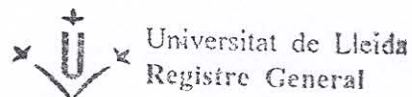


043) 1996 Tar

160017630+X

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

0176 - 97660

IV. RESULTATS

1. Creixement dels terminals nerviosos i canvis en el contingut de CGRP de les motoneurons tractades amb BoTx.

1.1. Creixement dels terminals nerviosos.

Després de la injecció subcutània de BoTx els músculs intoxicats van quedar paralizzats en 24 h aproximadament. Es va observar com els animals eren incapaços d'estendre els dits de l'extremitat afectada, en canvi, en l'extremitat contralateral ho feien sense dificultat. A més, els animals caminaven arrossegant l'extremitat injectada. En el moment del sacrifici, diferents dies després de la intoxicació, es va comprovar si continuava la paràlisi muscular. Abans de la perfusió i dissecció dels músculs, quan els animals anestesiats encara es mantenien amb vida, es va comprimir el nervi amb una pinça per poder determinar si es produïa contracció muscular. Vam observar que la paràlisi començava a recuperar-se als 30 dies de la injecció.

La paràlisi muscular produïa l'atròfia de les fibres musculars. Els músculs van perdre pes durant el temps que durava la paràlisi i el van recuperar quan l'activitat muscular es restablia.

La impregnació argèntica dels terminals nerviosos (Fig. 8) i els dibuixos que es van realitzar en càmera clara van demostrar que la paràlisi estava acompanyada del creixement progressiu dels terminals nerviosos i de l'augment de la complexitat de les plaques motores (Fig. 9). El rebrot dels terminals nerviosos es va determinar mesurant la longitud i el nombre de punts de brancatge dels terminals nerviosos (Fig. 10). Als sis dies de la injecció de la BoTx ja es va detectar un dèbil creixement dels terminals i un moderat increment en el nombre dels punts de brancatge. Quan es van incrementar els dies de paràlisi, la longitud i la complexitat dels terminals també es van incrementar. Malgrat que la paràlisi es va recuperar als 30 dies de la injecció, els terminals van continuar creixent i no és van detectar evidències de regressió fins que van passar els 200 dies de l'administració de la toxina. Després d'aquest període semblava iniciar-se la recuperació cap a la morfologia normal dels terminal nerviosos.

En l'últim punt estudiat, després d'un any de la injecció de la toxina, es va observar un petit augment però les diferències obtingudes respecte el punt anterior de 260 dies no eren significatives.

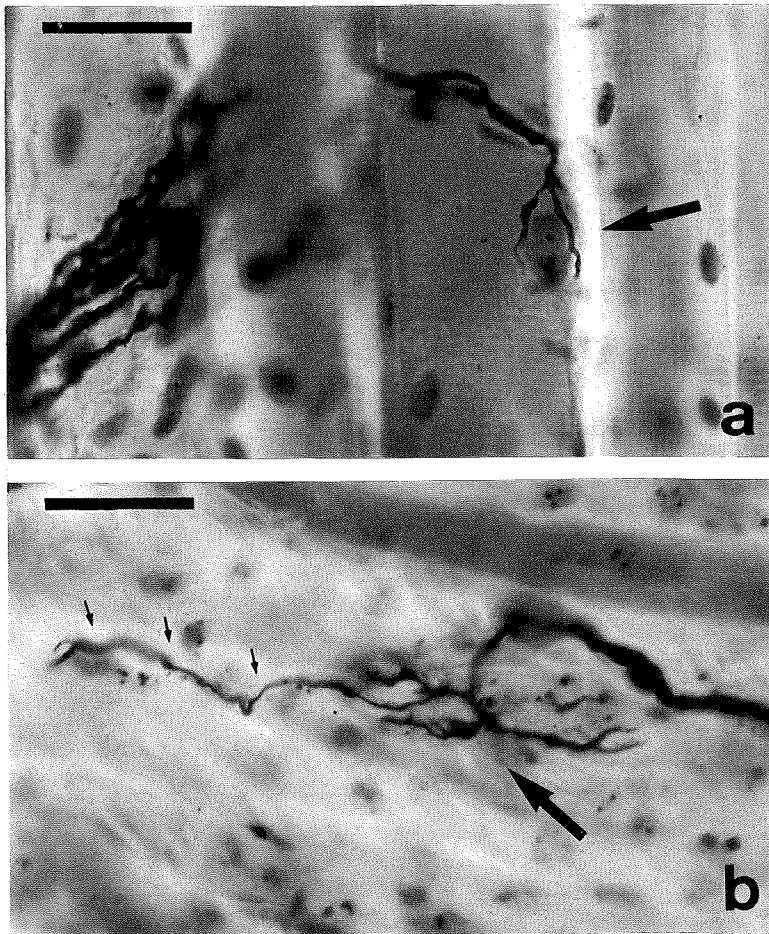


Fig. 8. Seccions de músculs EDL en condicions control (a) i al cap de 100 dies de la injecció de la BoTx (b). Aquestes seccions s'han processat per la tècnica de Gros-Bielchowsky. (a) Terminal nerviós control (*fletxa*). (b) Terminal nerviós d'un múscul intoxicat amb BoTx (*fletxa*). La grandària d'aquest terminal és major que la del múscul control i es pot distingir un brot nerviós que s'escapa de la zona ocupada per la placa motora (*fletxes petites*). Barra de calibratge=25 µm.

A més de l'increment de la longitud i complexitat total dels terminals intoxicats, l'examen morfològic ens va indicar que es formaven brots terminals que es van detectar com a fins filaments no mielinitzats que s'escapaven de la zona ocupada per la placa motora original (Fig. 8). La longitud d'aquests rebrots era variable i no sempre es van poder detectar en la seva totalitat ja que superaven l'enfocament permès pel microscopi. En els últims punts estudiats semblava com si alguns dels brots visualitzats s'haguessin mielinitzat.

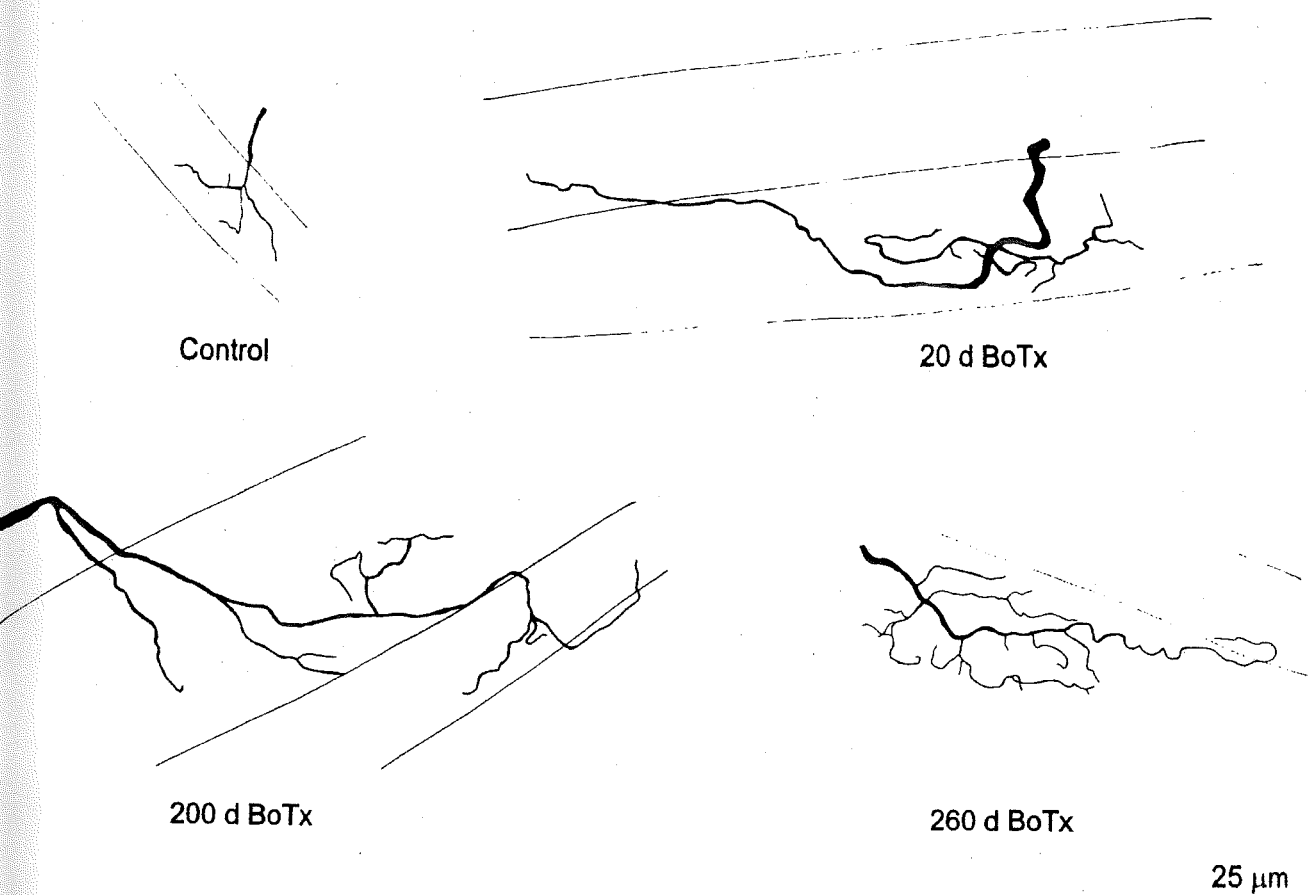


Fig. 9. Dibuixos en la càmera clara de terminals nerviosos procedents de músculs EDLs control i després de 20, 200, i 260 dies del tractament local amb BoTx. Les seccions es van processar amb una impregnació argèntica seguint el mètode de Gros-Bielchowsky. Destaquen els canvis en la longitud i la complexitat de l'arborització terminal com a conseqüència dels rebrots nerviosos.

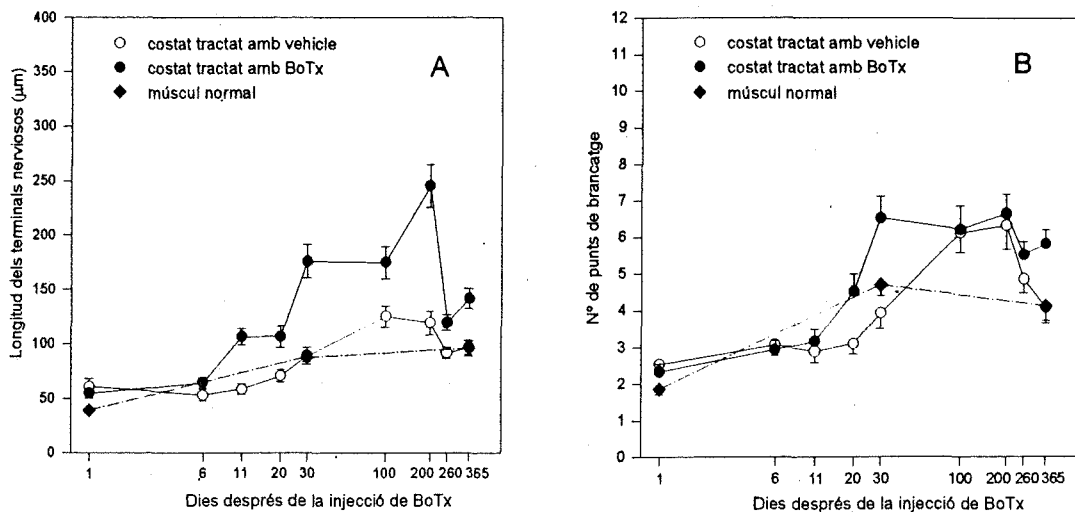


Fig. 10. Creixement dels terminals nerviosos del múscul EDL després de la intoxicació amb BoTx. **(A)** S'han distribuït, en funció del temps després de la intoxicació, els canvis en la longitud dels terminals nerviosos impregnats amb plata dels músculs del costat dret (costat injectat amb BoTx), costat esquerre (costat injectat amb el vehicle) i dels músculs no tractats d'animals de la mateixa edat (músculs normals). **(B)** El nombre de punts de brancaatge per placa motora s'ha representat en les mateixes condicions que en **A**. Cada punt representa la mitjana \pm 95% de l'interval de confiança de 2-4 animals diferents. S'han mesurat 50 plaques motores per múscul.

Els canvis plàstics que eren induïts per la BoTx presentaven una distribució heterogènia en els músculs estudiats, ja que plaques motores on es va detectar un creixement considerable podien trobar-se molt properes a plaques motores amb creixement poc important.

En els músculs contralaterals també es va observar increment, tant de la longitud com del nombre de punts de brancaatge. El curs temporal del creixement dels terminals nerviosos contralaterals seguia el mateix perfil però molt més moderat que en els músculs intoxicats (Fig. 10).

