostra la proteïna diana de la BoTx/A, que és l'SNAP-25. L'activitat endopeptidasa de la neurotoxina produeix el bloqueig de l'exocitosi dels neurotransmissors. (ES) espai sinàptic, (VS) vesícula sinàptica (modificat de Montecucco i Schiavo, 1993).

La BoTx produeix importants efectes presinàptics en les unions neuromusculars. És ben coneguda la reducció de la freqüència dels potencials espontanis miniatura (miniature end plate potentials, MEPPs) i el bloqueig de l'alliberació quàntica (end plate potentials, EPPs). Així doncs, als terminals paralizats els impulsos nerviosos únicament alliberen de forma aïllada *quanta* d'Ach (Simpson, 1981; Sugiyama, 1980; Molgó i Thesleff, 1984; Thesleff, 1989).

La inhibició de l'alliberació de l'Ach produeix una paràlisi flàccida transitòria a les 24h de la injecció. Postsinàpticament, la paràlisi induïx, de la mateixa manera que la denervació, canvis fisiològics i estructurals: l'atròfia muscular (pèrdua de pes muscular i reducció del diàmetre muscular), l'aparició d'AchR extrasinàptics que s'inserten a tota la superfície de la fibra muscular, la resistència d'una proporció dels canals de sodi al bloqueig produït per la TTX, la desaparició de l'activitat AchE extrasinàptica (Thesleff, 1989; Thesleff et al., 1990) i la transformació dels AchR adults en AchR amb conductàncies embrionàries (Költgen et al., 1994).

La paràlisi amb BoTx retarda la retracció de la polinervació que es produeix normalment durant el desenvolupament i, si és induïda durant un període determinat del

desenvolupament, pot restablir la innervació múltiple (Brown et al., 1981). És conegut també que el bloqueig amb BoTx, al igual de l'induit amb altres toxines, disminueix la mort fisiològica que es produeix durant el desenvolupament (Pittman i Oppenheim, 1978). Per tant, aquests treballs suggereixen una relació de factors secretats pel múscul paràlitzat amb el creixement i la supervivència de les motoneurons.

La paràlisi està acompanyada de canvis en l'expressió de proteïnes que contribueixen al creixement nerviós. Per exemple la GAP-43, que és una proteïna que s'ha trobat incrementada en el soma i en les plaques motores de motoneurons de músculs inactius. A les plaques motores s'ha detectat el màxim increment de la GAP-43, entre 4 i 8 setmanes després de la injecció de BoTx. No obstant això, l'aparició d'aquesta proteïna està retardada respecte l'inici de la formació de brots nerviosos (Hassan et al., 1994), però durant el desenvolupament el període de creixement axonal coincideix amb l'expressió de GAP-43 (Benowitz i Routtenberg, 1987). Després de la sinaptogènesi, concretament durant l'etapa inicial de l'eliminació de la polinnervació, els nivells de GAP-43 disminueixen. Caroni i Becker (1992) van comprovar que no es produeix disminució de la GAP-43 quan es bloqueja la transmissió neuromuscular presinàpticament i postsinàpticament amb BoTx/A o  $\alpha$ -BGTX. Tanmateix, tampoc es produeix disminució de la GAP-43 si la reducció de l'IGF que es dona normalment durant el desenvolupament es contraresta amb injeccions d'IGF-I. Tot això suggereix que factors derivats de la diana que depenen de l'activitat muscular podrien estar involucrats en l'expressió de la GAP-43 i en el creixement axonal. Recentment s'ha pogut determinar que animals transgènics que sobreexpressen GAP-43 són capaços d'incrementar el creixement espontani dels terminals nerviosos sense l'alteració de l'activitat neuromuscular. A més, s'ha observat que si als animals transgènics es produeix lesió d'un nervi perifèric o paràlisi amb BoTx, el creixement dels terminals nerviosos s'incrementa respecte dels animals que no sobreexpressen GAP-43. Aquests estudis demostren que aquesta proteïna està directament relacionada amb els processos de creixement nerviós i plasticitat sinàptica (Aigner et al., 1995).

L'examen morfològic de les sinapsis paràlitzades indica que la toxina indueix la formació de brots nodals i terminals (Holland i Brown, 1981). Després d'alguns dies de

paràlisi amb BoTx/A comencen a detectar-se brots terminals curts, visualitzant-se com a fins filaments nerviosos no mielinitzats que sorgeixen de l'arborització terminal original. Quan s'incrementen els dies després de la injecció aquests brots creixen preferencialment per l'eix longitudinal de la fibra muscular i inclús es poden ramificar. Amb el temps els brots van incrementant en nombre, longitud i complexitat. Després d'uns 30 dies de la injecció, els estudis electrofisiològics revelen que l'activitat muscular es recupera però els terminals nerviosos continuen creixent (Molgó et al., 1990). Els mateixos autors van determinar que fins i tot en l'últim punt estudiat (47 dies) no hi havien evidències de retracció terminal.

Diaz et al.(1989) no van detectar brots després de l'administració de BoTx/D en múscul esquelètic de granota. Posteriorment es va demostrar que en múscul esquelètic de ratolí, la BoTx/D induïa la formació de brots terminals i brots nodals originats en nòduls de Ranvier propers a la regió de la placa motora. Als 70 dies de la injecció de la toxina (correspon a 40 dies després de l'inici de la recuperació de l'activitat muscular) s'observava una disminució en la longitud total dels terminals nerviosos, probablement a causa d'una retracció dels terminals. Aquesta retracció no s'havia observat amb la BoTx/A (Molgó et al., 1990; Comella et al., 1993).

Pestronk i Drachman (1988) van demostrar que després d'injectar BoTx el rebrot nerviós és generalment més abundant en músculs proximals que en distals, la longitud dels axons està relacionada amb la capacitat de formar brots dels seus terminals. De totes maneres, aquesta característica no sembla ser l'únic determinant de l'habilitat d'un determinat axó per créixer; en músculs amb axons de longituds similars s'hi troben diferències en el grau de formació de brots. Un factor que podria influenciar en aquestes diferències és el tipus de fibres musculars d'un múscul, malgrat que actualment hi ha controvèrsia en aquest punt. Els brots en el múscul EDL de ratolí són més abundants que en el múscul lent SOL, en canvi, en la rata els resultats obtinguts són oposats (Duchen, 1970).

L'estimulació elèctrica directa del múscul paralytitzat amb BoTx, de la mateixa manera que l'estimulació del múscul denervat, inhibeix la formació de brots (Brown et al., 1977a).

Aquests resultats suggereixen que la inactivitat muscular està implicada en el procés de creixement axonal.

Estudis recents electrofisiològics han demostrat que les membranes dels brots estan dotades de canals actius de sodi, potassi, calci i calci-potassi. Aquests canals podrien tenir un paper important en la conducció dels potencials d'acció al llarg dels brots i en l'alliberació del neurotransmissor (Angaut-Petit et al., 1990). D'altra banda, observacions morfològiques han detectat al llarg d'algunes zones dels brots increments d'AchE i acumulació d'AchR. El procés pel qual el rebrot induït per la BoTx arriba a estar associat a regions amb alta densitat d'AchR no és encara conegut. Una possibilitat seria que la fibra muscular desenvolupés agrupacions d'alta densitat d'AchR, que posteriorment representarien llocs preferencials de creixement axonal. Un altra possibilitat seria que els brots indueixin la redistribució de receptors sinàptics i/o extrasinàptics. Recolzant la segona hipòtesi, hi ha evidències que el marcatge de les agrupacions d'AchR i l'arborització terminal no ocupen normalment la mateixa àrea, ja que en la majoria de casos l'extensió d'AchR és més restringida que l'extensió del terminal nerviós. Aquestes investigacions ens suggereixen un retard en l'aparició dels AchR respecte el creixement dels terminals. (Yee i Pestronk, 1987; Angaut-Petit et al., 1990).

