



**CONTRIBUCIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN  
EL PROCÉS DE MIELINITZACIÓ. APLICACIÓ DE DIFERENTS MODELS  
EXPERIMENTALS**  
**Jordi Tomàs Roig**

**ISBN: 978-84-693-8851-8**  
**Dipòsit Legal: T.1953-2010**

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Jordi Tomàs i Roig**

**Contribució del receptor domini discoidina 1  
(DDR1) en el procés de mielinització  
Aplicació de diferents models experimentals**

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Elisabet Vilella Cuadrada

Departament  
de Medicina i Cirurgia



Universitat Rovira i Virgili

Reus  
2010



**FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT**

Departament de Medicina i Cirurgia

Unitat de Psiquiatria i Psicologia Mèdica

Carrer de Sant Llorenç, 21

43201 – Reus

Tel. 977 75 93 45

Fax 977 75 93 22

**Hospital Psiquiàtric Universitari  
INSTITUT PERE MATA**

**Elisabet Vilella Cuadrada**, professora associada del Departament de Medicina i Cirurgia de la Universitat Rovira i Virgili i coordinadora d'investigació del Departament de Formació i investigació de l'Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata,

CERTIFICO:

Que el present treball, titulat "**Contribució del receptor domini discoidina 1 (DDR1) en el procés de mielinització. Aplicació de diferents models experimentals**", que presenta Jordi Tomàs Roig, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d'aquesta universitat i que aconsegueix els requeriments necessaris per a l'obtenció del títol de Doctor.

Reus, 28 d'Abril del 2010

## **Un sincer agraïment del vostre fill, germà, net i amic**

El camí ha estat llarg, amb alt i baixos, però, gràcies a la confiança que heu dipositat en mi, he pogut tirar endavant. És un homenatge, doncs, a totes les persones que han contribuït directa i indirectament en el desenvolupament d'aquesta tesis.

Donar les gràcies públicament a tota la meva família i amics per encoratjar-me en moments complicats i per l'esforç demostrat alhora de donar-me ànims durant els moments més amargs d'aquesta tesis.

Mare, has estat clau en la meva formació tant personal com intel·lectual. Ja des dels inicis no m'has deixat mai com impossible sinó que has lluitat perquè tant jo com la resta dels teus fills siguem persones de bé.

Pare, a la teva manera, tu també m'has aportat valors/actituds que sempre tindrè present al llarg de la meva vida.

Gràcies, com no, als més petits de la casa, els meus germans Pau, Àlex i Naiara per omplir-me de felicitat i alegria fent-me partícip de la vostra innocència, amor i tendresa.

Didac, tot i que no t'ho creguis, he après molt de tu. El teu saber estar davant de situacions complicades, la maduresa que demostres amb la teva forma de ser i actuar, el bon professional que ets en el teu treball, m'han enriquit molt. No ho dubtis!

Avis, l'afecte i comprensió que meu demostrat, així com els vostres savis consells, m'han permès créixer com a persona amb humilitat i serenitat. M'agradaria que prengueu aquesta tesis com un reconeixement sincer, per la meva part, a la vostra labor educadora i social.

Juanjo, gràcies per estar en tot moment al nostre costat, sabent estar sempre a l'altura de les circumstàncies i vetllant sempre pel benestar d'aquesta família.

Resta de familiars i amics més propers, gràcies per ser tal i com sou i estar en el lloc adequat i en el moment oportú.

A efectes d'execució de la part experimental, recerca bibliogràfica i redacció d'aquesta tesis doctoral donar gràcies com no, a la meva tutora, al grup d'Investigació en Psiquiatria, a la Unitat de Toxicologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, al personal del Centre de Recerca Biomèdica de l'hospital Sant Joan de Reus, als membres que conformen el grup de recerca en Lípids i al grup de recerca encapçalat pel Dr. Wolfgang F. Vogel de Toronto.