En els músculs de rates no tractades que es van mantenir vives durant temps llargs, també es va observar un increment del creixement dels terminals nerviosos. Aquest augment progressiu que era paral·lel amb l'envelliment de l'animal era més esmorteït que el produït en els animals botulinitzats, tant en els músculs injectats com en els contralaterals (Fig. 10).

1.2. Canvis en el CGRP del soma de les motoneurons induïts per la BoTx.

1.2.1. Traçat de les motoneurons.

Per poder detectar els canvis esdevinguts en el contingut de CGRP després de la injecció de BoTx en una població concreta de motoneurons, en les motoneurons que innerven el múscul EDL, es va realitzar un traçat retrògrad d'aquestes motoneurons. Els traçadors eren captats pels terminals nerviosos i es transportaven al llarg de l'axó de forma retrògrada fins arribar al soma de les motoneurons en la medul·la espinal. Entre 48 i 96 hores després de la injecció dels traçadors (WGA o CTB) en el múscul EDL, un grup ben definit de motoneurons situades en la banya ventral de la medul·la espinal van mostrar un intens marcatge amb la WGA o la CTB. Els cossos neuronals traçats es van visualitzar com un citoplasma ple de grànuls fluorescents que exclouïen el nucli i que s'estenien cap a la part proximal dels processos neuronals (Fig. 11). Es van mantenir els animals vius en diferents temps després de la injecció dels traçadors (entre 24 i 96 h) i es va observar que no hi havien diferències importants en la reactivitat dels traçadors en els temps comparats. Tot i així, es van evidenciar més processos neuronals plens del traçador quan s'esperava 72-96 h després de l'aplicació del traçador, especialment quan s'utilitzava CTB. No es va observar marcatge de les motoneurons situades en el costat contralateral de la medul·la espinal quan s'injectava únicament el traçador en un costat del múscul.

L'estudi histològic amb la tinció d'hematoxilina-eosina en els músculs injectats amb WGA-FITC revelava una reacció inflamatòria local i intensa associada amb la necrosi d'algunes miofibres (Fig. 12). Aquesta resposta incloïa la presència d'un ampli nombre de leucòcits polimorfonucleats i cèl·lules mononucleades que infiltraven l'interstici muscular i les miofibres necròtiques. D'altra banda, aquestes alteracions histològiques eren molt menys importants quan s'utilitzava la CTB com a traçador. Per això, es va considerar més convenient emprar la CTB en el traçat de les motoneurons per estudiar el CGRP.

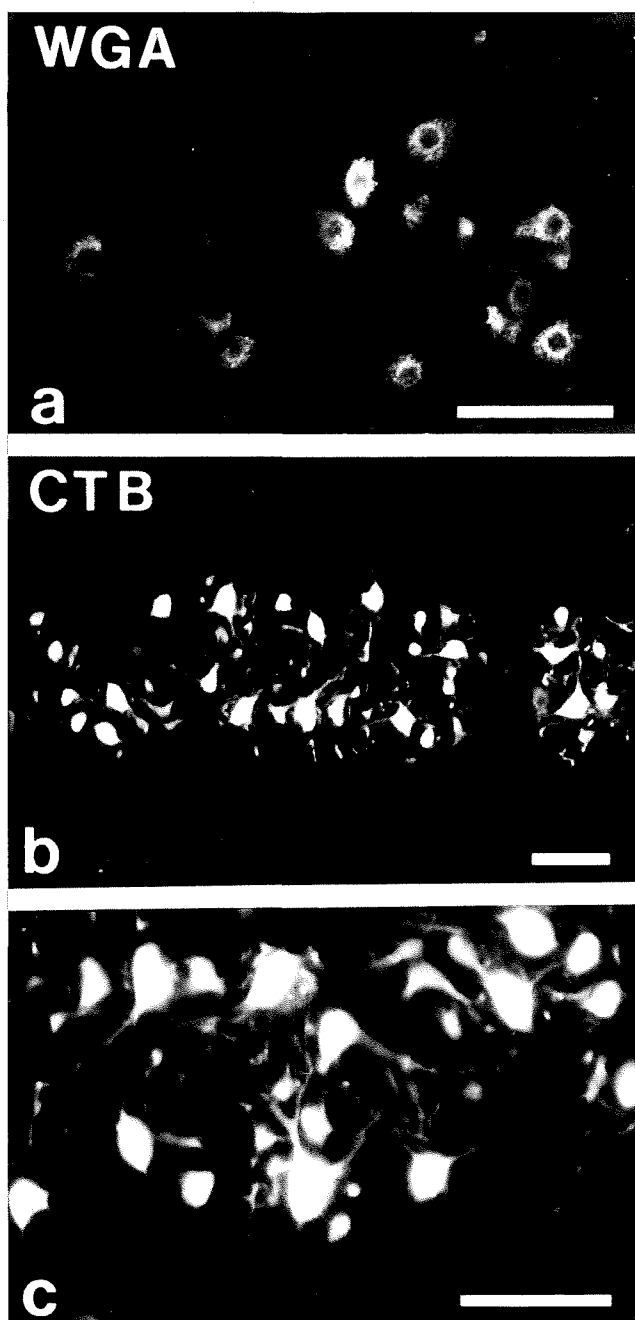


Fig. 11. Imatges de seccions longitudinals de medul·la espinal de rata (40 μm de gruix) que mostren motoneurones traçades retrògradament amb WGA-FITC (a) i CTB (b, c). En els dos casos els traçadors s'han injectat en els músculs EDL. (a) El soma de les motoneurones traçades amb WGA-FITC (després de 72 h de l'aplicació del traçador) està ple de grànuls fluorescents que exclouen el nucli. (b, c) Marcatge amb CTB de les motoneurones després de 96 h de la injecció del traçador. La CTB s'ha visualitzat amb TRITC mitjançant immunofluorescència indirecta. S'observa un intens marcatge als somes i als processos neuronals. La intensitat de la reactivitat de la CTB és més forta comparada amb l'obtinguda després de l'administració de la WGA-FITC. Barra de calibratge=150 μm .

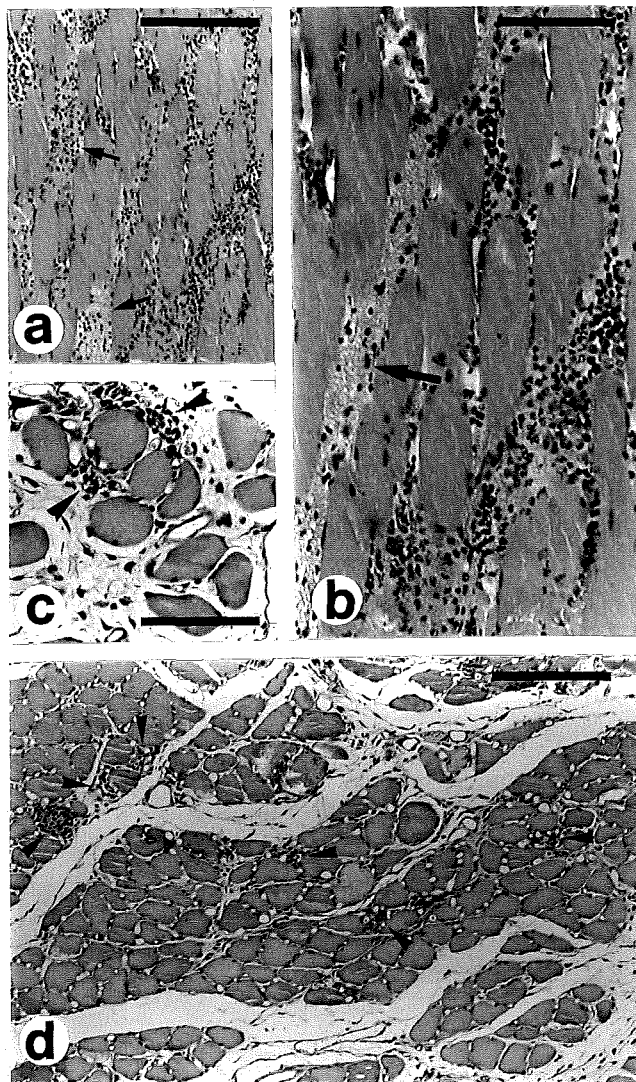


Fig. 12. Fotomicrografia de seccions longitudinals (a, b) i transversals (c, d) de músculs EDL (a, b) i SOL (c, d) injectats amb els traçadors FITC-WGA (a, b) i CTB (c, d). Els músculs han estat inclosos amb parafina i les seccions han estat tenyides amb hematoxilina-eosina. (a, b) S'observa una intensa infiltració intersticial per cèl·lules inflamatòries i algunes miofibres necròtiques (*fletxes*). En (c, d) la resposta inflamatòria és moderada. Algunes miofibres mostren necrosi i signes inicials de regeneració (*puntes de fletxa*). Barres de calibratge=100 µm per (b) i (c), i 200 µm per (a) i (b).

Per descartar possibles efectes de la injecció de CTB per si mateixa en el creixement dels terminals nerviosos, es van comparar músculs després de 48-96 h de la injecció de CTB i músculs no injectats. La impregnació argèntica dels músculs va permetre de mesurar la longitud i els punts de brancatge dels terminals. Es va comprovar que no hi havien diferències significatives entre els dos grups.

1.2.2. Immunoreactivitat del CGRP en el soma de les motoneurons.

La majoria de motoneurons de mostres no tractades amb BoTx presentaven positivitat pel CGRP. El percentatge de motoneurons negatives que innervaven l'EDL era aproximadament del 25%.

El patró de la immnoreactivitat al CGRP en el soma de les motoneurons es distribuïa en petits grànuls que omplien el citoplasma perinuclear i li donaven un aspecte puntejat i de vegades reticulat (Fig. 13). La intensitat del marcatge de les motoneurons era variable, es podien trobar des de motoneurons amb immnuoreactivitat molt dèbil fins a motoneurons molt fortes. Per poder quantificar la immunoreactivitat al CGRP de les motoneurons en les diferents condicions, aquestes es van classificar automàticament utilitzant un programa informàtic (veure Material i mètodes). Es van distribuir en tres grups d'intensitat: 1+, 2+, 3+ (per la intensitat dèbil, mitjana i forta, respectivament). Aquest procediment es va aplicar per avaluar els canvis en el CGRP de motoneurons que innervaven l'EDL en els costats injectats amb BoTx i els injectats amb la solució vehicle. Es van estudiar períodes de temps que van d'1 a 200 dies després de la injecció. Per simplificar la presentació dels resultats i mostrar la informació més rellevant, en la figura 14 únicament s'hi exposen els canvis en el curs temporal del percentatge de les motoneurons 3+. Els dos primers dies després de la injecció, ja s'observava un accentuat increment de les motoneurons d'alta intensitat seguit d'una reducció. L'increment més important de CGRP es produïa als 20 dies de la intoxicació.

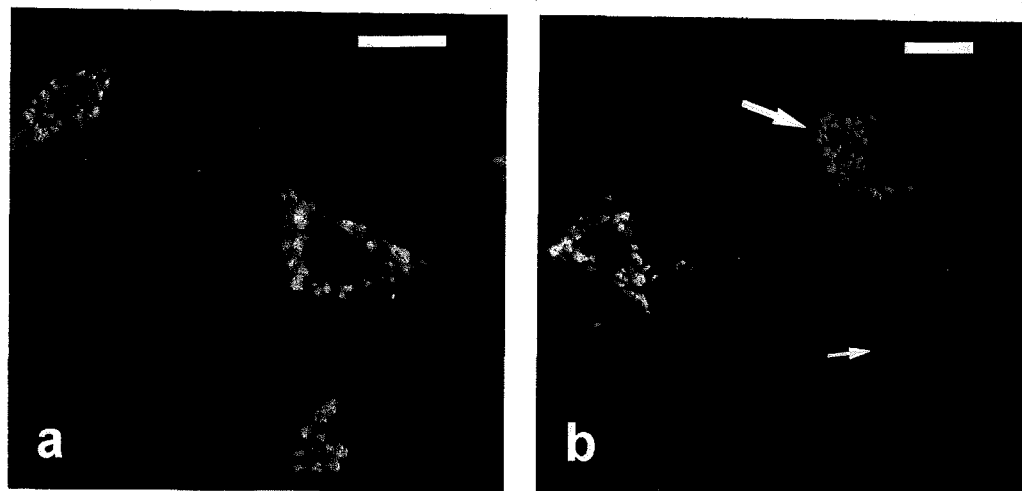


Fig. 13. Microfotografies obtingudes amb l'LSM de medul·les espinals després de 96 h de la injecció de CTB en el múscul EDL. (a, b) Immunofluorescència indirecta de doble marcatge; el traçador CTB s'ha posat de manifest amb TRITC i el CGRP amb FITC. (a) Totes les motoneurons presenten doble marcatge. (b) Es distingeix una motoneurona amb colocalització de CTB i CGRP, una motoneurona positiva al CGRP però que no s'ha traçat amb CTB (*fletxa gran*) i una motoneurona traçada amb CTB que és negativa al CGRP (*fletxa petita*). Es pot veure el patró puntejat de la immunoreactivitat al CGRP en el cos de les motoneurons. Barra de calibratge=25 µm.