Tots aquests resultats suggereixen que la recuperació funcional *in vivo* es podria produir gràcies a l'extensió dels terminals nerviosos originals, la formació de nous llocs d'alliberació del neurotransmissor i la concomitant remodelació de les estructures postsinàptiques (Molgó et al., 1990).

La interrupció funcional, però no el contacte estructural entre el nervi i el múscul, promou i revela mecanismes tròfics entre els dos. S'ha suggerit que les fibres musculars secreten substàncies o factors que promouen el creixement nerviós i que els terminals nerviosos alliberen substàncies reguladores de la regió postsinàptica (Thesleff et al., 1990).

Durant la realització d'aquest treball s'han publicat un seguit d'experiments que relacionen la paràlisi muscular induïda per BoTx i TTX amb increments de CGRP en el soma de les motoneurons i en els terminals nerviosos (Sala et al., 1995). D'altra banda, també han detectat increments de CGRP en els terminals nerviosos després de l'aixafament del nervi

ciàtic. A més, l'estimulació elèctrica del nervi de músculs paralitzats amb TTX allibera el CGRP acumulat als terminals sinàptics, indicant que el CGRP es podria acumular per la falta de potencials d'acció en els terminals nerviosos paralitzats. Aquests autors suggereixen que els increments de CGRP podrien estar provocats per l'augment de l'alliberació i el transport de factors tròfics procedents del múscul i de cèl·lules no neuronals localitzades al nervi.

## **2.4. Inducció del creixement nerviós amb factors neurotròfics.**

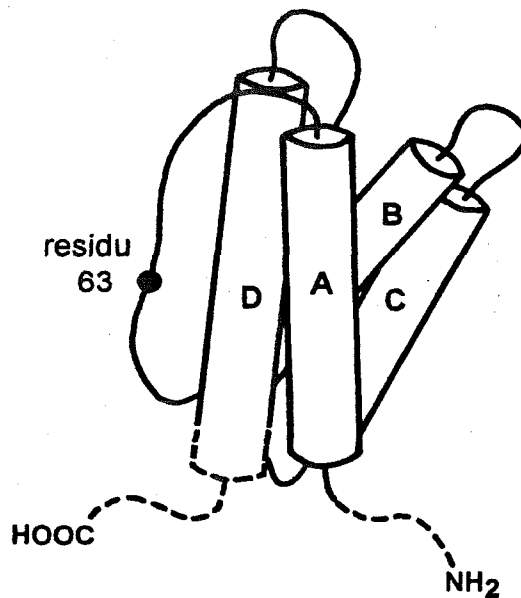
Experiments realitzats *in vivo* i *in vitro* han demostrat que alguns factors neurotròfics promouen el creixement d'axons motors perifèrics. Cal esmentar que aquests factors indueixen el creixement sense provocar cap tipus de lesió o paràlisi, per tant, es conserven les estructures nervioses i es manté la transmissió neuromuscular. Els factors neurotròfics que indueixen el creixement nerviós són els que s'exposen a continuació.

### **2.4.1. Factor neurotròfic ciliar (CNTF).**

El CNTF és una proteïna de 22 kD (Richardson, 1994; Sendtner et al., 1994) que va ser descoberta i denominada per les seves accions en neurones parasimpàtiques del gangli ciliar d'embrió de pollastre (Adler et al., 1979). La presència de grans quantitats de CNTF en el nervi ciàtic de rata adulta i pollastre va permetre la seva purificació i clonatge. Aquesta proteïna ha estat seqüenciada en tres espècies de mamífers: la rata, el conill i l'home. El CNTF de conill està format per 199 aminoàcids i el de rata i el de l'home per 200. Actualment està demostrat que és actiu sobre un ampli espectre de teixits de rata i de pollastre, malgrat que la seva producció sembla restringida a cèl·lules no neuronals de l'SNP i de l'SNC (Dobrea et al., 1992). Les cèl·lules de Schwann i els astròcits són els productors més importants de CNTF, però no està clarificat el mecanisme de secreció que utilitzen. S'ha demostrat la presència del receptor de CNTF en el soma, les dendrites i en alguns axons de diferents tipus de neurones de l'SNC. A l'SNP s'ha trobat en el soma, les dendrites i els axons de les motoneurones espinals; al soma i als axons del gangli de l'arrel dorsal; i als axons del nervi perifèric adult (MacLennan et al., 1996). Aquest receptor és un complex format per tres components: un

que és utilitzat únicament pel CNTF (receptor CNTF- $\alpha$ ), i els altres dos que estan també implicats en la senyalització del "leukemia inhibitory factor" (LIF) (Davis et al. 1991).

Estudis molt recents indiquen que el receptor del CNTF juga un paper essencial durant el desenvolupament; la disrupció genètica del seu gen (*Knock-out*) provoca la mort després del naixement i un conjunt d'alteracions en el desenvolupament (Stahl i Yancopoulos, 1994). D'altra banda, els nivells d'expressió del CNTF durant el desenvolupament són molt baixos (Sendtner et al., 1994) i el *Knockout* del seu gen afecta poc el desenvolupament embrionari (Masu et al., 1993). Per tant, s'ha suggerit que durant el desenvolupament el receptor del CNTF podria estar activat per un altra lligand fins ara desconegut.



**Fig. 7.** Model de l'estructura helicoidal del CNTF proposada per Bazan (1991). Les regions C i N-terminals que es poden eliminar per mutacions sense reduir l'activitat biològica del CNTF es mostren amb línies puntejades. S'indica la posició aproximada del residu 63, un aminoàcid que és crucial en la determinació de l'activitat biològica del CNTF.

Les accions biològiques del CNTF han estat estudiades *in vitro* i *in vivo*:

Accions *in vitro*:

a) Supervivència de neurones embrionàries: promou la supervivència de neurones de l'SNP parasimpàtiques, simpàtiques, sensorials i motores. En cultius primaris de motoneurons el CNTF incrementa la seva supervivència 12 vegades i la combinació de CNTF-FGF l'incrementa 20 vegades. A més, també augmenta la supervivència d'algunes poblacions de l'SNC (Arakawa et al., 1990).

b) Diferenciació de neurones: indueix, entre altres, el fenotip colinèrgic en neurones simpàtiques de rates neonatals (Saadat et al., 1989).

c) Inducció del creixement de neurites: promou el creixement neurític en cultius primaris de motoneurons (Arakawa et al., 1990).

Accions *in vivo*:

a) Protecció enfront la mort natural durant el desenvolupament: l'administració de CNTF durant el desenvolupament incrementa la supervivència de les motoneurons que moren en el període de mort natural fisiològica. No obstant això, *in vivo* el CNTF no es mostra actiu enfront les neurones del gangli ciliar (Oppenheim et al., 1991).

b) Protecció enfront la mort induïda per axotomia: després d'una axotomia en el nervi facial de rates perinatals, la major part de la mort neuronal que es produeix es pot prevenir amb l'aplicació de CNTF en el segment proximal del nervi lesionat (Sendtner, 1990; Clatterbuck et al., 1994).

c) Inducció del creixement axonal: el CNTF potencia la regeneració del nervi ciàtic després de realitzar una transsecció del nervi, ja que promou l'elongació d'axons lesionats (Sahenk et al., 1994).