Elisabet, Lourdes i Bàrbara, sense els vostres consells i ajuda, no hagués pogut assolir els diferents objectius proposats en la meva tesis. Gràcies Bàrbara per ser la meva “guia” científica i estar en tot moment al meu costat.

Teresa, Marga i Mònica, gràcies per la vostra aportació en l’execució dels estudis fets en el model murí de des/remielinització per cuprizona. Els coneixements en l’aplicació de tests de comportament animal i en la manipulació i processament de mostres biològiques els he adquirit gràcies a la vostra professionalitat.

Wolfgang, Sebastian i Nidi, treballar junts a la Universitat de Toronto durant 5 mesos de la meva etapa de formació predoctoral, m’ha obert nous horitzons en vers la metodologia del treball científic, el treball en equip i la humilitat que meu demostrat sempre. Us agrairé sempre el tracte rebut tant en l’àmbit professional com personal. Possiblement no vaig estar a l’altura de les circumstàncies, però, des d’aquesta introspecció vull agrair-vos tot el que vareu fer per mi i disculpar-me davant els possibles errors comesos. Wolfgang, poc després del meu retorn a Espanya, vaig rebre la fatal notícia de la teva mort. M’hagués agradat que haguessis pogut conèixer molts aspectes, tant a nivell personal com laboral, que en el seu moment no vaig poder demostrar-te i que crec que avui et farien canviar la concepció que tenies de mi. Ara ja és massa tard, tot i que espero que aquest missatge se’t sigui entregat allà on siguis.

Amb aquest sincer agraïment, m’agradaria que quedés pales el molt que us dec a tots vosaltres per ajudar-me a aconseguir, cadascun a la vostra manera, el somni que tant he anhelat des de que vaig començar a estudiar biologia: arribar a ser una persona vàlida per exercir la recerca.

Per concloure, citar una apologia xinesa que resumeix el missatge que he pretès transmetre a tota la gent que ha contribuït en la posta en marxa d’aquesta tesis doctoral:

-Mira, va dir l’amic a l’amic sobre el pont,  
la felicitat dels peixos del riu.

Però l’altre va contestar: -Com pots conèixer,  
si no ets peix, la seva felicitat dins del riu?

Respongué: -Per la meva felicitat sobre el pont.



# Índex

## Índex

Justificació.....	9
1. Introducció.....	12
1. Esquizofrènia.....	13
2. DDR1 i esquizofrènia.....	14
3. DDR1 i mielina.....	15
4. Mielina.....	16
1. Composició de la mielina.....	19
1. Proteïnes.....	19
2. Lípids.....	23
2. Origen i maduració del llinatge oligodendroglial.....	23
3. Distribució de les proteïnes de mielina en els oligodendròcits.....	24
4. Mielinització.....	25
1. Reconeixement oligodendròcit-axó.....	26
2. Síntesi de la mielina i formació del domini paranodal.....	26
3. Alteracions en el comportament dels ratolins deficients per proteïnes de mielina.....	28
5. Models experimentals de desmielinització i remielinització.....	30
1. Model per administració de cuprizona.....	31
5. DDR1.....	34
1. Estructura gènica.....	35
2. Estructura proteica.....	35
1. Regió extracel·lular: domini discoidina i regió <i>stalk</i> .....	36
2. Regió jxtamembrana.....	37
3. Regió intracel·lular: domini tirosina quinasa i cua C-terminal.....	38
3. DDR1 i SNC.....	39
4. Paper de DDR1 en altres teixits.....	41
2. Hipòtesi.....	42
3. Objectius.....	44
4. Material i mètodes.....	46
1. Material.....	47
1. Mostra de l'estudi 1.....	47
2. Mostra de l'estudi 2.....	47
3. Mostra de l'estudi 3.....	47