En la figura 15, les motoneurons de les medul·les control i de les medul·les després de 20 dies de la injecció es distribueixen en els tres grups d'intensitat d'immunoreactivitat. En les medul·les control predominaven les motoneurons d'immunoreactivitat mitjana, mentre que en les de 20 dies les motoneurons d'intensitat forta respecte a les d'intensitat mitjana i baixa.

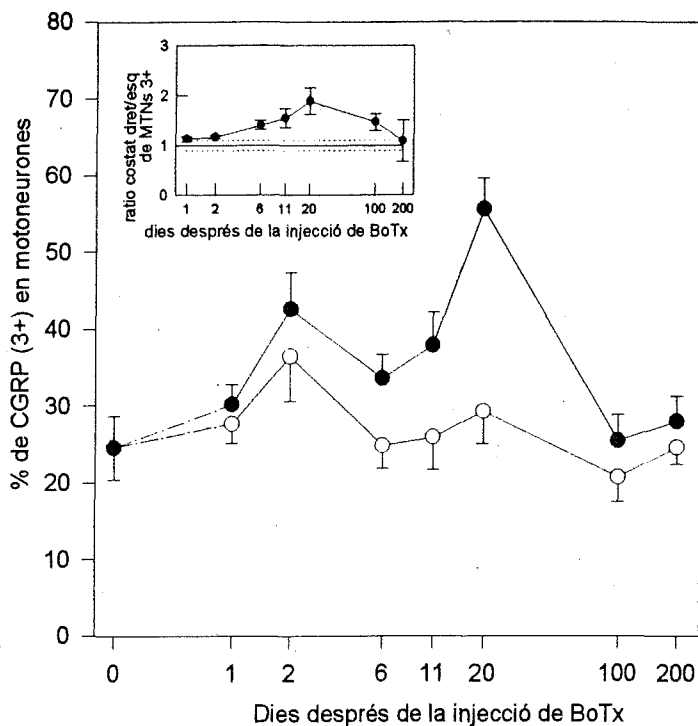


Fig. 14. Curs temporal dels canvis del CGRP en el soma de les motoneurons que innerven el múscul EDL. Es representa la proporció de motoneurons d'immunoreactivitat alta al CGRP en funció del temps després de la injecció de BoTx. (●) representa les motoneurons del costat dret de la medulla espinal (injecció amb BoTx) i, (○) representa el costat esquerre (injecció amb vehicle). En la gràfica inserida es mostren els canvis de la ratio dels costats dret/esquerre. Les mesures dels animals normals es representen amb una línia contínua \pm SEM (línies puntejades). Les mesures s'han obtingut de l'anàlisi morfològica de les motoneurons EDL traçades amb CTB, immunomarcades pel CGRP i classificades segons el material i mètodes. Cada punt representa la mitjana de les mesures de les motoneurons de 3-4 experiments diferents \pm 95% interval de confiança. Els punts en la gràfica inserida són els valors de la ratio \pm SEM.

Després del pic dels 20 dies la immunoreactivitat disminuïa ràpidament i als 100 dies ja hi trobàvem valors similars als basals (Fig 14).

Encara que de forma menys important, també vam detectar resposta en el costat injecció amb el vehicle. Això demostra l'existència d'algun tipus de resposta contralateral a la injecció de BoTx (Fig 14).

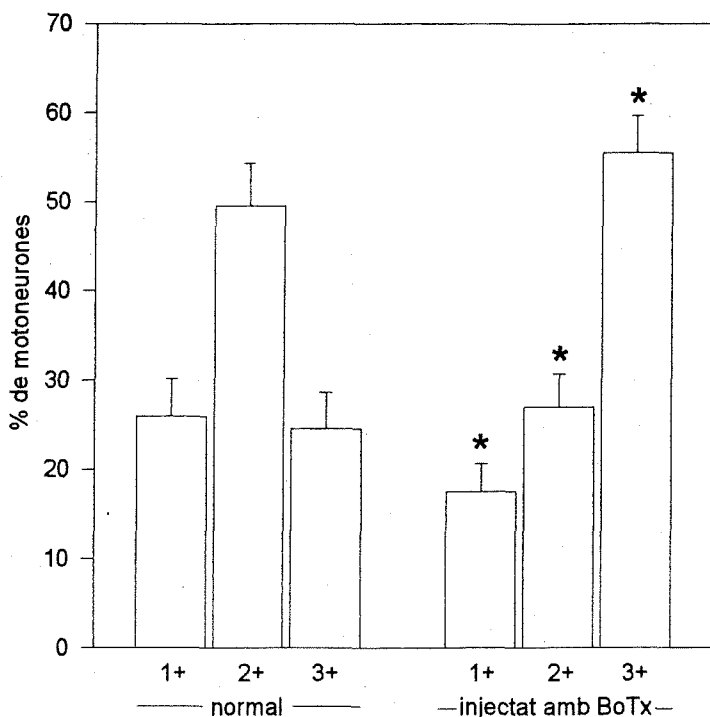


Fig. 15. Distribució de la intensitat d'immunoreactivitat al CGRP en les motoneurons que innerven l'EDL d'animals normals i després de 20 dies de l'administració local de la BoTx. En les motoneurons traçades amb CTB es va mesurar la immunoreactivitat al CGRP amb un microespectrofluorímetre i les dades es van classificar en tres grups d'intensitat d'acord amb el material i mètodes; intensitat fluixa (1+), mitjana (2+) i alta (3+). Les dades representen la mitjana \pm 95% interval de confiança, n=4. Test Khi-quadrat, *p<0.001 versus animals normals.

La gràfica inserida de la figura 14 mostra la relació entre el percentatge de motoneurons 3+ del costat paralitzat (dret) i les del no paralitzat (esquerre). La màxima diferència entre els dos costats es va produir 20 dies després de la injecció. Seguidament, es van anar reduint les diferències i als 200 dies ja no es van trobar diferències significatives en la immunoreactivitat dels dos costats de la medul·la. La resposta bimodal del curs temporal de la immuoreactivitat al CGRP que es produeix en el soma de les motoneurons, després de la paràlisi amb BoTx, no es pot observar en el perfil de la gràfica inserida ja que la BoTx indueix canvis en els dos costats de la medul·la.

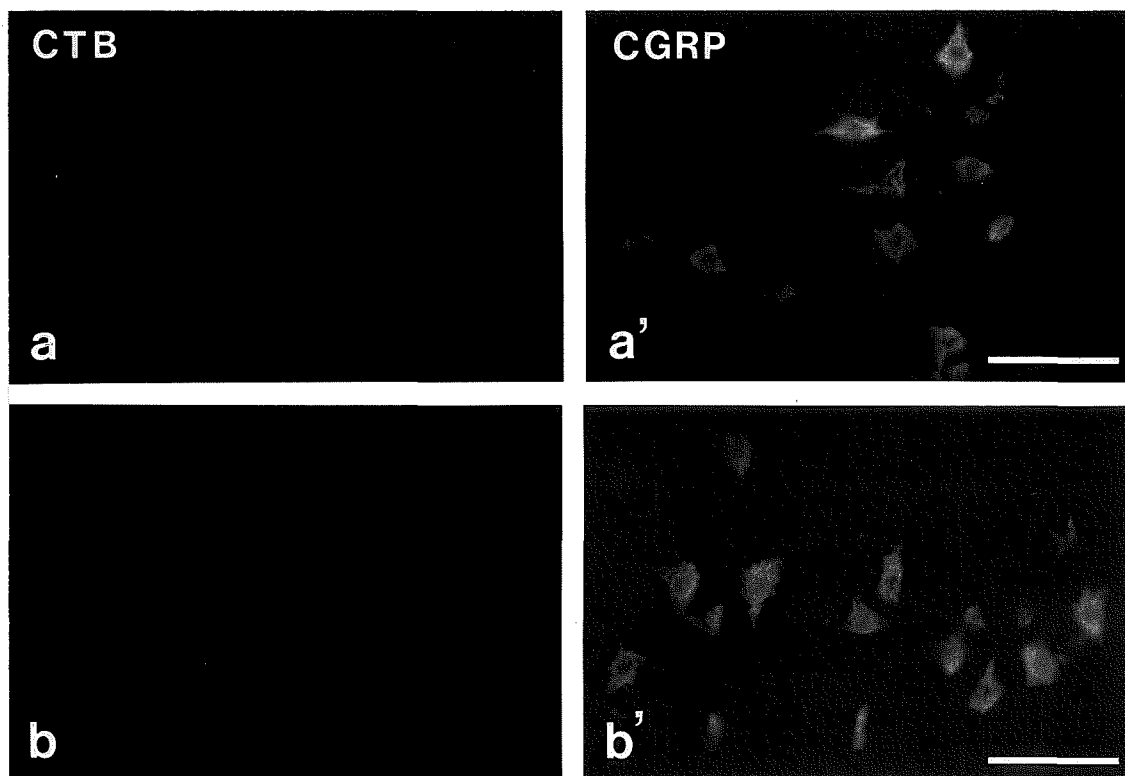


Fig. 16. Immunoreactivitat al CGRP en medul·les traçades amb CTB i intoxicades amb BoTx. La presència de la CTB s'ha visualitzat amb TRITC (**a**, **b**) i la immunoreactivitat al CGRP amb FITC (**a'**, **b'**). La immunoreactivitat al CGRP es mostra al costat ipsilateral de la medul·la espinal després de 24 h (**a'**) i 20 dies (**b'**) de la injecció de la BoTx. Es pot observar que la fluorescència és més intensa en **b'** que en **a'**, mostrant l'increment del contingut de CGRP que es produeix després de 20 dies de paràlisi amb BoTx. En **a'** i **b'** es veuen motoneurons amb diferents intensitats d'immunoreactivitat. Barra de calibratge=100 μ m.

Quan es van processar les mostres per immunomarcatge amb PAP, es va observar clarament l'increment d'immunoreactivitat en les motoneurons de la medul·la espinal lumbar del costat tractat respecte del no tractat (Fig. 17).

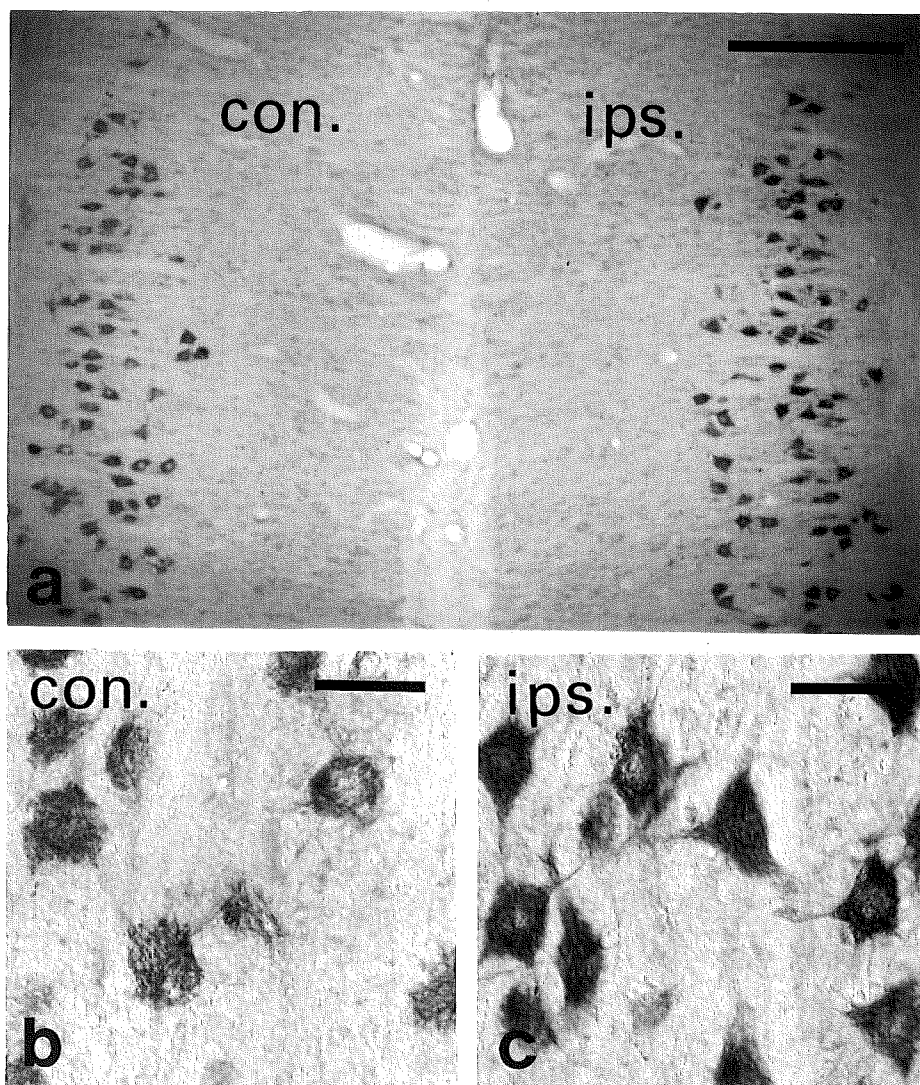


Fig. 17. Immunoreactivitat al CGRP en seccions longitudinals de la banya ventral de la medul·la espinal lumbar al cap de 30 dies de la injecció local de BoTx. Les seccions s'han processat mitjançant el mètode PAP. (a) Imatge de la immunoreactivitat al CGRP en el costat contralateral (con.) i en el costat tractat amb BoTx (ips.) de la medul·la espinal. Destaca l'increment en la intensitat de la immunoreactivitat en el costat botulinitzat. (b, c) Visió a gran augment dels dos costats de la medul·la de la imatge a. (b) Costat contralateral i (c) costat botulinitzat. Es distingeix el marcatge del CGRP en el soma neuronal i en la part proximal de l'arbre dendrític. Barra de calibratge=500 μ m per a i 25 μ m per b i c.