El tractament del múscul gluti de ratolí adult amb injeccions diàries de CNTF, indueix la formació de brots en els terminals nerviosos i en els nòduls de Ranvier pròxims a les

plaques motores. Aquests efectes es faciliten amb la coadministració d'FGF i revelen una acció sinèrgica dels dos factors. Segons Gurney et al., (1992), el fet que el CNTF no s'expressi en el múscul però sí en el nervi perifèric suggereix que el CNTF endogen podria secretar-se de les cèl·lules de Schwann del nervi i induir la formació de brots.

d) Retardament durant el desenvolupament de les alteracions anatòmiques i de comportament associades a tres models genètics de ratolí de malaltia de motoneurona humana (Helgren et al., 1992; Sendtner et al., 1992; Mitsumoto et al., 1994a). Quan el CNTF és coadministrat amb BDNF és capaç d'aturar els símptomes en un dels models genètics (Mitsumoto et al., 1994b).

#### **2.4.2. Factor de creixement de la insulina (IGF).**

Els factors de creixement de la insulina (IGF-I i IGF-II) són també proteïnes relacionades amb el creixement nerviós:

a) Promouen el creixement neurític *in vitro* de neurones simpàtiques (Recio-Pinto et al., 1986) i de motoneurons embrionàries (Caroni i Grandes, 1990).

b) L'administració exògena *in vivo* en músculs adults de dosis elevades d'IGF-I i d'IGF-II induïx la formació de brots nerviosos (Caroni i Grandes, 1990). S'activa el creixement dels terminals nerviosos i la proliferació de cèl·lules intersticials amb un protocol no-lesionant.

c) Com a conseqüència de la denervació i la paràlisi s'incrementa l'expressió d'ARNm dels IGF en el múscul esquelètic (Ishii, 1989). Després del restabliment de la transmissió neuromuscular els nivells d'ARNm es normalitzen.

d) El tractament local amb proteïnes que inactiven l'IGF per la seva unió específica (IGF-binding proteins, IGF-BP) inhibeix la formació de brots en rates paralitzades amb BoTx. Els efectes biològics dels IGFs estan afectats per aquestes proteïnes extracel·lulars solubles que s'uneixen als factors de creixement amb una afinitat comparable o més forta que



els factors s'uneixen al seu receptor. Es creu que la funció fisiològica d'aquestes IGF-BP és modular l'activitat dels factors de creixement en l'espai extracel·lular (Caroni et al., 1994).

e) En experiments *in vitro* s'ha comprovat que l'addició d'extracte de múscul paralitzat en cultius de motoneurons incrementa el creixement neurític. D'altra banda, si s'afegeix l'extracte muscular i l'IGF-BP es neutralitza l'efecte de l'extracte, no s'incrementa el creixement neurític (Caroni et al., 1994).

S'ha descrit la presència de receptors d'IGF-I en el múscul esquelètic en fibres musculars, fibroblastes, i en els terminals de les motoneurons, indicant que aquestes cèl·lules podrien quedar afectades pels nivells elevats d'IGFs induïts per la inactivitat muscular (Tollefsen et al., 1989).

#### **2.4.3. Factor de creixement fibroblàstic (FGF).**

El factor neurotròfic "acidic fibroblast growth factor" (aFGF) i el "basic fibroblast growth factor" (bFGF) són dos proteïnes amb un 55% d'homologia en la seva seqüència i que s'uneixen al mateix receptor. És ben conegut que tant l'aFGF com el bFGF incrementen la supervivència i el creixement neurític de neurones de l'SNC en cultiu (Walicke, 1988). Els cultius de medul·la espinal tractats amb aFGF o bFGF incrementen significativament el creixement neurític en neurones situades a la banya ventral, però no en les de la banya dorsal de la medul·la (Iwasaki et al., 1995).

El tractament amb bFGF després de l'aixafament del nervi ciàtic afavoreix l'elongació d'axons regenerants, indueix a la formació de brots i redueix el temps de restabliment de la transmissió sinàptica (Vergara et al., 1993). El bFGF també promou la supervivència i el creixement de motoneurons cultivades (Arakawa et al., 1990), però ni l'aFGF ni el bFGF són capaços d'incrementar la supervivència *in vivo* de les motoneurons embrionàries de pollastre durant la mort natural fisiològica (Oppenheim et al., 1992). Finalment, com ja s'ha comentat, l'aplicació de CNTF incrementa la formació de brots dels terminals nerviosos i el

bFGF coadministrat amb CNTF potencia el seu efecte. Malgrat tot, el bFGF per si mateix no induïx la formació de brots *in vivo* (Gurney et al., 1992).

Totes aquestes troballes suggereixen que el CNTF, els IGFs i els FGFs podrien tenir un paper essencial en la senyalització del sistema neuromuscular inactivat. No obstant això, sembla que serien múltiples els factors, alguns encara potser desconeguts, requerits per induir els canvis locals efectius per promoure el creixement axonal (Caroni et al., 1994).

#### 2.4.4. La neurotrofina 4 (NT-4).

Les neurotrofines són una família de polipèptids que estan relacionats estructuralment i funcionalment. Dins d'aquesta família hi ha quatre proteïnes diferents amb aproximadament un 50% d'homologia: l'NGF, el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) i la neurotrofina-4 (NT-4). Aquestes neurotrofines tenen la capacitat de controlar en vertebrats la diferenciació i la supervivència de certes poblacions neuronals (Barde, 1989; Thoenen, 1991).

L'administració d'NT-4 en el múscul, mitjançant la utilització d'un transplantament de fibroblastes transfectats que expressen grans quantitats d'NT-4, incrementa la formació de brots terminals. Curiosament, a diferència de l'IGF que s'incrementa en el múscul durant la paràlisi i la denervació, els nivells d'ARNm de l'NT-4 disminueixen en la denervació (Funakoshi et al., 1993) i també durant la paràlisi induïda amb BGTX (Funakoshi et al., 1995). Per contra, se sap que els nivells d'NT-4 augmenten després de l'activació elèctrica del nervi ciàtic (Funakoshi et al., 1995). Cal esmentar que l'activitat muscular pot influir directament en la formació i en el manteniment dels contactes sinàptics. En particular, és coneguda la influència de l'exercici muscular en la formació de brots nerviosos (Wernig et al., 1991; Deschenes et al., 1993). A més, l'expressió d'NT-4 s'incrementa progressivament en les 5 primeres setmanes durant el desenvolupament postnatal, i s'aconsegueixen els nivells màxims en l'animal adult. Es pensa que aquests increments estan lligats a la maduració de les sinapsis neuromusculars. Totes aquestes troballes correlacionen la producció d'NT-4 en el múscul amb el creixement dels terminals nerviosos i l'activitat muscular. S'ha especulat que l'NT-4 derivat del múscul, a diferència d'altres factors que es relacionen amb paràlisis i lesions

nervioses, podria tenir efectes sobre els terminals nerviosos adults intactes. S'ha suggerit que l'NT-4 podria ser un factor fisiològic que influiria en els canvis de les unions neuromusculars depenents d'activitat (Funakoshi et al., 1995).

### **III. MATERIAL I MÈTODES**

---

## 1. EXPERIMENTS *IN VIVO*

### 1.1. Animals i anestèsia.

S'han utilitzat, en la majoria d'experiments, rates albines adultes de la soca Sprague-Dawley amb un pes aproximat de 200-250 g, excepte en els experiments de desenvolupament on s'han utilitzat rates en període embrionari (E) i postnatal (P) de diferents etapes; E19, P0, P4, P8, P14 i P31. També s'han emprat ratolins CD1 amb un pes entre 30-40 g.

Les rates adultes i els ratolins s'han anestesiat amb hidrat de cloral (450 mg/kg de pes corporal) per via intraperitoneal. Les rates nounades s'han anestesiat amb èter etílic per via respiratòria.