2. Antecedents.....	47
1. Model de desmielinització i remielinització per DDR1 +/+.....	47
2. Model de desmielinització i remielinització per DDR1 +/+ i -/-.....	48
3. Diferenciació de la línia cel·lular oligodendroglial HOG16.....	49
3. Disseny experimental.....	49
1. Disseny experimental estudi 1.....	49
2. Disseny experimental estudi 2.....	51
3. Disseny experimental estudi 3.....	52
4. Metodologia emprada.....	54
1. Tractament del teixit.....	54
2. Mesures del gruix de mielina i el diàmetre de l'axó.....	54
3. Test de comportament.....	54
1. Bateria d'observació funcional.....	55
2. Activitat a camp obert.....	55
3. Coordinació motora i aprenentatge.....	56
4. Suspensió corporal.....	56
5. Petjades.....	57
6. Dos compartiments.....	57
7. Immunohistoquímica de fluorescència.....	57
8. Aïllament del RNAm.....	58
9. Quantificació d'RNAm per RT-PCR a temps real.....	58
10. Anàlisi d'imatge.....	59
11. Anàlisi estadística.....	59
5. Resultats.....	60
1. Estudi 1.....	61
1. Antecedents.....	61
2. Objectius.....	61
3. Resultats.....	62
2. Estudi 2.....	70
1. Antecedents.....	70
2. Objectius.....	70
3. Resultats.....	71
3. Estudi 3.....	82
1. Antecedents.....	82



2. Objectius.....	82
3. Resultats.....	82
6. Discussió.....	85
7. Conclusions.....	95
8. Bibliografia.....	97



# Justificació

L'esquizofrènia és una malaltia psiquiàtrica complexa en la que influeixen la combinació de factors genètics i factors ambientals. Fins a la actualitat s'han identificat múltiples gens associats a l'esquizofrènia però no s'ha pogut establir que cap alteració genètica sigui causant de la malaltia.

Una de les hipòtesis etiopatològiques més recolzades per l'esquizofrènia en les últimes dècades, és la teoria del neurodesenvolupament. Aquesta hipòtesi postula que l'origen de la esquizofrènia tindria lloc per alteracions de la neurogènesi i gliogènesi en les etapes del desenvolupament perinatal. La manifestació clínica d'aquestes alteracions no tindria lloc fins al final de l'adolescència.

L'any 1998 el nostre grup es va interessar pel gen del Receptor Domini Discoidina 1 (DDR1) com a possible gen candidat en l'esquizofrènia.

Es van iniciar dues línies d'investigació diferents que han donat lloc a 3 tesis doctorals ja defensades:

1. Anàlisi mutacional i estudi d'associació del gen receptor domini discoidina 1 (DDR1) en l'esquizofrènia. Tesi doctoral defensada l'any 2004 per Carme Virgos.
2. Expressió del receptor domini discoidina 1 (DDR1) durant el desenvolupament dels sistema nerviós central en ratolí. Relació amb el procés de mielinització. Tesi doctoral defensada l'any 2006 per Neus Franco.
3. Expressió del receptor domini discoidina 1 (DDR1) en cervell humà. Relació amb l'esquizofrènia. Tesi doctoral de Bàrbara Roig defensada el 2007.

Els resultats d'aquests estudis s'han publicat en els següents articles:

Franco-Pons N, Tomas J, Roig B, Auladell C, Martorell L, Vilella E (2009) Discoidin domain receptor 1, a tyrosine kinase receptor, is upregulated in an experimental model of remyelination and during oligodendrocyte differentiation in vitro. *J Mol Neurosci* 38:2-11.

Franco-Pons N, Virgos C, Vogel WF, Urena JM, Soriano E, del Rio JA, Vilella E (2006) Expression of discoidin domain receptor 1 during mouse brain development follows the progress of myelination. *Neuroscience* 140:463-475.

Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, Vilella E (2007) Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol Lett* 169:205-213.