1.2.3. Expressió del CGRP en el soma de les motoneurons.

L'increment de l'ARNm del CGRP en les motoneurons lumbars, després de 20 dies de la intoxicació, es va demostrar per hibridació *in situ* mitjançant una ribosonda específica. La intensitat de la deposició dels grans de plata en el cos cel·lular de les motoneurons variava des de valors molt similars al fons fins a intensitats molt fortes. El marcatge també es va classificar en tres grups d'intensitat (amb el mateix procediment que es va utilitzar en el cas de la immunoreactivitat). En les quatre rates estudiades la intensitat del marcatge era més forta en el costat de la medulla paralitzada. Quan les motoneurons es distribuïen en grups d'intensitat s'observava que hi havia més motoneurons dels grups 2+ i 3+ en el costat paralitzat, en canvi, les motoneurons 1+ predominaven en el costat contralateral (Fig. 18).

Si s'utilitzava la ribosonda "sense" substituint la ribosonda "antisense" no s'observava marcatge superior al del fons. A més, el marcatge específic s'eliminava quan les seccions es tractaven amb ARNs.

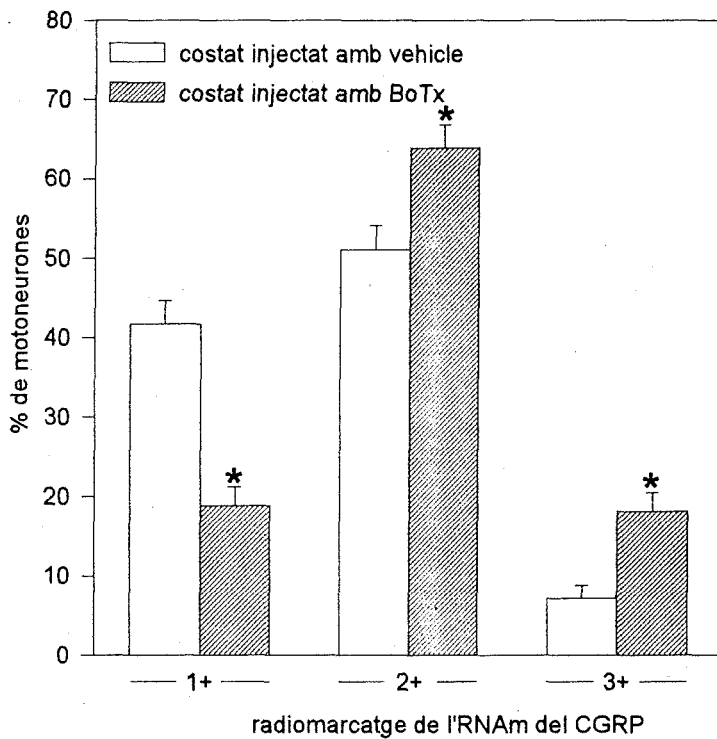


Fig. 18. Marcatge per hibridació *in situ* de l'ARNm del CGRP després de 20 dies de la injecció de la BoTx. La densitat granular en el soma de les motoneurones de la medul·la espinal lumbar es va mesurar amb un microespectrofluorímetre. Les motoneurones es van classificar en tres grups d'intensitat (1+, 2+, 3+) d'acord amb el material i mètodes. Les mesures es van obtenir dels dos costats de la medul·la espinal de quatre animals que havien rebut una injecció local de BoTx en una de les extremitats posteriors. Es van mesurar un mínim de 150 motoneurones en cada costat de la medul·la. Les dades representen la mitjana \pm 95% interval de confiança. Test de la Khi-quadrat, $*p < 0.001$ versus el costat injectat amb vehicle.

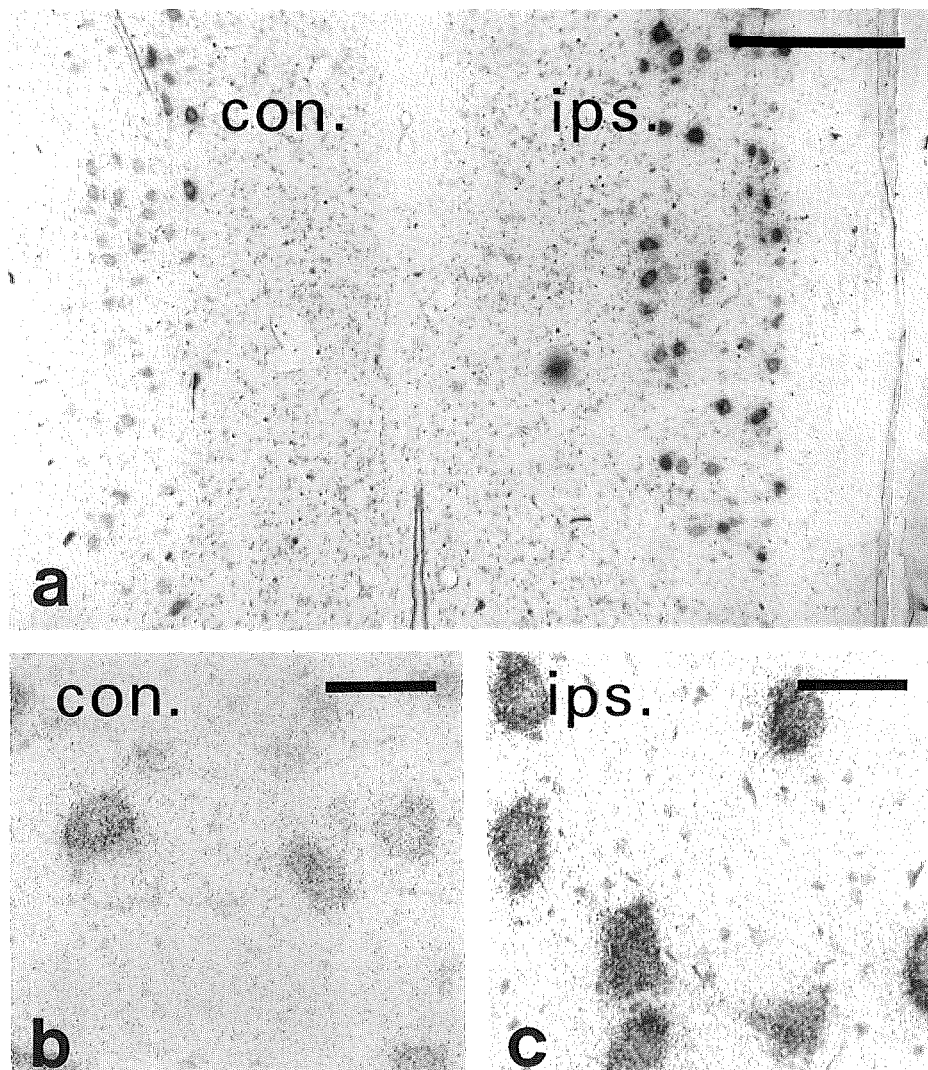


Fig. 19. Autoradiografies obtingudes per hibridació in situ amb una ribosonda específica per l'ARNm de CGRP de rata. (a) Secció longitudinal de la banya ventral de la medul·la espinal lumbar després de 20 dies de la injecció de BoTx. S'observa l'increment de la reactivitat en el costat botulinitzat (ips.) respecte el costat contralateral (con.). (b, c) Visió a gran augment dels dos costats de la medul·la observats en a. Barra de calibratge=500 µm per a i 25 µm per b i c.

1.3. Canvis en el CGRP de les plaques motores induïts per la BoTx.

En els mateixos animals tractats amb BoTx on s'havia fet l'estudi del creixement dels terminals nerviosos en els músculs EDL i dels canvis del CGRP en el soma de les motoneurones, també es van avaluar els canvis del CGRP en les plaques motores dels músculs SOL i TA (Fig. 20). En els músculs processats per immunofluorescència ja s'observava un

ràpid increment en el nombre de plaques motores positives després d'un dia de la injecció. Continuava una disminució progressiva fins el dia 6, i als 20 dies s'observava un altre increment que arribava fins el màxim de plaques motores positives (100%). Aquest pic coincidia amb el màxim increment d'immunoreactivitat en el soma de les motoneurons (Fig. 14). Les plaques en aquest període eren intensament reactives i en la majoria s'hi podia distingir també l'axó preterminal amb un fort marcatge (Fig. 21 i 22). A més, utilitzant l'LSM es podia distingir clarament que la distribució del CGRP era complementària amb la dels AchRs marcats amb α -BGTX-TRITC, és a dir, hi havia una dissociació espacial entre el component presinàptic (el CGRP) i el postsinàptic (l'AchR) (Fig. 23).

Els canvis plàstics mencionats anteriorment que es podien observar amb la impregnació argèntica dels terminals nerviosos també eren visibles en les mostres processades per immunomarcatge del CGRP amb la tècnica de PAP. Es podien distingir brots immunoreactius que sorgien de les zones de les plaques motores, i en molts casos en els seus extrems distals s'observaven acumulacions de CGRP (Fig. 24).

Quan es van augmentar els intervals després del tractament amb BoTx, el contingut de CGRP en les plaques motores davallava progressivament. Després de 200 dies ja s'havien recuperat els nivells basals de CGRP.

En els músculs contralaterals també s'observava un increment d'immunoreactivitat al CGRP en les plaques motores que era menys important que en el costat ipsilateral (Fig. 20).

S'ha detectat un increment molt més dèbil en la immunoreactivitat al CGRP de les plaques motores del múscul TA que en les del SOL, però igualment s'hi podien distingir dos pics màxims. La recuperació fins als nivells basals es produïa abans que en el múscul SOL (Fig. 20 B).

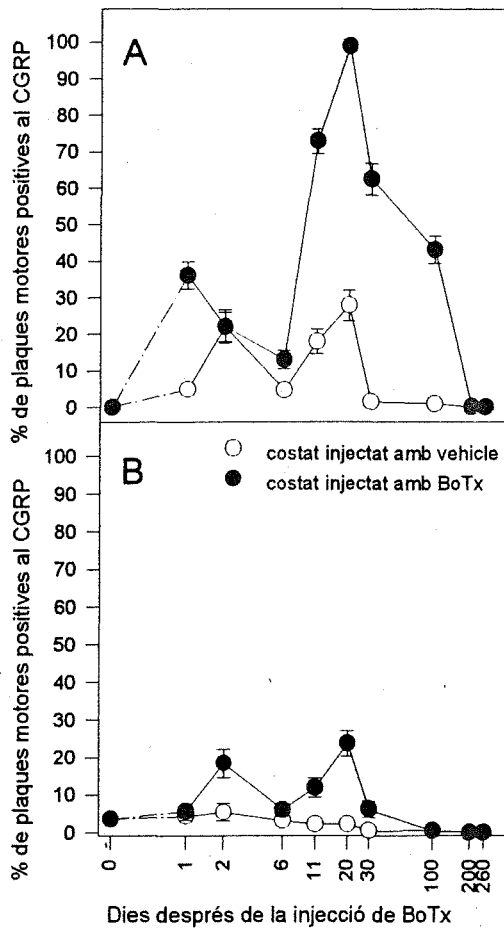


Fig. 20. Curs temporal dels canvis del CGRP en les plaques motores dels músculs SOL (A) i TA (B) després de la intoxicació local amb BoTx. La proporció de plaques motores que mostren immunoreactivitat al CGRP es va avaluar en el costat injectat amb BoTx (●) i en el costat contralateral (injectat amb el vehicle) (○) dels músculs dels mateixos animals. Es van comptabilitzar un mínim de 150 plaques motores a cada múscul. Els punts representen els valors de la mitjanes \pm 95% interval de confiança, n=2-4.