### 1.2. Aplicació exògena de productes.

#### 1.2.1. Injecció de Botx.

S'ha utilitzat BoTx/A, produïda pel bacteri *Clostridium Botulinum*, administrada en una única injecció subcutània de 800 µl en l'extremitat posterior dreta. La dosi que s'ha utilitzat és de 20 LD50 dissolta en 70 mM de tampó fosfat (PB), pH 6.5, amb 0.25% de gelatina. L'extremitat posterior esquerra s'ha injectat subcutàniament amb la solució vehicle per a utilitzar-la com a control contralateral. Després de 24-48h únicament l'extremitat injectada amb la toxina queda paralitzada. També s'han utilitzat rates control sense injectar ni la solució vehicle ni la toxina.

Les rates han estat sacrificades 1, 2, 6, 11, 20, 30, 100, 200, 260 o 360 dies després de la intoxicació. Dos dies abans del sacrifici les motoneurons que innerven els músculs EDL s'han traçat retrògradament amb la subunitat B de la toxina colèrica (CTB), que no té activitat tòxica. Rates control també han estat traçades amb la lectina de la *Triticum vulgaris* ("Wheat germ agglutinin", WGA) (veure l'apartat 1.5.).

### **1.2.2. Injecció de CNTF.**

S'ha injectat a ratolins CD1 500 ng de CNTF (Research Biochemicals International, USA) dissolt en una solució de 100 µg/ml d'albumina de sèrum boví (BSA) en tampó fosfat salí (PBS). S'han realitzat injeccions subcutànies diàries de 20µl localitzades a la zona del gluti dret, i sobre del gluti esquerre s'ha aplicat la solució vehicle. En altres ratolins s'ha realitzat la mateixa operació injectant la solució vehicle al costat dret i al costat esquerre. S'ha repetit el tractament durant 18 dies, després els animals s'han sacrificat.

Prèviament a la realització dels experiments *in vivo*, es va comprovar l'activitat del CNTF en cultius de neurones embrionàries de gangli ciliar, ja que és ben coneguda la capacitat del CNTF de promoure la supervivència de neurones en cultiu (Arakawa et al. 1990).

### **1.2.3. Injecció de CGRP.**

Un grup de rates tractades amb BoTx han estat injectades subcutàniament a l'extremitat posterior dreta des del primer dia de paràlisi amb 50 µg de CGRP (Cambridge Research Biochemicals, USA) dissolt en 500 µl de sèrum fisiològic. A l'extremitat posterior s'hi ha injectat únicament sèrum fisiològic. Aquesta operació s'ha repetit durant 10 dies, després dels quals els animals s'han sacrificat. L'activitat del neuropèptid s'ha comprovat cada vegada observant la reacció de vasodilatació que es produeix després de la injecció del CGRP.

### **1.3. Axotomia del nervi ciàtic.**

S'han anestesiats rates i s'ha realitzat l'aixafament del nervi ciàtic dret a nivell medi femoral, abans de la seva bifurcació. L'aixafament s'ha dut a terme mitjançant una única compressió del nervi amb unes pinces fines durant 60 s. Després de l'aixafament les rates s'han mantingut vives durant diferents períodes (6, 11, 16, 22 i 40 dies).

#### **1.4. Traçat retrògrad de motoneurons.**

La localització del cos cel·lular de les motoneurons que innerven el múscul EDL en les rates injectades amb BoTx s'ha determinat amb un traçat retrògrad. Aquest marcatge s'ha realitzat amb injeccions intramusculars de dos tipus de substàncies: la WGA (Sigma, San Louis, MO, USA) i la CTB (List Biological Labs, Campbell, CA, USA). La WGA ha estat conjugada amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC).

##### **1.4.1. Preparació dels traçadors.**

En un grup d'experiments les rates han rebut 15µl al 2,5% de WGA conjugada amb FITC (WGA-FITC) dissolta amb PB 0,1 M, pH 7,4. En un altre grup d'experiments s'ha utilitzat 1 mg de CTB liofilitzada reconstituïda en 1 ml d'aigua destil·lada. La diàlisi de la CTB ha permès d'eliminar l' $\text{NaN}_3$ . Posteriorment s'ha concentrat fins a l'1% amb repetides ultrafiltracions en un microconcentrador Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA, USA).

##### **1.4.2. Injecció dels traçadors.**

L'aplicació dels dos traçadors s'ha distribuït en tres injeccions intramusculars de 5 µl amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton de 10 µl acoblada a un capil·lar de vidre molt fi. Tant la WGA-FITC com el CTB s'han injectat als músculs seleccionats de l'extremitat posterior esquerra i dreta de l'animal. Les injeccions s'han efectuat amb especial cura per a impedir que la solució arribi fins als músculs veïns. Després de mantenir-les vives durant 48-96 h les rates s'han reanestesiats i se'ls hi ha fet una perfusió.

#### **1.5. Perfusió intracardíaca i obtenció dels teixits.**

Les rates i els ratolins tractats han estat sacrificats en els temps seleccionats mitjançant perfusió intracardíaca, prèvia anestèsia, per tal d'aconseguir una bona preservació del teixit tractat. S'han fet perfusions amb 200 ml de sèrum fisiològic per tal d'eliminar la sang i tot

seguit s'han fixat amb paraformaldehid al 4% en PB 0,1 M, pH 7,4. Els embrions E19 no han estat perfundits ja que s'han fixat per immersió.

En els animals tractats amb BoTx la medul·la espinal lumbar ha estat dissecada entre D12 i L3, que correspon a les arrels ventrals L4-L6. En la majoria d'animals s'han dissecat els músculs EDL, SOL i TA, excepte en els animals tractats amb CNTF, en els quals únicament s'ha dissecat el múscul gluti. Pel que fa a les rates E19 i P0 tota la massa muscular s'ha extret sense diferenciar els músculs a causa de les dificultats tècniques que suposa treballar amb músculs de volum tan reduït. A la resta de rates postnatales els tres músculs s'han estudiat per separat.

### 1.6. Tinció amb hematoxilina-eosina.

Per a comprovar els danys musculars produïts durant l'aplicació dels traçadors, s'han processat alguns músculs injectats per parafina i s'han tenyit amb hematoxilina-eosina seguint el protocol convencional:

#### 1. Preparació de colorants.

##### a) Hematoxilina de Harris.

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Hematoxilina             | 2,5 g  |
| Etanol al 100%           | 25 ml  |
| Sulfat alumínic potàssic | 50 g   |
| Aigua destil·lada        | 500 ml |
| Òxid de mercuri          | 1,25 g |
| Àcid acètic glacial      | 20 ml  |

En un recipient es dissol l'hematoxilina en 25 ml d'etanol al 100%. Per una altra banda, en un vas de precipitat es barregen, mentre es van escalfant, l'aigua destil·lada i el sulfat alumínic potàssic. Quan el sulfat alumínic s'ha dissolt completament, es treu la solució del foc i s'hi afegeix l'hematoxilina. La solució es posa a bullir durant un minut aproximadament amb agitació. Posteriorment, s'aparta del foc i s'afegeix lentament l'òxid de mercuri. La solució es torna a posar a bullir fins que adquireix un color violat; en aquest



moment es treu el recipient del foc i es refreda amb gel. Un cop la solució s'ha refredat, s'hi afegeix l'àcid acètic. L'àcid acètic és opcional, però dóna una coloració més precisa i selectiva del nucli, alhora que millora la qualitat de la tinció (Stevens, 1982).

b) Eosina alcohòlica.

Es prepara una solució estoc formada per:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Eosina            | 1 g   |
| Aigua destil·lada | 20 ml |
| Etanol al 95%     | 80 ml |

La solució final consta d'una part de la solució estoc i de tres parts d'etanol al 80%. Finalment s'hi afegeix 0,5 ml d'àcid acètic per cada 100 ml de la solució.