Roig B, Franco-Pons N, Martorell L, Tomàs J, Vogel WF, Vilella E (2010) Expression of tyrosine kinase discoidin domain receptor 1 (DDR1) in human central nervous system myelin. J Brain Research 10.1016/j.brainres.2010.03.099

Roig B, Virgos C, Franco N, Martorell L, Valero J, Costas J, Carracedo A, Labad A, Vilella E (2007) The discoidin domain receptor 1 as a novel susceptibility gene for schizophrenia. Mol Psychiatry 12:833-841.

La línia de recerca de DDR1 en relació amb l'esquizofrènia continua activa en el grup i es segueix tant el model experimental *in vivo* (estudiant el comportament en pacients esquizofrènics en funció de les variants del gen DDR1 o estudiant ratolins) com *in vitro* (línies cel·lulars, estudi de teixit).

La present tesi doctoral es centra en dos models. Per una banda s'ha estudiat l'expressió de DDR1 en línies cel·lulars oligodendroglials sotmeses a diferenciació. Per altra banda s'ha aprofundit en l'avaluació conductual del model murí de desmielinització-remielinització induïda per cuprizona. Finalment s'ha caracteritzat tant histològicament com funcionalment el ratolí deficient en DDR1.



# Introducció

## 1. Esquizofrènia

L'esquizofrènia és un trastorn mental que presenta alteracions de diversos aspectes de la constitució psíquica de l'individu i una desorganització dels aspectes de la personalitat que afecta alguns atributs humans fonamentals com el llenguatge, el pensament, la percepció, l'afectivitat i el sentit d'un mateix.

El deteriorament de la funcionalitat mental en aquests malalts interfereix notablement amb la seva capacitat per afrontar algunes de les demandes ordinàries de la vida o mantenir un adequat contacte amb la realitat.

L'activitat cognitiva de l'esquizofrènic no és normal, hi ha incoherències, desconexions i existeix una gran repercussió en el llenguatge, doncs no pensa ni enraona de forma normal.

Té una prevalença aproximada d'un 1% en la població mundial i es caracteritza per ser una malaltia crònica, severa i recurrent, i que comporta un gran impacte en la vida social del malalt i del seu entorn familiar. Els símptomes de la malaltia inclouen al·lucinacions auditives i visuals, i idees delirants.

L'esquizofrènia afecta per igual en homes que en dones, tot i que en el cas dels homes l'edat d'inici es troba generalment entre els 16 i 24 anys, mentre que en les dones l'edat d'inici és entre els 20 i 34 anys.