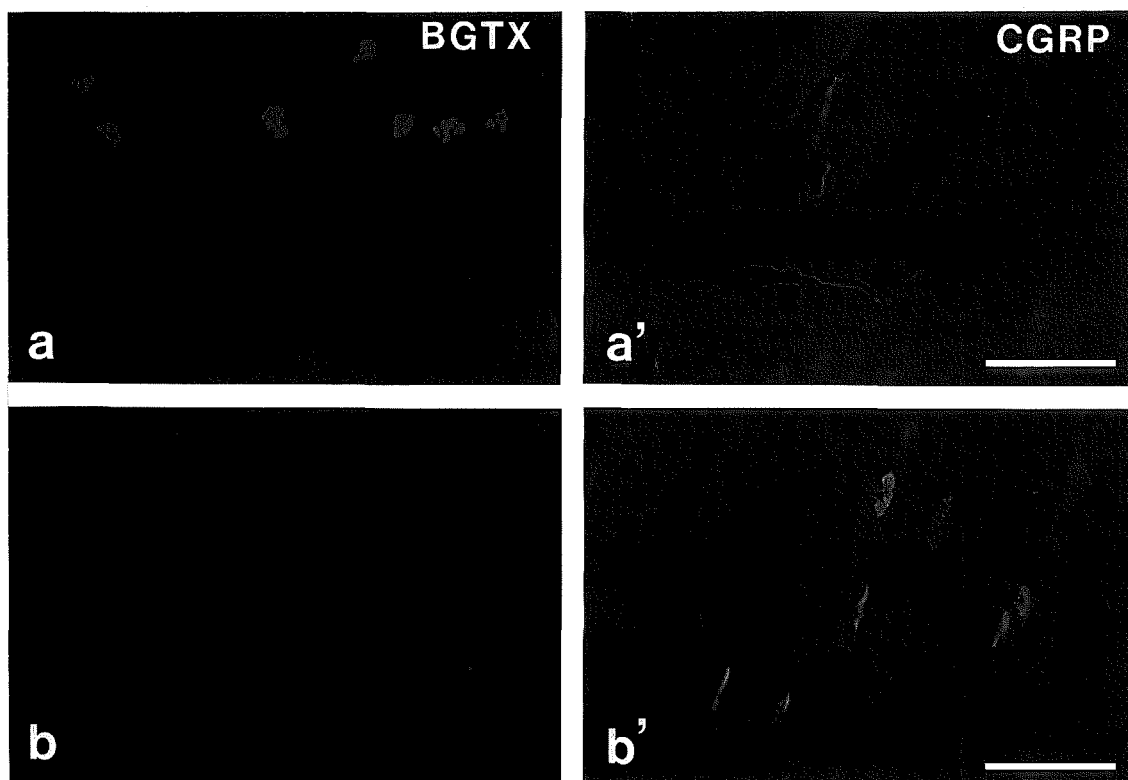


Fig. 21. La intoxicació local amb BoTx produeix un increment en el contingut de CGRP de les plaques motores adultes. (a-b') Doble marcatge de crioseccions de múscul amb α -BGTX-TRITC (a, b) i amb un anticòs policlonal contra CGRP de rata revelat amb FITC (a', b'). La BGTX s'uneix l'AchR localitzat en la regió postsinàptica de la unió neuromuscular, mentre que el CGRP s'uneix a la regió presinàptica i a alguns nervis intramusculars. Immunoreactivitat al CGRP en múscul SOL control (a') i després de 20 dies de la injecció de BoTx (b'). En els músculs control no s'observa immunoreactivitat al CGRP en les plaques motores (a'), únicament es poden veure nervis intramusculars fins amb reactivitat específica. D'altra banda, la immunoreactivitat al CGRP es detecta amb intensitat considerable pràcticament en totes les plaques motores de músculs intoxicats després de 20 dies de la injecció de la BoTx. Barra de calibratge=100 μ m.

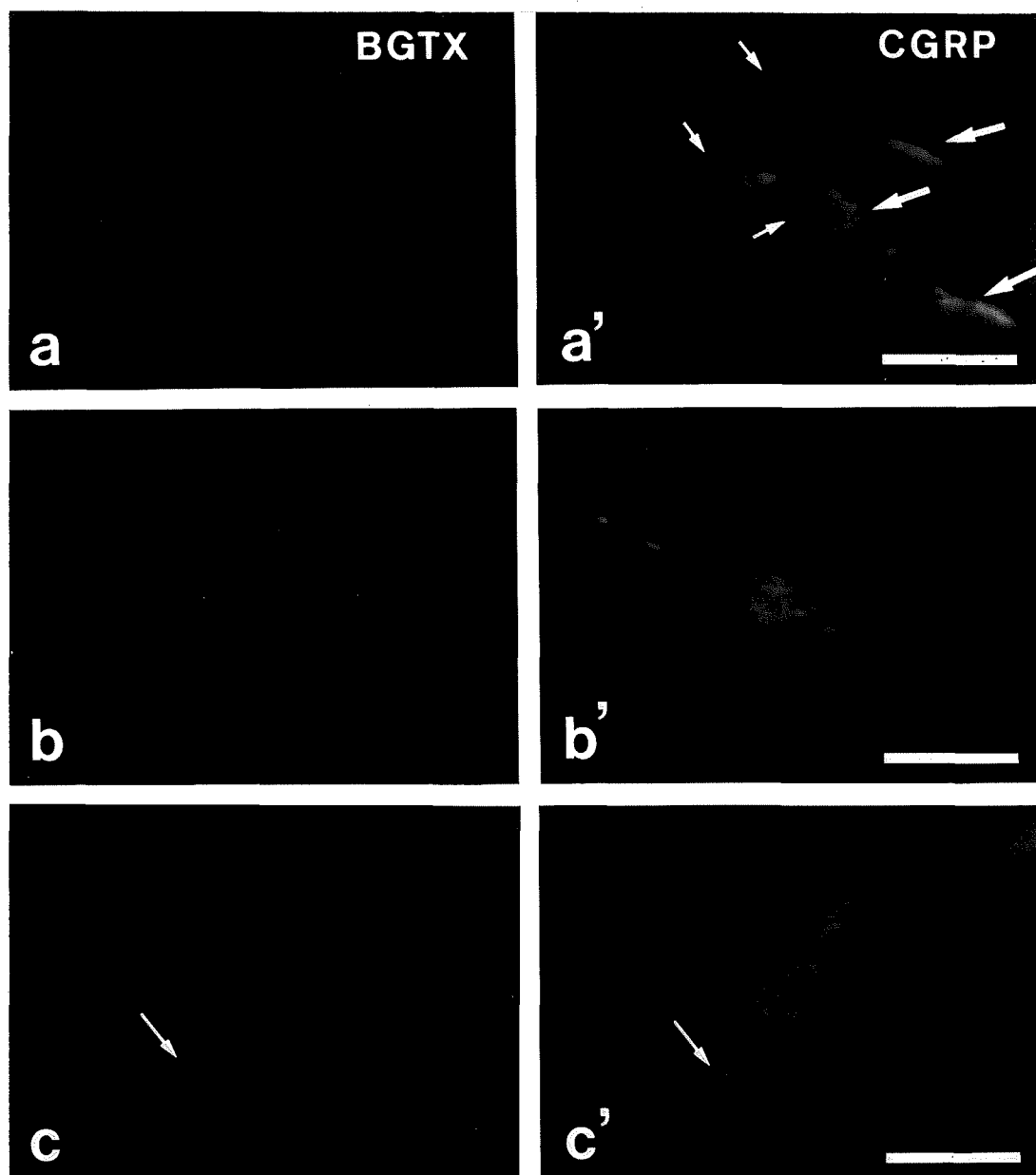


Fig. 22. (a-c') Plaques motores de músculs SOL després de 20 dies de la injecció de la BoTx. Les imatges s'han obtingut per un doble marcatge amb α -BGTX-TRITC i CGRP visualitzat de forma indirecta amb FITC. Les plaques motores es localitzen amb l' α -BGTX. Als 20 dies de la intoxicació les plaques són intensament immunoreactives al CGRP (*fletxes grans*), i fins i tot s'hi poden distingir els axons preterminals immunoreactius (*fletxes petites*) (a'). En algunes plaques motores es detecten brots immunoreactius que s'estenen allunyant-se de la zona ocupada per la placa motora (b'). En la placa motora de la imatge c' surt un brot immunoreactiu que a la part més distal acumula AchRs (*fletxa*). Barra de calibratge=50 μ m.

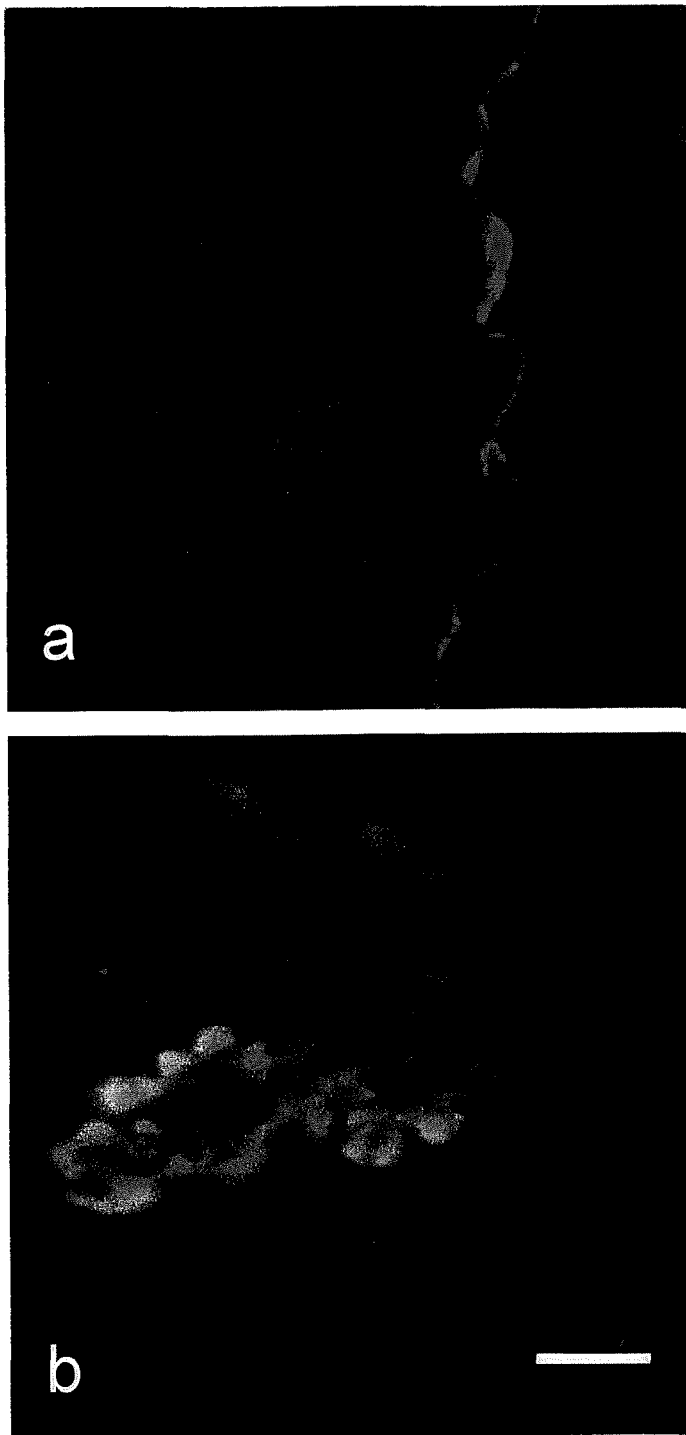


Fig. 23. Fotomicrografia obtinguda amb l'LSM d'una placa motora control (**a**) i després de 20 dies de la injecció de la BoTx (**b**). Les imatges mostren el doble marcatge simultani; els AchR detectats amb α -BGTX-TRITC (vermell) i l'immunomarcatge del CGRP amb FITC (verd). En **a** únicament s'observa a la placa motora fluorescència vermella, ja que no hi ha immunoreactivitat al CGRP; la fibra nerviosa CGRP positiva (verd) propera a la placa motora pertany a una petita població de fibres (sensorials o vegetatives) que no innerven les fibres musculars esquelètiques i que estan presents normalment en músculs control. En **b** la fluorescència vermella envolta els botons verds que estan connectats amb l'axó terminal. La diferent colocalització del dos marcadors fluorescents demostra la presència presinàptica del CGRP. Barra de calibratge=10 μ m.

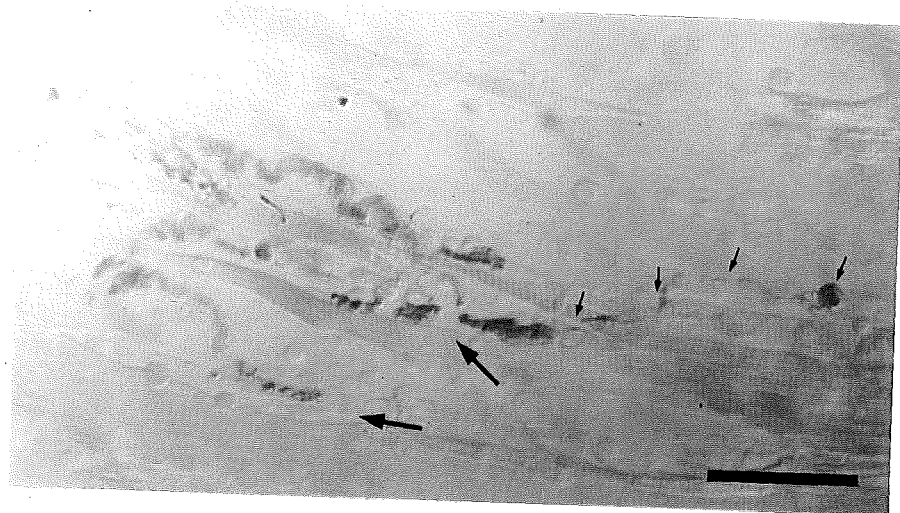


Fig. 24. Immunoreactivitat al CGRP obtinguda amb immunomarcatge per la tècnica PAP d'una secció de múscul després de 100 dies de la intoxicació amb BoTx. S'observa que les plaques motores (*fletxes grans*) i els axons preterminals són immunoreactius, i també es pot detectar un brot ultraterminal (*fletxes petites*) que finalitza amb un botó positiu al CGRP. Barra de calibratge=50 μ m.