2. Protocol de la tinció.

- Les seccions es desparafinen en xilè i posteriorment s'hidraten mitjançant diferents passos en alcohols de gradació decreixent fins arribar a l'aigua destil·lada.
- S'introdueixen en una cubeta amb hematoxilina durant 15-20 min.
- Es renten amb aigua de l'aixeta fins que adquireixen una coloració blava (un mínim de 5 min).
- Es diferencien en àcid clorhídric alcohòlic a l'1% (1% d'HCl en etanol al 70%).
- Es renten amb aigua corrent fins que les seccions tornen a agafar una tonalitat blavosa (10 min aproximadament).
- Es realitza un contrastat amb eosina durant uns 3 min.
- Es procedeix a deshidratar les mostres amb alcohols de gradació creixent (dos banys en etanol al 95% i dos banys en etanol al 100%).
- Seguidament les seccions es submergeixen en xilè-fenol (250 ml de fenol en 750 ml de xilè) uns 5 min i després es banyen dos cops en xilè durant 5 min més.
- Finalment, es submergeixen en xilè-eucaliptol (1:1) durant 5 min.
- S'acaba amb el muntatge de les preparacions amb DPX (BDH).

## 1.7. Immunohistoquímica.

Després de la dissecció de les mostres s'han postfixat durant 24 h en paraformaldehid al 4% en PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. A continuació s'han crioprotegit amb sucrosa al 20% en PBS 0,1 M, i s'han fet diversos canvis de la solució. Les mostres s'han congelat i s'han seccionat amb un criostat, les medul·les espinals s'han tallat longitudinalment a 40 µm de gruix i els músculs SOL, TA i glutis a 20 µm, també longitudinalment.

### 1.7.1. Doble immunofluorescència en la medul·la espinal.

Les seccions de les medul·les espinals traçades amb CTB, que han estat tallades en el criostat, s'han posat en flotació i s'han processat per immunocitoquímica, també en flotació, utilitzant una doble immunofluorescència indirecta.

El mètode seguit per a incubar les seccions ha estat el següent:

- Rentat amb PBS-Tritó X-100 (TX-100) al 0,1% durant 10 min per afavorir la penetració de l'anticòs.

- Incubació en sèrum normal de ratolí (NMS) al 3% dissolt en PBS-TX-100 al 0,1%, durant 30 min. Així s'indueix el bloqueig dels llocs inespecífics i s'afavoreix la posterior unió específica de l'anticòs.

- Incubació amb els anticossos primaris: un antisèrum policlonal de conill anti-CGRP de rata (Península Labs, Belmont, CA, dilució 1/500). Aquest anticòs s'incuba simultàniament amb un segon anticòs, un antisèrum policlonal de cabra anti-CTB (List Biological Lab, diluït 1/4000), durant 48 h a 4°C.

- Tres rentats de 10 min amb PBS-TX-100 al 0,1%.

- Segon bloqueig amb NMS al 3% de 30 min.

- Incubació amb una barreja dels dos anticossos secundaris: antisèrum monoclonal antiimmunoglobulines de cabra, conjugat amb biotina (Sigma, 50 µg/ml) i un monoclonal antiimmunoglobulines de conill conjugat amb FITC, durant un hora a temperatura ambient.

- Tres rentats de 10 min amb PBS-TX-100 al 0,1%.

- Incubació amb avidina conjugada amb isotiocianat de tetrametil rodamina (TRITC, Sigma, 10 µg/ml), durant 1 h a temperatura ambient.

- Tres rentats de 10 min amb PBS-TX-100 al 0,1%.
- Muntatge de les preparacions amb Fluoprep (Biomerieux, Charbonnier les Bains, França).

Tant els anticossos primaris com els secundaris s'han diluït sempre amb PBS-TX-100 al 0,1%.

Les seccions de les medul·les espinals traçades amb WGA-FITC s'han muntat directament amb Fluoprep.

### **1.7.2. Immunofluorescència en els músculs soli, tibial anterior i gluti.**

Els músculs tallats en el criostat han estat recollits en portaobjectes gelatinitzats i s'han deixat assecar unes 5 hores a temperatura ambient per tal d'afavorir l'adhesió de les mostres als portaobjectes.

S'han processat per immunofluorescència els músculs SOL i TA dels animals tractats amb BoTx i de les rates a les quals s'ha realitzat l'aixafament del nervi ciàtic. En les rates injectades amb CGRP únicament s'han processat els músculs TA i en els ratolins tractats amb CNTF els músculs glutis.

- Rentat amb PBS-Tritó X-100 (TX-100) al 0,1% durant 10 min.
- Incubació en sèrum normal de cabra (NGS) al 3% dissolt en PBS-TX-100 al 0,1%, durant 30 min.
- Incubació amb anticòs primari, un antisèrum policlonal de conill anti-CGRP de rata.
- Tres rentats de 10 min amb PBS-TX-100 al 0,1%.
- Segon bloqueig amb NGS al 3%.
- Incubació, amb anticòs secundari de cabra anti-immunoglobulines de conill, conjugat amb FITC (Sigma, 1/40), barrejat amb BGTX conjugada amb TRITC (BGTX-TRITC, Molecular Probes, 1 µg/ml) per poder identificar les plaques motores. S'incuben durant 1 h a temperatura ambient.
- Muntatge de les preparacions amb Fluoprep.

### 1.7.3. Immunocitoquímica pel mètode peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

Part de les seccions dels músculs SOL i TA, de la mateixa manera que part de les medul·les espinals de les rates tractades amb BoTx, s'han processat per la tècnica PAP. Les incubacions de les medul·les s'han fet en flotació i les dels músculs s'han fet sobre els portaobjectes.

El protocol seguit ha estat el següent:

- Rentat amb PBS-TX-100 al 0,1% durant 10 min.
- Bloqueig de la peroxidasa endògena present en les mostres amb peròxid d'hidrogen a l'1% en PBS-TX-100, 30 min.
- 3 rentats de 10 min PBS-TX-100 al 0,1%.
- Bloqueig inespecífic amb NGS al 3% dissolt en PBS-TX-100.
- Incubació amb un antisèrum policlonal de conill antiCGRP de rata diluït 1/500 durant 24 h.
- 3 rentats de 10 min PBS-TX-100 al 0,1%.
- Segon bloqueig amb NGS al 3%, durant 30 min.
- Incubació amb un antisèrum policlonal antiimmunoglobulines de conill (Sigma, 1/60) durant 60 min.
- 3 rentats de 10 min PBS-TX-100 al 0,1%.
- Incubació amb el reactiu policlonal PAP (Sigma, 1/100) durant 60 min.
- 3 rentats de 10 min PBS-TX-100 al 0,1%.
- Revelat de l'activitat peroxidasa amb 3, 3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma), durant uns 10 min.

- 3 rentats de 10 min PBS

Solució de DAB:

- 20 g de DAB.
- 40 ml de PBS.

Solució de revelat:

- 100 µl de peròxid d'hidrogen per cada 10 ml de la solució de DAB.

Els talls incubats en flotació s'han recollit en portaobjectes gelatinitzats juntament amb els que s'han incubat en portaobjectes gelatinitzats, s'han deshidratat en alcohols de gradació

creixent i aclarit amb xilè. Posteriorment s'han muntat amb el medi de muntatge hidròfob DPX.

### **1.8. Impregnació argèntica dels terminals nerviosos intramusculars.**

Els músculs EDL, procedents dels animals injectats amb BoTx, CGRP i els músculs glutis dels animals tractats amb CNTF, s'han tenyit amb una impregnació argèntica, segons el mètode de Gros- Bielchowsky, per a poder visualitzar els terminals nerviosos. Els músculs s'han fixat en formol al 10% durant més de 15 dies i s'han tallat longitudinalment en el criostat a 40µm. Els talls recollits en flotació amb aigua destil·lada s'han processat seguint el protocol que es descriu a continuació:

- Rentat amb aigua destil·lada.