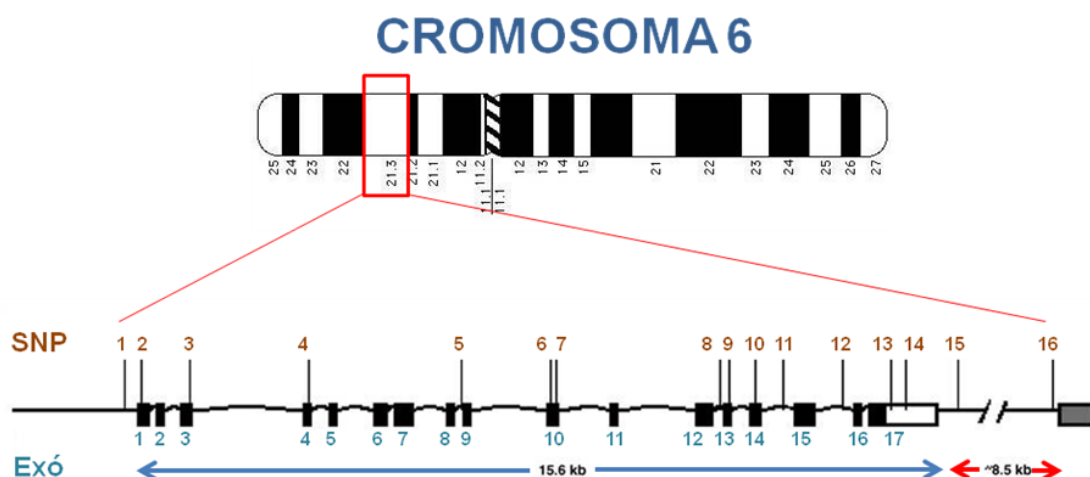
Hi ha diverses teories per a explicar l'etiopatogènia de l'esquizofrènia. Una se centra en els neurotransmissors, principalment la dopamina, el glutamat, l'acetilcolina, la serotonina, el GABA i la noradrenalina (Owen i Simpson, 1994). Una altra hipòtesi es basa en un factor metabòlic que és el de la transmetilació (Smythies, 1983). Torrey i Peterson varen proposar la hipòtesi viral per l'esquizofrènia que postula que el desencadenament de la malaltia seria una infecció vírica (Torrey i Peterson, 1976). També s'ha proposat la hipòtesi dels fosfolípids de membrana que es focalitza en la importància d'aquestes molècules en el correcte funcionament de les neurones (Pettegrew et al., 1991). Finalment, la hipòtesi del neurodesenvolupament (Weinberger, 1987) postula que l'origen de l'esquizofrènia tindria lloc per alteracions durant el desenvolupament embrionari del cervell que conferirien susceptibilitat a desenvolupar la malaltia en l'adolescència. Durant l'etapa postnatal i infantesa tenen lloc una sèrie de processos de maduració en el cervell humà i no és fins al final de l'adolescència que es considera que el cervell és madur i es caracteritza per presentar el volum màxim de substància grisa. A partir d'aquesta etapa, la substància grisa es va reduint progressivament al llarg de tota la seva vida. Tots els

processos de maduració que tenen lloc fins a l'etapa de l'adolescència, juntament amb factors ambientals estressants, provocarien la manifestació clínica tardana d'alteracions latents.

Hi ha múltiples evidències que donen suport a aquesta teoria. S'ha vist que els malalts esquizofrènics poden presentar alteracions morfològiques en el cervell a l'inici de la malaltia que romanen estàtiques i que no progressen al llarg de la malaltia com són l'agènesi parcial o total del cos callós, l'eixamplament dels ventricles laterals acompanyat de reduccions en volum dels lòbuls temporal i frontal, i del nucli talàmic, i/o les alteracions neuronals des del punt de vista d'organització, especificitat i connectivitat. Un altre fet que dóna suport a la teoria del neurodesenvolupament és l'absència de gliosis que poden presentar els malalts. S'entén com a *gliosis* la manifestació del cervell en resposta a un dany amb expressió de cèl·lules necròtiques i/o apoptòtiques. Per tant, alteracions cerebrals sense gliosis són indicatives d'alteracions que tenen lloc durant el desenvolupament del cervell.

## 2. DDR1 i esquizofrènia

Un únic estudi publicat fins al moment i realitzat en el nostre grup, ha vinculat el gen receptor domini discoidina 1 amb l'esquizofrènia. En aquest estudi es va trobar associació entre una variant nucleotídica o SNP (del anglès *Single Nucleotide Polymorphism*) del gen DDR1 amb l'esquizofrènia (Roig et al, 2007). En concret es va trobar associat l'SNP rs1049623 (Figura 1). Quan es va estratificar l'anàlisi per gènere l'associació entre l'SNP rs1049623 i esquizofrènia existia només en homes. En el mateix treball es va demostrar que l'expressió del gen, mesurada per la tècnica d'RT-PCR quantitativa en limfòcits de sang perifèrica obtinguts dels pacients, era diferent en funció del genotip de l'SNP rs1049623 que cada individu tenia. Es a dir els individus homozigots per l'al·lel de risc mostraven unes concentracions d'RNAm de DDR1 significativament inferior que els altres (Roig et al., 2007).



**Figura 1.** Distribució SNP's DDR1 en 6p21.3. El gen DDR1 en humans està compost per 17 exons distribuïts en 15.6 kb del genoma. Un total de 16 SNP's han estat detectats en aquesta regió, dels quals un s'ha vist que presenta una clara associació amb l'esquizofrènia (SNP 9).