2. Canvis en el CGRP de les plaques motores després de l'axotomia del nervi ciàtic.

L'aixafament del nervi ciàtic produïa un augment del CGRP en les plaques motores. En el múscul SOL vam observar un increment màxim als 11 dies de l'aixafament, coincidint amb el període en què té lloc la reinnervació muscular (Carmignoto et al., 1983; Ribaric et al., 1991) (Fig. 25). En aquest període també vam detectar terminals nerviosos immunoreactius que probablement pertanyien al nervi regenerant. Aquest pic als 11 dies coincidia amb l'increment del CGRP en el soma de les motoneurons després de lesionar-les mitjançant l'aixafament del nervi ciàtic (Calderó et al. 1992). Posteriorment, es produïa un decrement progressiu del CGRP però la immunoreactivitat es mantenia per sobre dels nivells basals més enllà dels 40 dies després de la lesió. Vam trobar diferències en la resposta a l'aixafament entre els músculs SOL i TA. En el múscul TA els nivells màxims d'immunoreactivitat al CGRP a les plaques motores es produïa als 22 dies de l'aixafament, encara que la resposta obtinguda era menys important que en el múscul SOL.

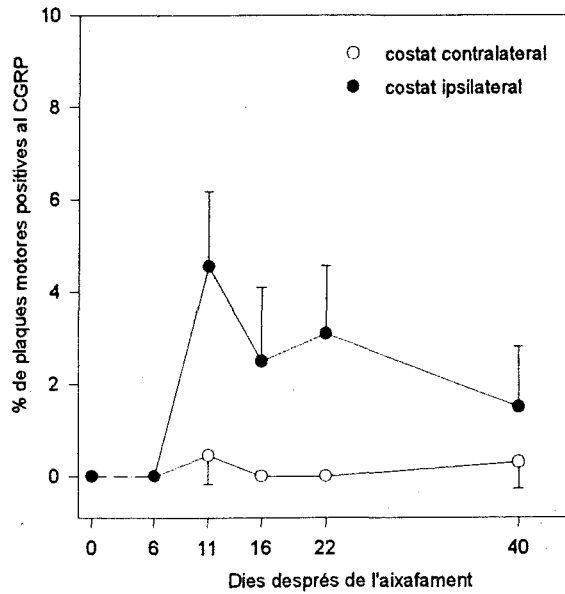


Fig. 25. Curs temporal dels canvis del CGRP de les plaques motores del múscul SOL després de l'aixafament del nervi ciàtic. La proporció d'unions neuromusculars que mostraven immunoreactivitat al CGRP es va comptabilitzar en el costat operat (ipsilateral) (●) i en el costat contralateral (○). Un mínim de 150 plaques motores es van avaluar a cada múscul. Els punts representen els valors de les mitjanes \pm 95% interval de confiança, n=2-3.

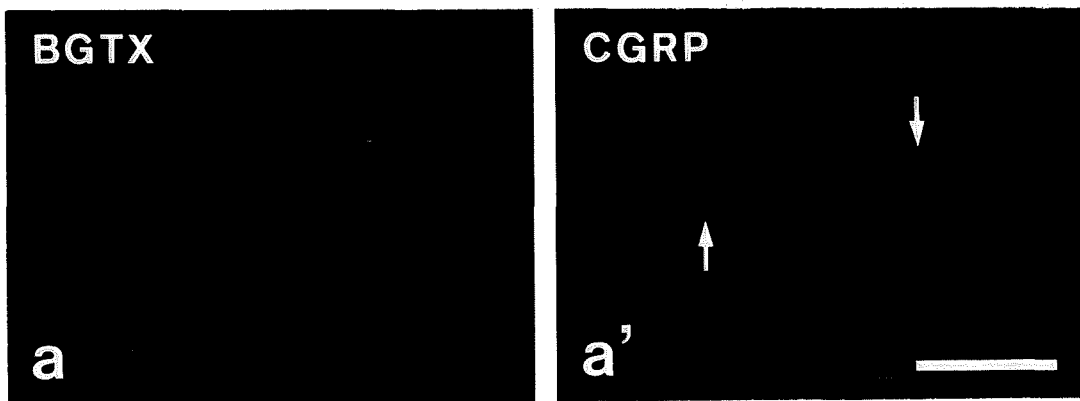


Fig. 26. (a') Immunoreactivitat al CGRP en una placa motora de múscul TA després de 22 dies de l'aixafament del nervi ciàtic. (a) Els AchR s'han localitzat amb α -BGTX-TRITC. Es detecten brots ultraterminals immunoreactius al CGRP (*fletxes*). Barra de calibratge=50 μ m.

3. Canvis en el CGRP de les plaques motores durant el desenvolupament.

És ben conegut que durant el període postnatal de la rata es produeix el fenomen de l'eliminació de la polinnervació, que contribueix en el refinament de les connexions sinàptiques quan els circuits que s'estan formant són utilitzats per primera vegada. La sinaptogènesi s'inicia en la rata a E12 i l'eliminació de la polinnervació es produeix entre P8 i P14 (Brown et al., 1976; Bennet, 1983; Colman i Lichtman, 1993). Aquest fenomen de l'eliminació de la polinnervació i maduració de les plaques motores coincideix amb importants canvis en el contingut del CGRP de les plaques motores (Fig. 27). En els nostres experiments no vam trobar a E19 immunoreactivitat al CGRP detectable, en canvi, a P4 la majoria de plaques eren positives al CGRP en tots els músculs estudiats. Entre P4 i P14 el contingut de CGRP anava disminuint progressivament i pràcticament desapareixia en les rates adultes (P31). Per millorar l'observació de les plaques motores en els primers períodes estudiats del desenvolupament es va utilitzar l'LSM (Fig. 28), ja que aquestes plaques eren petites, poc definides i pràcticament sense plecs. En la zona muscular on s'ubicaven les plaques motores es trobaven normalment moltes fibres positives al CGRP (Fig. 28).

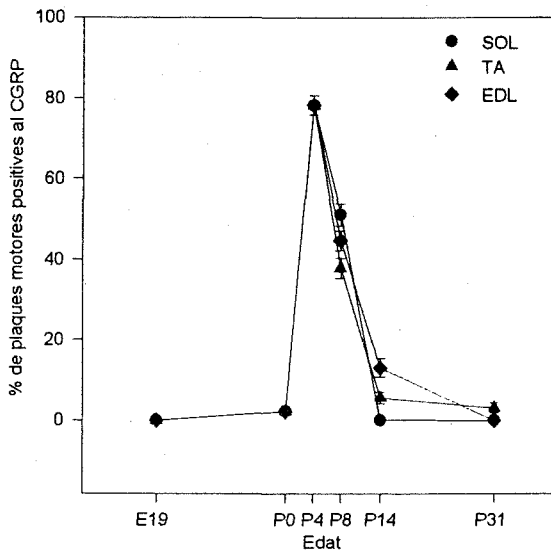


Fig. 27. Perfil dels canvis del CGRP que es produeixen durant el desenvolupament de les unions neuromusculars. La proporció de plaques immunoreactives al CGRP es va determinar el dia embrionari 19 (E19) i durant el període de maduració postnatal (P0-P31). Es van comptabilitzar un mínim de 150 plaques motores per múscul. Els punts representen els valors de les mitjanes \pm 95% interval de confiança, $n=2-3$.

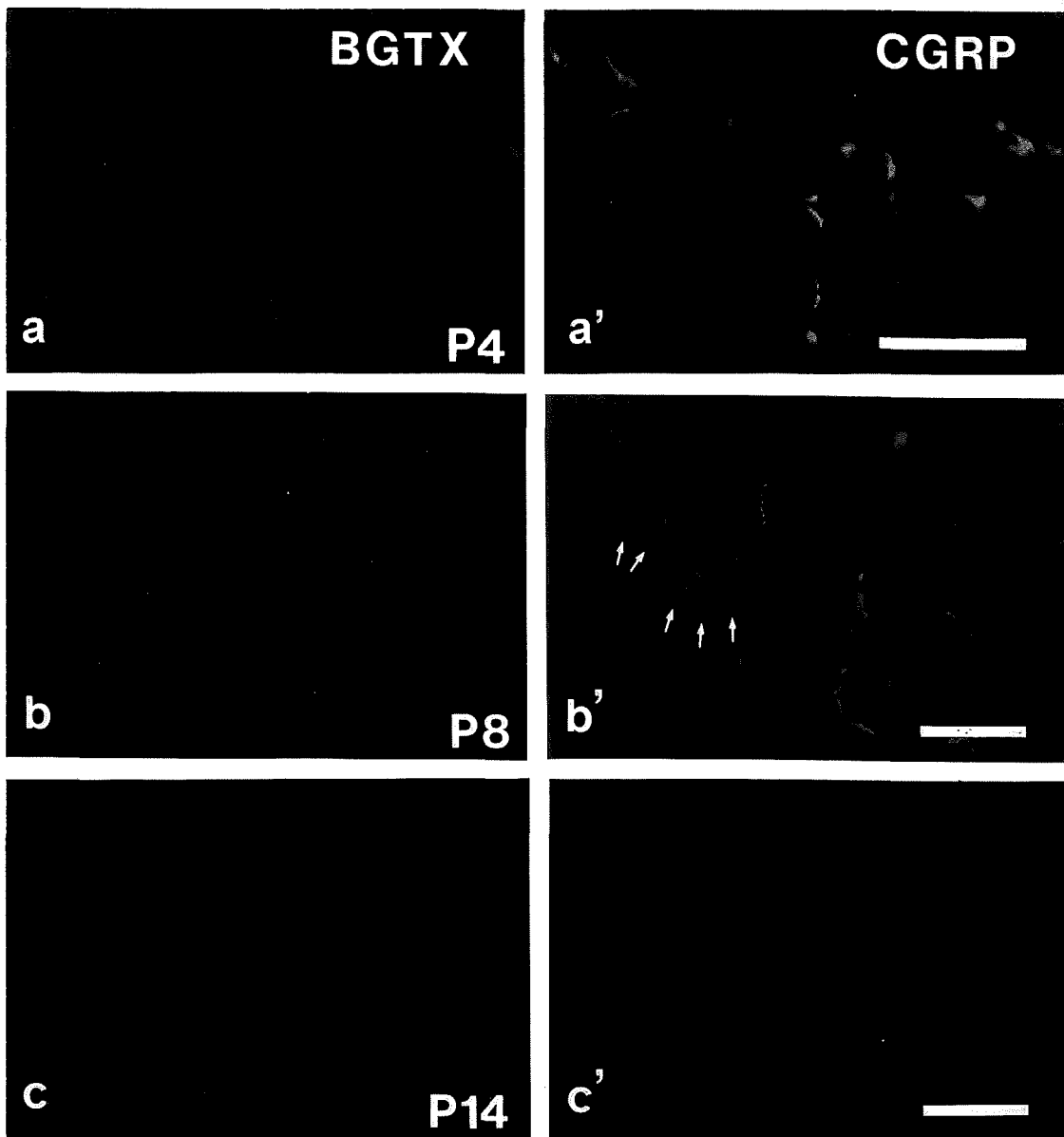


Fig. 28. Doble marcatge amb α -BGTX-TRITC (a, b, c) i un anticòs policlonal contra CGRP revelat amb FITC (a', b', c') de seccions de múscul durant el desenvolupament postnatal. Períodes del desenvolupament: (a i a') P4, (b i b') P8 i (c i c') P14. La BGTX s'uneix l'AchR i el CGRP es localitza en la part presinàptica de la placa motora i en nervis intramusculars. (a') Imatge obtinguda amb l'LSM que mostra un intens marcatge del CGRP pràcticament en totes les plaques motores de P4. (b') En les plaques motores del múscul EDL de P8 la intensitat del marcatge del CGRP disminueix (*fletxes*). També es detecten alguns nervis intramusculars immunoreactius. (c') En múscul EDL de rata de P14 destaca la absència de immunoreactivitat al CGRP en les plaques motores. Barra de calibratge=50 μ m.