- Es submergeixen els talls en una solució de nitrat de plata al 20% en aigua destil·lada. Es mantenen de 30 min a 60 min en aquesta solució a les fosques.

- Rentats amb formol al 10% en aigua de l'aixeta. Es renten els talls fins que el formol del rentat deixa de produir núvols quan es submergeixen les mostres.

- Escórrer el formol dels talls en paper de filtre i banyar-los en plata amoniacal, entre 3 min i 60 min. S'espera fins que les seccions adquireixen una tonalitat marronosa. Es comprova al microscopi si els terminals nerviosos han quedat impregnats.

Preparació de la plata amoniacal:

Es prepara nitrat de plata al 20% en un cristallitzador petit i s'hi afegixen gotes d'hidròxid d'amoni fins que la solució es torna transparent. S'addicionen 7 o 8 gotes més.

- Es banyen els talls en aigua amoniacal, durant uns 5 min.

Preparació de l'aigua amoniacal:

En una placa de Petri amb aigua destil·lada s'hi afegixen 4-5 gotes d'hidròxid d'amoni.

- Es banyen els talls en aigua acètica, durant uns 5 min.

Preparació de l'aigua acètica:

En una placa de Petri amb aigua destil·lada s'hi afegixen 4-5 gotes d'àcid acètic.

- Dos rentats amb aigua destil·lada durant 5 min.

- Es submergeixen en clorur d'or en una dilució a l'1/500 en aigua destil·lada durant 30 min.
- Rentat amb aigua destil·lada.
- Es deixen els talls durant 10 min en tiosulfat sòdic al 5-10% dissolt en aigua destil·lada.
- Rentat amb aigua destil·lada.
- Deshidratació dels talls sobre portaobjectes gelatinitzats; alcohol absolut, xilè i finalment xilè-eucaliptol (es fan diversos rentats de cadascun).
- Muntatge amb DPX.

Amb aquesta tècnica es posen de manifest les neurofibril·les que es troben a les neurones i, per tant, es poden distingir les ramificacions que formen els terminals nerviosos.

Els terminals nerviosos impregnats s'han analitzat en un microscopi òptic Olympus BX50 a 1000x i s'han dibuixat en càmera clara. De cada múscul (tant dels músculs tractats com dels no tractats) s'han dibuixat 50 terminals escollits a l'atzar. Posteriorment, amb un analitzador digital (MOP Videoplan, Kontron, Alemanya) s'han processat i analitzat les imatges aplicant el programa "Standard Software" per a mesures planimètriques. S'ha mesurat la longitud dels terminals des del primer punt de brancatge i s'ha comparat el nombre de punts de brancatge dels terminals nerviosos en les diferents condicions experimentals. Aquest paràmetre ens informa del grau de complexitat dels terminals.

S'han processat entre 2 i 4 animals per cada condició experimental. A cada múscul s'ha mesurat la longitud i s'han comptat el nombre de punts de brancatge de 50 terminals nerviosos. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  95% interval de confiança. La significació de les dades s'ha analitzat amb la prova de la t-Student.

## 1.9. Hibridació *in situ*.

### 1.9.1. Extracció de les mostres.

A la medul·la espinal lumbar d'un grup de rates injectades amb BoTx que s'han mantingut vives durant 20 dies, s'hi ha realitzat una hibridació *in situ* de l'ARNm del CGRP.

Les sondes s'han obtingut per la transcripció del plasmidi linearitzat SP64 (Gibson et al., 1988) on s'hi han clonat 440 parells de bases de la seqüència 3' no codificant de l' $\alpha$ -CGRP. Les sondes ARNm de radiomarcatge complementari ("antisense") i del no complementari ("sense") s'han creat transcrivint el plasmidi linearitzat en presència de CTP[<sup>32</sup>P]. La hibridació s'ha realitzat seguint el mètode descrit per Hamid et al.(1987).

Les rates s'han perfundit primer amb sèrum fisiològic i després amb paraformaldehid al 4% en tampó borat 0,1 M, pH 9,5. Després de dissecar les medul·les espinals entre D12 i L3, s'han postfixat per immersió en el mateix fixador a 4°C. Posteriorment s'han crioprotegit amb sucrosa al 30% en PBS, i se les ha mantingut tota la nit a 4°C. S'han tallat en el criostat a 10  $\mu$ m de gruix i s'han recollit en portaobjectes coberts amb Vectabond (Vector-laboratoris).

### 1.9.2. Pretractament del teixit.

- Les mostres es deixen assecar durant tota la nit a 37°C.
- Rehidratació de les preparacions per immersió en PBS-TX-100 al 0.2% durant 15 min.
- 2 rentats de 3 min en PBS.
- Selecció dels portaobjectes "ARNsa Control". La resta de portaobjectes es deixen en PBS.

Preparar la solució d'ARNsa (100  $\mu$ g/ml) en 2x salí citrat estàndard ("Standard Saline Citrate", SSC) precalentat a 37°C. S'incuba cada portaobjectes aproximadament amb 200  $\mu$ l de la solució ARNsa, a 37°C durant 30 min. Es renten els portaobjectes en SSC, 2 rentats de 3 min.

- Digestió en tots els portaobjectes amb proteïnasa K: s'incuben els portaobjectes amb proteïnasa K (1 µg/ml) en 0.1M Tris/50 mM d'àcid etilendiaminotetracètic (EDTA) a pH 8, precalentat a 37°C. El temps d'incubació és de 15-20 min.

- Rentat de 5 min amb 0,1 M de glicina, així s'inactiva la proteïnasa K.
- Postfixació durant 3 min amb paraformaldehid al 4% en PBS 0,1M a pH 7,4.
- 2 rentats amb PBS d'1 min.
- Bany de 10 min amb anhidrid acètic al 0.25% i trietanolamina 0.1M, pH 8.
- Rentar amb aigua destil·lada i assecar a 37-40°C durant 10 min.

### 1.9.3. Hibridació.

Preparació de la solució tampó d'hibridació/formamida (desionitzada) 1:1 :

Escalfar el tampó d'hibridació a 37°C durant 5 min i després barrejar-lo amb la formamida a parts iguals.

- Diluir la sonda d'ARN; 0,5 ng/ml de la solució anterior.
- Aplicar 10 µl per portaobjectes i cobrir amb un cubreobjectes siliconitzat.
- Incubar en una cambra humida a 42°C durant 16-20 h.

### 1.9.4. Rentats estridents.

- Amb la finalitat de desprendre els cubreobjectes es submergeixen les mostres en 2x SSC/0,1% sulfat dodecil sòdic (SDS) a temperatura ambient (1-2 min).

- Rentat amb 2x SSC/0,1% SDS a temperatura ambient, 4x 5 min.

- Rentat amb 0.1x SSC/0.1% SDS a la mateixa temperatura utilitzada per a la hibridació, 2x 10 min.

- Rentat amb 2x SSC durant 2 min, per eliminar l'SDS.

- Incubació amb ARNsa (10 µg/ml) a 37° durant 15 min. Escalfar l'SSC a 37° i afegir en el moment de la digestió l'ARNsa.

- Rentat amb 2x SSC, 2 min.

- Deshidratació en alcohols de gradació creixent barrejats en 0.3M NH<sub>4</sub> acetat (2 min a cada pas: etanol al 70%, 90% i 2x 100%).



- Digestió en tots els portaobjectes amb proteïnasa K: s'incuben els portaobjectes amb proteïnasa K (1 µg/ml) en 0.1M Tris/50 mM d'àcid etilendiaminotetracètic (EDTA) a pH 8, precalentat a 37°C. El temps d'incubació és de 15-20 min.