### 3. DDR1 i mielina

En ratolí, DDR1 es troba expressat en oligodendròcits madurs i presenta els seus nivells més alts d'expressió durant l'estadi de mielinització post natal, al voltant del dia postnatal 15 (Franco-Pons et al., 2006). En l'adult els nivells d'expressió no són tant alts però es mantenen en alguns oligodendròcits madurs.

En humà vam detectar per marcatge combinat d'hibridació in situ de DDR1 i d'immunohistoquímica pel marcador Factor von Willebrand, la col·localització de DDR1b en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis en cervell humà. Per la tècnica d'RT-PCR a temps real vam quantificar l'expressió de l'RNAm de les 5 isoformes conegudes de DDR1 en el còrtex cerebral humà. Vam observar que la isoforma més abundant en cervell humà era DDR1b, seguit de DDR1c i DDR1a. L'expressió de les isoformes d i e de DDR1 va ser inferior a 1. Envers aquests resultats, ens vam plantejar quantificar l'expressió de les 5 isoformes de DDR1 en les línies cel·lulars humanes d'oligodendròcits HOG16 i MO3.13, la línia cel·lular endotelial HUVEC i la línia cel·lular de carcinoma de còlon. Vam veure que DDR1b és la isoforma que més s'expressa en totes les línies cel·lulars, i presenta uns nivells d'expressió deu vegades superior en les cèl·lules HUVEC en comparació el còrtex humà. Quan els valors d'expressió de DDR1b es van treure vam veure que DDR1c és la segona isoforma de DDR1 més abundant, essent 4 vegades superior en còrtex humà que en la resta de línies cel·lulars. La tercera isoforma més abundant és



DDR1a amb una valor d'1 ja que es va considerar com el valor de referència. Les isoformes DDR1d i DDR1e van presentar valors d'expressió menors d'1 en totes les línies cel·lulars analitzades.

Es va estudiar l'expressió proteica en cervell humà de DDR1. L'anticòs DDR1 C-terminal va marcar intensament la substància blanca i les fibres de mielina de la substància grisa mentre que l'anticòs DDR1 N-terminal presentà un marcatge restrictiu de cèl·lules endotelials de vasos sanguinis en la substància grisa, patró molt similar a l'obtingut amb la hibridació *in situ*. En la substància blanca a part del marcatge endotelial també es va observar un marcatge cel·lular de morfologia estel·lar i mida compatible amb la morfologia de cèl·lules gials, com els astròcits i els oligodendròcits.

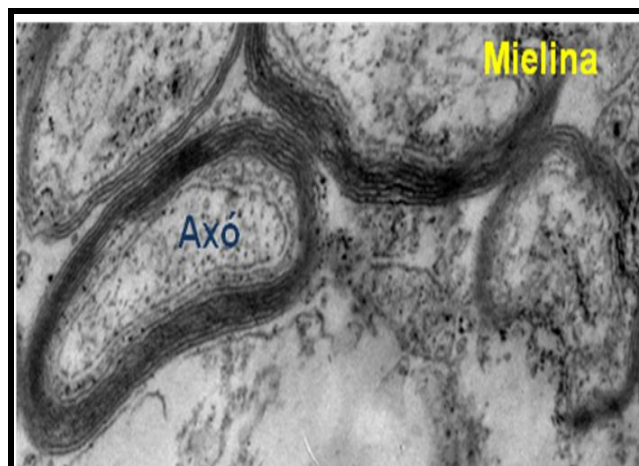
Per tal de caracteritzar les cèl·lules que expressen DDR1 es va realitzar un estudi de col·localització amb diferents marcadors histològics. El marcatge de fibres de mielina per part de l'anticòs DDR1 C-terminal es va comparar amb el marcador de mielina MBP. Els nostres resultats van mostrar una clara col·localització de marcatge entre els dos marcadors.