4. Canvis en el CGRP de les plaques motores després del tractament amb CNTF.

El tractament diari subcutani amb CNTF sobre el múscul gluti durant 18 dies va incrementar el creixement dels terminals nerviosos de ratolí, sense produir cap tipus de lesió ni paràlisi. Es van analitzar la longitud i la complexitat dels terminals nerviosos situats únicament en les zones més superficials del múscul gluti, ja que és conegut que el CNTF té poca capacitat de difondre i penetrar fins a les regions més profundes del múscul (Gurney et al. 1992). La mesura dels paràmetres estudiats en els terminals nerviosos (longitud i complexitat) ens va permetre de determinar que els valors obtinguts eren més elevats en els músculs injectats amb CNTF que en els injectats amb el vehicle (tant en els músculs contralaterals dels animals injectats amb CNTF com en els músculs dels animals control). No vam observar resposta contralateral en els animals injectats amb CNTF (Fig. 29).

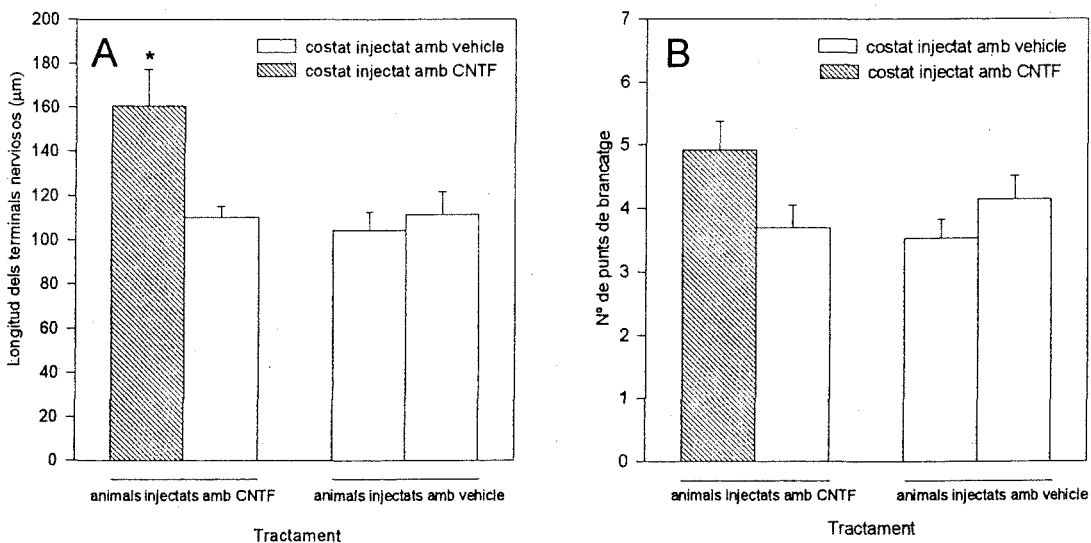


Fig. 29. Longitud (A) i nombre de punts de brancaatge (B) dels terminals nerviosos de músculs glutis de ratolí després de la injecció durant 18 dies de 500 ng de CNTF o bé de la solució vehicle. Els valors representen la mitjana ± SEM. Test t-Student, * $p < 0,05$, $n = 4$.

El creixement dels terminals nerviosos, induït pel CNTF, estava acompanyat per un augment de la immunoreactivitat al CGRP en les plaques motores del múscul gluti. Tant amb el comptatge visual directe amb el microscopi de fluorescència del percentatge de plaques motores immunoreactives, com amb la valoració per l'anàlisi de les imatges digitalitzades a l'LSM de la intensitat de la fluorescència de les plaques motores, obteníem increments similars en els múscul tractats amb CNTF (Fig. 30). Les plaques motores de ratolí tenien una morfologia característica que les diferenciava de les plaques motores de rata que en general són més petites. La localització del CGRP en els terminals nerviosos de ratolí també mostrava una distribució diferent quan les unions neuromusculars s'observen al microscopi confocal, així, mentre que a la rata la distribució del CGRP era homogènia en tota la placa motora, en el ratolí es distribuïa amb un patró puntejat (Fig. 31). L'axó preterminal d'algunes plaques motores també es distingia com a positiu al CGRP. Encara que eren més abundants els axons motors distals positius en les plaques motores dels músculs tractats amb CNTF, també es podien observar en algunes plaques motores control (Fig. 31). Les plaques motores més immunoreactives es localitzaven en les regions més superficials del múscul, probablement limitat per l'accessibilitat del CNTF. En les unions neuromusculars dels músculs contralaterals no es va observar augment d'immunoreactivitat al CGRP després de tractar l'animal amb el CNTF. (Fig. 30).

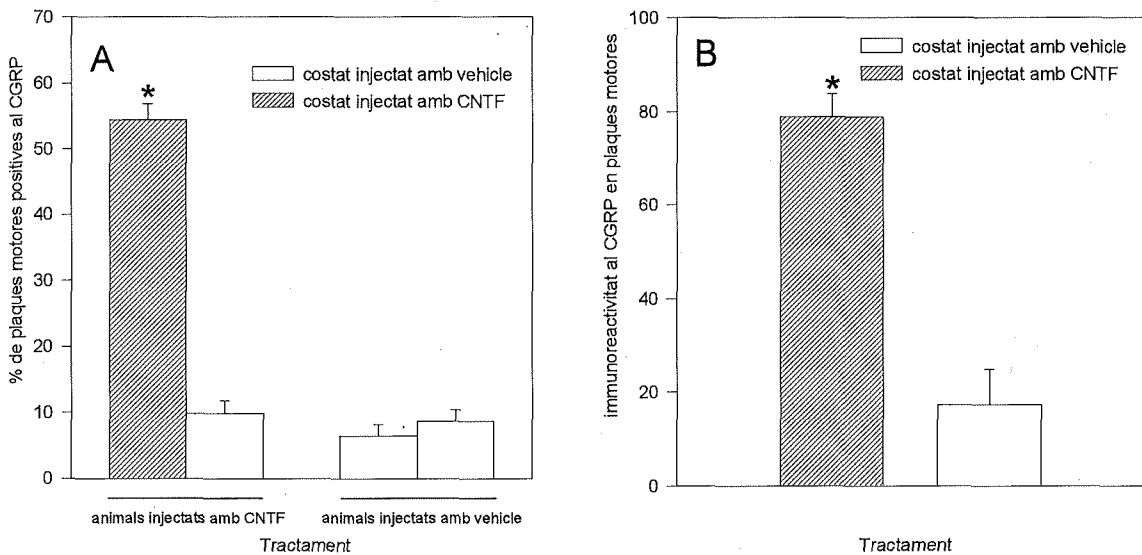


Fig. 30. Canvis del CGRP en les plaques motores superficials del múscul gluti després de 18 dies del tractament local amb 500 ng de CNTF. **(A)** Nombre de plaques motores positives al CGRP de músculs tractats amb CNTF respecte els músculs contralaterals i els controls injectats amb la solució vehicle. **(B)** Valoració de la intensitat d'immunoreactivitat al CGRP analitzada amb l'LSM de les plaques motores de músculs tractats amb CNTF i de músculs contralaterals injectats amb vehicle. En **A** s'han valorat un mínim de 150 plaques motores per múscul, els valors representen les mitjanes \pm 95 % interval de confiança, * $p < 0.001$, test Khi-quadrat. En **B** es va mesurar la intensitat d'immunoreactivitat de 20-35 plaques motores per múscul, els valors representen la mitjana \pm SEM, * $p < 0.001$, test t-Student. Es van estudiar quatre animals en cadascun dels experiments.

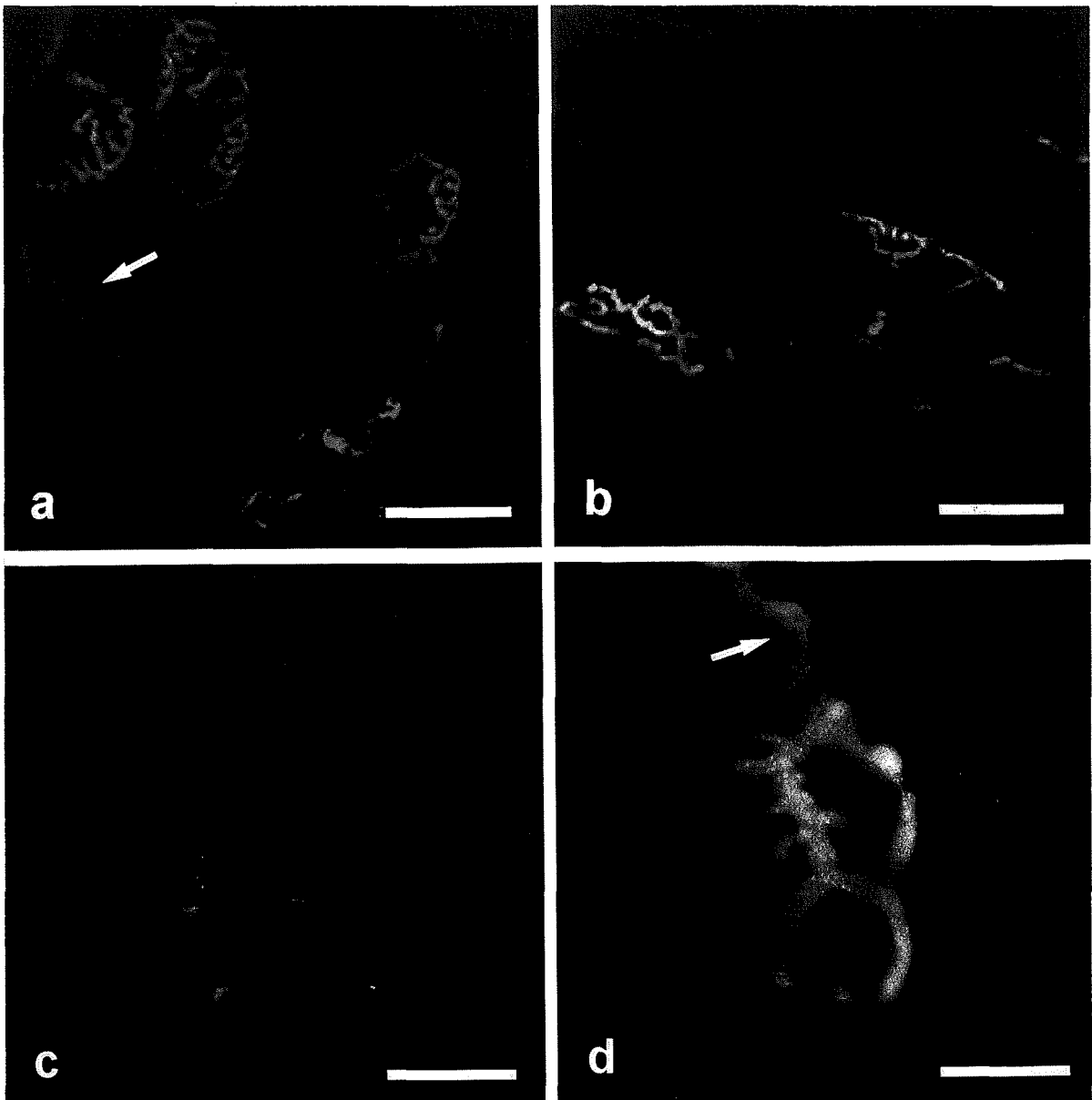


Fig. 31. (a-d) Imatges obtingudes amb l'LSM de seccions de múscul gluti de ratolí. S'observa el doble marcatge amb α -BGTX-TRITC (vermell) i el CGRP immunomarcant amb FITC (verd). (a) Plaques motores d'un múscul control que presenten molt poca immunoreactivitat al CGRP. Es distingeixen axons preterminals immunoreactius (*fletxes*). (b) Plaques motores intensament immunoreactives al CGRP de músculs tractats durant 18 dies amb CNTF. (c, d) Plaques motores a gran augment de múscul control (c) on es visualitza el patró puntejat que presenta el CGRP en les unions neuromusculars de ratolí, i de múscul tractat (d) on es veu l'increment d'immunoreactivitat al CGRP que es produeix a la placa motora i a l'axó preterminal (*fletxa*) després del tractament amb CNTF. Barres de calibratge=50 μ m per a i b, i 20 μ m per c i d.

5. Efectes de l'aplicació exògena de CGRP sobre els terminals nerviosos en rates paralizades amb BoTx.

La injecció subcutània diària de CGRP durant 10 dies en rates paralizades amb BoTx no va incrementar ni va disminuir de forma significativa el nombre de punts de brancaatge i la longitud dels terminal nerviosos dels músculs EDL respecte als animals paralizats injectats amb la solució vehicle (Fig. 32). Tanmateix, els increments de CGRP de les plaques motores dels músculs TA paralizats que es van analitzar tampoc van quedar afectats pel CGRP exogen (Fig. 33), ja que la proporció de plaques positives al CGRP era similar en els animals paralizats injectats diàriament amb vehicle o amb CGRP.