- Rentat de 5 min amb 0,1 M de glicina, així s'inactiva la proteïnasa K.
- Postfixació durant 3 min amb paraformaldehyd al 4% en PBS 0,1M a pH 7,4.
- 2 rentats amb PBS d'1 min.
- Bany de 10 min amb anhidrid acètic al 0.25% i trietanolamida 0.1M, pH 8.
- Rentar amb aigua destil·lada i assecat a 37-40°C durant 10 min.

### 1.9.3. Hibridació.

Preparació de la solució tampó d'hibridació/formamida (desionitzada) 1:1 :

Escalfar el tampó d'hibridació a 37°C durant 5 min i després barrejar-lo amb la formamida a parts iguals.

- Diluir la sonda d'ARN; 0,5 ng/ml de la solució anterior.
- Aplicar 10 µl per portaobjectes i cobrir amb un cubreobjectes siliconitzat.
- Incubar en una cambra humida a 42°C durant 16-20 h.

### 1.9.4. Rentats estridents.

- Amb la finalitat de desprendre els cubreobjectes es submergeixen les mostres en 2x SSC/0,1% sulfat dodecil sòdic (SDS) a temperatura ambient (1-2 min).

- Rentat amb 2x SSC/0,1% SDS a temperatura ambient, 4x 5 min.

- Rentat amb 0.1x SSC/0.1% SDS a la mateixa temperatura utilitzada per a la hibridació, 2x 10 min.

- Rentat amb 2x SSC durant 2 min, per eliminar l'SDS.

- Incubació amb ARNsa (10 µg/ml) a 37° durant 15 min. Escalfar l'SSC a 37° i afegir en el moment de la digestió l'ARNsa.

- Rentat amb 2x SSC, 2 min.

- Deshidratació en alcohols de gradació creixent barrejats en 0.3M NH<sub>4</sub> acetat (2 min a cada pas: etanol al 70%, 90% i 2x 100%).

- Assecar les portaobjectes a l'aire abans de continuar amb l'autoradiografia.

### **1.9.5. Detecció de la hibridació.**

Autoradiografia en emulsió líquida (el lloc on es realitza ha d'estar completament a les fosques). Els passos són els següents:

- Precalentar els portaobjectes (1-2min) a 45 °C.
- Submergir les mostres en l'emulsió líquida (Ilford K-5).
- Assecar els portaobjectes.
- Exposar els portaobjectes durant 5 dies a 4°C.
- Revelar amb Kodak D19 durant 3 min.
- Rentar breument amb aigua.
- Fixar amb Kodak F24 durant 3 min.

L'especificitat de la hibridació s'ha comprovat mitjançant la hibridació de les sondes complementàries sobre seccions que prèviament s'han tractat amb ARNs<sub>a</sub> o bé s'han incubat amb sondes no complementàries per l'ARN<sub>m</sub> de l' $\alpha$ -CGRP.

### **1.10. Quantificació dels resultats en les medul·les processades per immunofluorescència i per hibridació *in situ*.**

#### **1.10.1. Microscopis, filtres i estàndards.**

L'immunomarcatge i la hibridació *in situ* pel CGRP s'han valorat utilitzant un fotomultiplicador adaptat a un microscopi invertit Zeiss Aixover 10, equipat amb platina motoritzada i controlat pel programa Photan (Zeiss, Oberkochen, Alemanya). Per la immunofluorescència amb FITC, s'han emprat els filtres d'excitació BP 485 i de barrera BP 515-565. Per la TRITC s'han utilitzat els filtres d'excitació BP 546 i de barrera LP 590. No s'ha observat interferència entre els dos fluorocroms utilitzant aquests filtres. L'ajust i l'estandardització del fotomultiplicador s'han fet amb un fluorescent estàndard (FI-estàndard 474256 de Zeiss). La fotometria amb llum transmesa, per a quantificar el radiomarcatge en les



medul·les híbrides i l'immunomarcatge en les processades pel mètode PAP, s'han estandarditzat mesurant la transmitància del fons en regions de teixit sense marcatge específic.

### 1.10.2. Mesures.

En les medul·les processades per fluorescència només s'han valorat totes les motoneurons del múscul EDL que prèviament s'havien tractat. En canvi, a les medul·les processades per hibridació *in situ* i pel mètode PAP s'han realitzat un mínim de 150 mesures a les motoneurons de la zona lumbar dels dos costats de la medul·la, el costat tractat i el no tractat.

### 1.10.3. Processament de les dades i l'anàlisi estadística.

Les dades obtingudes de cada mostra s'han analitzat mitjançant una classificació automàtica i individual de la intensitat d'immunofluorescència i radiomarcatge. Es va desenvolupar un algorisme de classificació basat en un mètode de reconeixement de patrons sense classificació prèvia (Escudero, 1977). Aquest mètode està basat en l'existència de grups de cèl·lules en els quals l'immunomarcatge i el radiomarcatge pel CGRP està caracteritzat per una distribució normal. L'aplicació del mètode es vàlida amb dades generades per simulacions de Monte-Carlo utilitzant per cada grup valors predefinits de reactivitat. En totes les condicions experimentals, l'immunomarcatge o el radiomarcatge pel CGRP es va classificar en tres grups (1+, 2+, 3+) de menys a més intensitat. Aquest mètode està basat en mesures iteratives, per la qual cosa els resultats s'han comprovat dues vegades utilitzant diferents condicions d'inici. En tots els casos, la classificació obtinguda va ser coincident.

Les dades expressades en els resultats representen la mitjana  $\pm$  95% interval de confiança. La significació de les dades obtingudes s'ha assajat amb el programa estadístic SPSS/PC per la prova de la Khi-quadrat. Les variables analitzades han estat la intensitat d'immunomarcatge i el costat de la medul·la. En tots els casos s'han fet taules de contingència, tres per dos, avaluant els contrastos d'hipòtesi amb la prova de la Khi-quadrat. El nivell de significació s'ha situat en 0,001.

A més, s'han representat els valors de la ratio  $\pm$  SEM entre la immunoreactivitat 3+ del costat dret i el costat esquerre de les medul·les.

### **1.11. Valoració de la immunoreactivitat en el teixit muscular.**

Les seccions de múscul on s'han realitzat immunohistoquímiques han estat examinades amb un microscopi Olympus BH-2 equipat amb il·luminació d'epifluorescència i també amb un microscopi confocal de rastreig per làser (LSM) Zeiss LSM-310 equipat amb làsers de 543 nm Helium/Neon i 488 nm Argon.

La proporció de plaques immunoreactives al CGRP s'ha analitzat en un mínim de 150 plaques motores per múscul en el microscopi de fluorescència. Les plaques motores han estat considerades positives quan la intensitat de la immunoreactivitat s'ha visualitzat clarament, i negatives quan no s'ha trobat immunoreactivitat, o bé s'ha detectat molt dèbilment. Les dades que es mostren en els resultats representen la mitjana  $\pm$  95 % interval de confiança. S'han analitzat mitjançant la prova de la Khi-quadrat i s'han fet taules de contingència dos per dos. Les variables analitzades han estat: el costat del múscul i la positivitat de les plaques motores. Les dades obtingudes s'han considerat significatives amb la  $p$  inferior a 0,001.

La intensitat d'immunoreactivitat al CGRP de les plaques motores d'animals tractats amb CNTF s'ha valorat amb l'LSM. Mitjançant el "Software" Carl Zeiss LSM versió 3,9, les imatges s'han digitalitzat en les mateixes condicions d'observació: làser 543, objectiu 100x, obertura numèrica 1,3, zoom 1, pinhole 31, temps de rastreig 32 sg, els valors de contrast i brillantor han estat iguals en totes les valoracions. S'ha mesurat la intensitat mitjana dels píxels corresponents a àrees delimitades dins dels terminals nerviosos. Aquesta mesura té una relació directa amb la intensitat de la immunoreactivitat. Aquest procediment s'ha aplicat a 20-35 plaques motores per múscul. Les mitjanes  $\pm$  SEM dels resultats obtinguts s'han comparat amb el test t-Student amb la  $p$  a inferior 0,001.