Es va emprar com a marcador d'astròcits la GFAP i com a marcador d'oligodendròcits madurs l'APC. Els nostres resultats van demostrar que DDR1 estava present només en algunes cèl·lules GFAP positives de la substància blanca i que alguns oligodendròcits expressaven la part extracel·lular de DDR1 en el seu cos cel·lular (tesi doctoral B Roig, 2007).

Tots aquests resultats suggereixen que DDR1 participa en el desenvolupament i manteniment de la beina de mielina.

#### 4. Mielina

La mielina és el principal component de la substància blanca en l'SNC. Es tracta d'una estructura espiral constituïda per extensions de membrana citoplasmàtica de les cèl·lules gials mielinitzants, els *oligodendròcits*. Aquesta estructura es coneix com a *beina de mielina* i observada en talls transversals al microscopi electrònic presenta una estructura periòdica formada per línies concèntriques denses alternades amb línies concèntriques clares (Figura 2).



**Figura 2.** Secció coronal àrea de substància blanca en la qual s'indica la localització del axó i de la mielina. La mielina en microscopia electrònica apareix com una estructura multilaminar de bandes denses i bandes clares. L'escala emprada ha estat de 1000 nm.

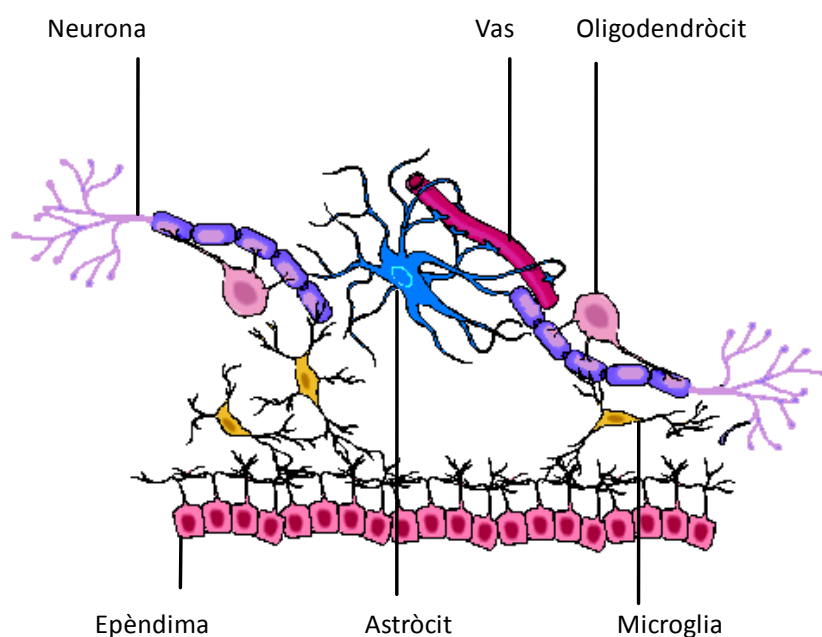
Els oligodendròcits, terme introduït per Rio Hortega l'any 1928, són cèl·lules neuroglials en les quals per tècniques d'impregnació metàl·lica es marquen clarament molts processos cel·lulars. Són les cèl·lules predominants de la substància blanca, però també estan a la substància grisa. En la substància blanca aquestes cèl·lules es coneixen com a *oligodendròcits interfasciculars*, ja que són responsables de la producció i manteniment de les beines de mielina de les fibres nervioses de l'SNC. En la substància grisa embolcallen les cèl·lules nervioses, donen suport neuronal i reben el nom d'*oligodendròcits satèl·lits* (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

Els oligodendròcits es caracteritzen per la seva morfologia: cos cel·lular petit, nuclis petits i esfèrics amb cromatina densa, citoplasma amb elevada densitat electrònica i alt contingut de reticle endoplasmàtic i poliribosomes, absència de filaments intermedis i presència d'un gran nombre de microtúbuls llargs en els seus processos (Snell, 2003).