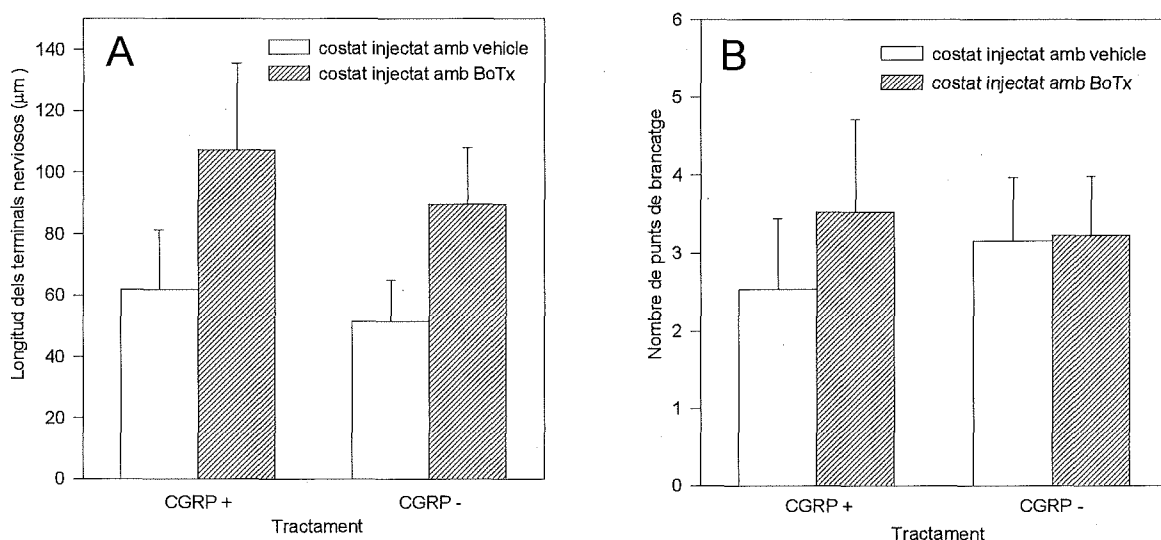


Fig. 32. Longitud (A) i nombre de punts de brancaatge (B) de terminals nerviosos obtinguts de músculs paralizats amb BoTx i injectats durant 10 dies amb 50 µg/dia de CGRP o bé amb una solució vehicle. Els valors representen tant en A com en B la mitjana ± SEM. Test t-Student, n=2.

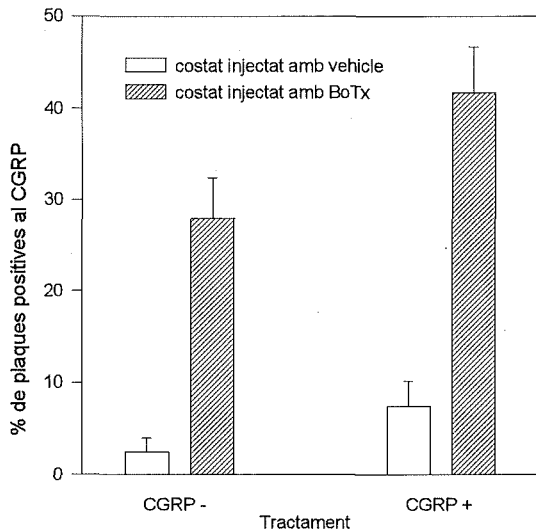


Fig. 33. Immunoreactivitat al CGRP de les plaques motores de músculs TA procedents d'animals paralizats amb BoTx i injectats amb 50 µg/dia o bé amb una solució vehicle. Els valors representen la mitjana del nombre de plaques motores positives ± SEM. Test t-Student, n=2.

6. Efectes del CGRP sobre la supervivència i el creixement neurític de motoneurons en cultiu.

És ben conegut que les motoneurons es poden rescatar de la mort tant *in vitro* (Dohrmann et al., 1986) com *in vivo* (Oppenheim et al., 1988) si es tracten amb MEX. Per tant, després de fer una purificació de motoneurons embrionàries de pollastre i per tal d'aconseguir una supervivència elevada vam mantenir-les en un medi amb MEX durant 48 h. Després d'aquest temps les motoneurons s'adherien al substrat i tendien a estendre els seus processos neurítics, arribant en alguns casos a fer contacte amb altres motoneurons veïnes (Fig. 34).

Es va estudiar si l'addició de CGRP en aquests cultius tenia algun efecte sobre la supervivència i el creixement neurític de les motoneurons.

6.1. Supervivència.

L'addició de CGRP en cultius de motoneurons de pollastre no té cap efecte significatiu sobre la supervivència de les mateixes. Després de 24 h de cultiu amb CGRP, es va observar que en els cultius amb MEX l'addició de CGRP no alterava la supervivència de

les motoneurons. D'altra banda, en absència d'MEX el CGRP produïa un debíl efecte i disminuïa la supervivència, però aquest efecte no arribava a ser significatiu (Fig. 35).

A les 48 h de cultiu pràcticament no es van observar variacions en la supervivència de les motoneurons. Semblaven produir-se petites disminucions en la supervivència dels cultius tractats amb CGRP (amb o sense MEX) que no es podien considerar significatives (Fig. 35).

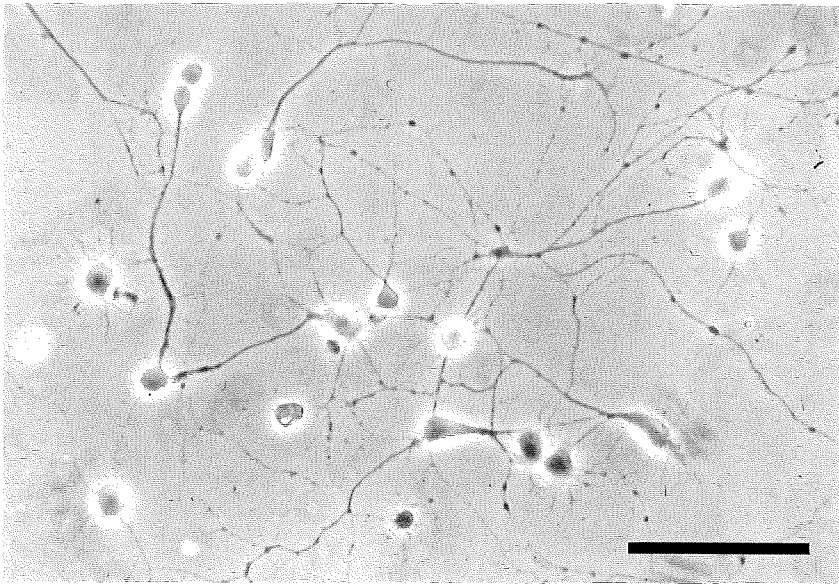


Fig. 34. Imatge obtinguda amb un microscopi de contrast de fase d'un cultiu de motoneurons de pollastre mantingut durant 48h amb MEX. Es pot distingir el cos birefringent de les motoneurons i els processos neurítics que creixen a partir del soma i que arriben a fer contacte amb algunes neurites de les motoneurons veïnes. Barra de calibratge=100 μ m.

6.2. Creixement neurític.

Després de realitzar l'estudi morfomètric de la longitud dels processos neuronals en les motoneurons en cultiu es van classificar en funció de la presència o absència de neurites i segons la longitud de les neurites. Es van establir els següents paràmetres: neurites curtes (de menys longitud que la suma de dues vegades el diàmetre cel·lular) i neurites llargues (de més longitud que la suma de dues vegades el diàmetre cel·lular). La taula 2 resumeix els valors obtinguts en l'estudi morfomètric dels diferents paràmetres.

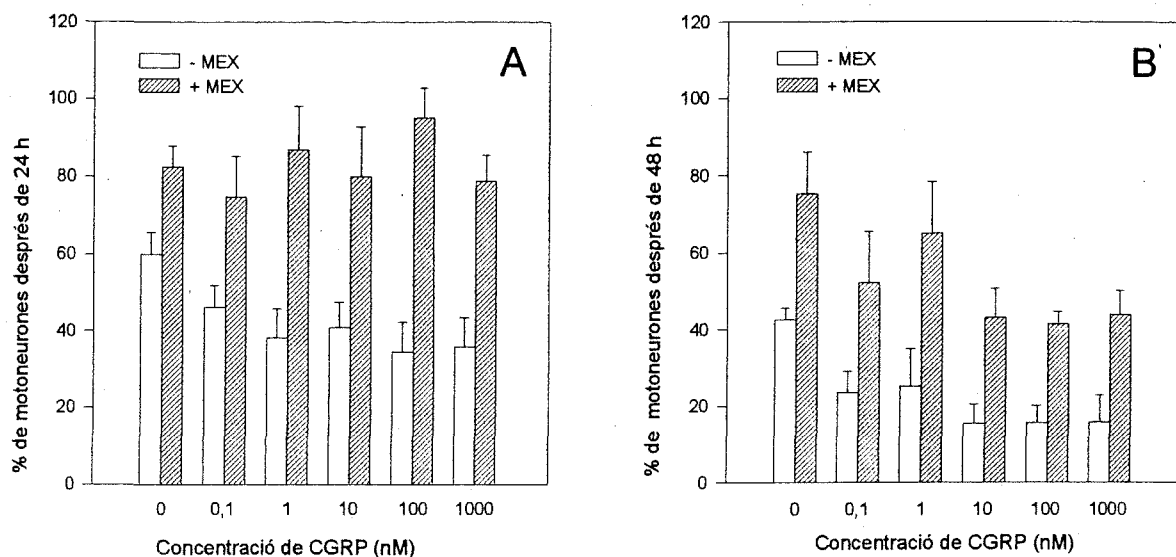


Fig. 35. Supervivència de les motoneurons de pollastre cultivades durant 24 h (A) i 48 h (B) amb diferents concentracions de CGRP. Es van valorar el nombre de motoneurons després de cada condició experimental respecte el nombre de motoneurons inicials. Les dades es van obtenir de 4-8 experiments. Els valors representen la mitjana \pm SEM, test Khi-quadrat.

El CGRP a 10 nM incrementava moderadament i de forma no significativa les motoneurons amb neurites curtes i llargues. En concentracions més elevades de CGRP (100 nM) semblava produir-se l'efecte contrari, és a dir, s'observava una tendència a la disminució de les motoneurons amb neurites, tant les curtes com les llargues; de tota manera aquestes variacions tampoc arribaven a ser significatives. En les taules 3, 4 i 5 els valors obtinguts s'expressen com la mitjana \pm SD. Els resultats s'han comparat amb el test estadístic de la t-Student. No s'hi observen diferències significatives.

	<i>CONTROL</i>	<i>CGRP 10 nM</i>	<i>CGRP 100 nM</i>
Cèl·lules totals	112	135	113
Cèl·lules sense neurites	20 (17.85%)	21 (15.56%)	42 (37.17%)
Cèl·lules amb neurites	92 (82.14%)	114 (84.44%)	71 (62.83%)
Cèl·lules amb neurites curtes	27 (24.10%)	36 (26.67%)	22 (19.47%)
Cèl·lules amb neurites llargues	65 (58.04%)	78 (57.78)	49 (43.36%)

Taula 2.

Valors morfomètrics de les neurones amb neurites de longitud més gran que dues vegades el diàmetre cel·lular (només s'han tingut en compte les neurites de longitud més gran que dos vegades el diàmetre cel·lular)

	<i>Control</i>	<i>CGRP 10 nM</i>	<i>CGRP 100nM</i>
Nº de neurones analitzades (en 4 pous independents)	65	78	49
Nº de neurites	2,52±1,66	2,91±1,93	2,47±2,06
Longitud mitja	6,13±4,61	5,85±5,88	5,59±4,03
Neurita màxima	8,12±6,40	8,62±7,82	7,97±7,00
Suma neurites	15,27±12,91	17,49±16,98	15,30±16,64

Taula 3.

Valors morfològics de les neurones amb neurites de longitud més gran que dues vegades el diàmetre cel·lular (s'han tingut en compte totes les neurites)

	<i>Control</i>	<i>CGRP 10 nM</i>	<i>CGRP 100 nM</i>
Nº de neurones analitzades (en 4 pous independents)	65	78	49
Nº de neurites	4,48±2,74	6,41±3,90	4,82±2,90
Longitud mitja	4,94±4,56	4,40±5,93	4,37±4,25
Neurita màxima	8,12±6,40	8,62±7,82	7,97±7,00
Suma neurites	17,35±12,58	20,91±16,34	17,95±16,23

Taula 4.

Valors morfològics del total de neurones tenint en compte totes les neurites

	<i>Control</i>	<i>CGRP 10 nM</i>	<i>CGRP 100 nM</i>
Nº de neurones analitzades (en 4 pous independents)	112	135	113
Nº de neurites	3,77±3,05	5,10±4,04	2,83±3,13
Longitud mitja	3,08±4,12	2,77±4,91	2,10±3,46
Neurita màxima	5,01±6,11	5,32±7,10	3,73±5,94
Suma neurites	11,01±12,25	13,18±15,46	8,48±13,62

Taula 5.