## 1.12. Material fotogràfic.

Les preparacions de microscòpia òptica (transmissió i fluorescència) s'han fotografiat amb un aparell Olympus C-35AD-4 acoblat a un microscopi Olympus BH-2 o bé amb un aparell PM-C35AD-4 acoblat a un microscopi Olympus BX50. En microscòpia confocal s'ha utilitzat la pantalla d'un monitor RGB acoblat l'LSM. La impressió de les imatges s'ha obtingut després de processar-les amb el programa "Power Point" i s'han imprès amb la impressora Deskjet 850 C.

S'han utilitzat pel·lícules fotogràfiques Perutz Chrome 100 ASA. Les còpies de paper s'han obtingut pel sistema directe de Ciba (Cibachrome).

## 2. EXPERIMENTS *IN VITRO*.

### 2.1. Cultiu de motoneurons.

Pels experiments *in vitro* s'han emprat cultius primaris de motoneurons de pollastre *Arbor acres*. Han estat purificades i cultivades segons el protocol descrit per Comella et al., 1994, que s'explica breument a continuació:

#### 2.1.1. Purificació de les motoneurons.

- Es dissequen les medul·les espinals d'embrions de pollastre de 5,5 dies.
- Les medul·les dissecades es renten amb el tampó de dissecció.

Tampó de dissecció (GHEBS):

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| NaCl              | 137 mM       |
| KCl               | 2,7 mM       |
| glucosa           | 22,2 mM      |
| tampó HEPES pH7,4 | 25 mM        |
| penicil·lina      | 20.000 IU/ml |
| estreptomicina    | 20.000 µg/ml |

- Digestió amb tripsina (Sigma, St. Louis, MO) al 0,025% durant 15 min a 37°C.

- Inactivació de la tripsinització amb medi de cultiu L15 (Sigma) suplementat amb 10% de sèrum de cavall (L15H).

- Seguidament es procedeix a la dissociació mecànica mitjançant la utilització d'una pipeta Gilson amb una punta blava.

- Centrifugació del dissociat a través d'una capa de 3,5% (p/v) de BSA en L15 per tal d'eliminar les restes cel·lulars, a 100x g durant 5 min.

- Les cèl·lules es resuspenen en GHEBS i es centrifuguen a través d'un gradient de densitat de 28,7% (v/v) de Nycodenz (Nycomet, Oslo, Noruega) en GHEBS, a 400x g durant 10 min. Seguidament es recull la fase intermèdia on es troben les motoneurons.

- Comptatge de les cèl·lules amb un hemocitòmetre.

- S'afegeix medi L15H i es sembren a les plaques de cultiu.

### **2.1.2. Condicions de cultiu.**

Les motoneurons es distribueixen en plaques de cultiu cobertes prèviament amb poli-DL-ornitina i laminina. Per a cobrir les plaques de cultiu es van seguir els següents passos:

- Les plaques es tracten amb poli-DL-ornitina (Sigma) en una concentració d'1,5 µg/ml en tampó borat 150mM, pH 8,5.

- 2 rentats amb aigua bidestil·lada.

- Es deixen assecar.

- Les plaques es cobreixen durant un mínim d'una hora amb laminina (Sigma, 3µg/ml) a la incubadora de CO<sub>2</sub>.

- Les cèl·lules es sembren en una densitat de 15.000 motoneurons per pou en plaques de 96 pous, pels estudis de supervivència neuronal, i 100.000 cèl·lules en plaques de 35 mm pels estudis de creixement neurític. Es mantenen a 37,2 °C, en una atmosfera saturada d'humitat al 95% d'aire i 5% de CO<sub>2</sub>. El medi de cultiu utilitzat és L15H suplementat amb 300 µg/ml d'extracte de múscul denervat d'extremitat de pollastre.

### 2.1.3. Preparació de l'extracte de múscul denervat (MEX).

La denervació es realitza en pollastres *Arbor Acres* del dia postnatal 5 (P5):

- Els animals s'anestesien amb pentobarbital sòdic (2 ml de 0,9% NaCl per cada 16 µg de pes corporal).

- Es realitza una secció d'1cm del nervi ciàtic a nivell medio femoral.

- A P10 els animals operats s'examinen per determinar si la paràlisi és completa i es sacrifiquen amb una sobredosi de cloroform.

- Els músculs denervats es dissequen i s'homogeneïtzen amb un aparell Politron (4 vegades 2x 60 sg) en una solució que conté:

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| PBS                                | 5 vol  |
| EDTA (Sigma)                       | 1 mM   |
| EGTA (Sigma)                       | 1 mM   |
| benzamidina (Sigma)                | 1 mM   |
| N-etilmaleimida (Sigma)            | 1 mM   |
| fenilmetilsulfonil fluorur (Sigma) | 0,1 mM |

- L'homogeneïtzat se centrifuga a 100.000 x g durant 75 min. El sobrenedant es congela a -80°C fins a la seva utilització.

### 2.2. Estudi de la supervivència.

Les motoneurons es cultiven en concentracions saturants de MEX durant 48h, es renten amb medi fresc (L15H) i posteriorment s'hi afegeixen els diferents medis que es volen assajar. Seguidament, es compta el nombre de neurones presents en el camp central del pou de cultiu en un microscopi Leitz Labovet amb un objectiu 20x. Aquest nombre de cèl·lules es considera el 100% de supervivència inicial. A partir d'aquest punt s'avaluen el nombre de cèl·lules presents en el mateix camp, a les 24 i a les 48 hores. En tots els casos es consideren neurones vives aquelles que presenten neurites que tenen una longitud igual o superior a dues vegades el diàmetre cel·lular.

S'ha avaluat la supervivència neuronal en les següents condicions de cultiu:

1) Medi suplementat amb MEX (300 µg/ml) i amb diferents concentracions de CGRP: 0, 0,1, 1, 10, 100 i 1000 nM.

2) Medi deprivat de MEX amb les mateixes concentracions de CGRP.

La supervivència en les diferents condicions experimentals s'ha expressat com el percentatge de neurones que es mantenen vives a les 24 i a les 48 hores, respecte el nombre de cèl·lules vives inicials. Els valors mostrats en els resultats són la mitjana ± SEM dels percentatges. La significació s'ha avaluat pel test de la Khi-quadrat.

### 2.3. Estudi del creixement neurític.

Per l'estudi del creixement neurític les motoneurones es mantenen durant 48 hores amb MEX, es renten amb L15H i s'hi afegeixen els següents medis:

- 1) MEX (Control).
- 2) CGRP 10 nM + MEX.
- 3) CGRP 100 nM + MEX.

S'ha realitzat una anàlisi morfomètrica del creixement neurític en els cultius tractats. Els processos neurítics es dibuixen amb un objectiu de 20x en una càmera clara adossada a un microscopi invertit de contrast de fase Leitz Labovet. Posteriorment es mesura la longitud dels processos neuronals de les motoneurones amb un analitzador digital (MOP Videoplan, Kontron, Alemanya). Les mitjanes ± SD s'han comparat amb el test estadístic de la t-Student.

Les motoneurones han estat classificades en 5 grups:

- Cèl·lules totals.
- Cèl·lules sense neurites.
- Cèl·lules amb neurites (es tenen en compte totes les neurites de qualsevol longitud).
- Cèl·lules amb totes les neurites més petites que la suma de dues vegades el diàmetre cel·lular.
- Cèl·lules amb neurites més llargues que la suma de dues vegades el diàmetre cel·lular.