Com ja s'ha comentat prèviament, els oligodendròcits interfasciculars formen les beines de mielina. Aquestes cèl·lules es presenten en files entre els axons mielínics i són els seus processos citoplasmàtics els que formen les beines. Un oligodendròcit conté diversos processos citoplasmàtics, cadascun dels quals contacta i embolcalla repetidament un axó. En un mateix axó coexisteixen beines de mielina adjacents de diferents oligodendròcits. Per una altra banda, el nombre de processos citoplasmàtics que formen les beines de mielina a partir d'un sol oligodendròcit varia segons l'àrea de l'SNC. A part dels oligodendròcits hi ha 3 tipus principals de

cèl·lules neurogials en l'SNC: els astròcits, la microglia i l'epèndima o cèl·lules endimàries (Figura 3).

L'aposisió de les superfícies citoplasmàtiques de les prolongacions dels oligodendròcits formen les línies denses. La fusió de les parts extracel·lulars de les membranes dels oligodendròcits generen les línies clares. Cada beina de mielina té una longitud aproximada de 150-200  $\mu\text{m}$ , té una elevada resistència a la pèrdua de corrent i una elevada capacítància. La beina de mielina és discontinua, ja que s'interromp en intervals regulars formant els nòduls de Ranvier. La beina de mielina i els nòduls de Ranvier són importants en la velocitat i el tipus de conducció sinàptica elèctrica dels axons (figura 4). La mielina és una estructura poc hidratada (40% aigua) en comparació amb la substància grisa i està constituïda per un 70% de lípids i un 30% de proteïnes, fet que la fa peculiar respecte les altres membranes cel·lulars que presenten generalment una relació lípid-proteïna inversa. El seu gruix, el seu baix contingut en aigua i la seva riquesa en lípids facilita la ràpida transmissió sinàptica dels senyals entre neurones (Baumann and Pham-Dinh, 2001).



**Figura 3.** Tipus cel·lulars en el Sistema Nerviós Central. Aquest està compost per neurones i cèl·lules gials. Els oligodendròcits, astròcits i la microglia estan íntimament associats amb les neurones. Els oligodendròcits tenen la funció de recobrir els axons de les neurones i formar la beina de mielina. Els astròcits tenen funció tròfica i estan associats amb els vasos sanguinis. Les cèl·lules de l'epèndima revesteixen els ventricles i contribueixen en la circulació del fluid cerebroespinal.

## 4.1. Composició de la mielina

La mielina té dos constituents específics: les proteïnes i els glicolípidis que són sintetitzades pels oligodendròcits.

### 4.1.1. Proteïnes

Les proteïnes de la mielina comprenen el 30% dels pes de la mielina. El 80% del total proteic està compost per dues proteïnes de baix pes molecular: l'MBP (de l'anglès, *myelin basic protein*) i la isoforma DM20 de la PLP (de l'anglès, *proteolipid protein*).

A continuació es fa una breu descripció de les proteïnes més rellevants en la mielina:

#### *MBP* (de l'anglès, *myelin basic protein*)

És una família proteica que constitueix el 30% de les proteïnes de la mielina. En humans el gen de l'MBP està compost per 7 exons distribuïts al llarg de 45 kb en la regió cromosòmica 18q22-qter (Saxe et al., 1985; Sparkes et al., 1987; Kamholz et al., 1988). Per mecanismes d'empalmament (de l'anglès, *splicing*) alternatiu es generen 4 isoformes majoritàries d'un pes molecular de 21.5, 20.2, 18.5 i 17.2 kDa en humans. El gen de l'MBP forma part d'una llarga unitat de transcripció que genera els diferents transcrits d'MBP i que es coneix amb el nom de *gen Golli-MBP*. El gen Golli-MBP està format per 10 exons, 7 dels quals constitueixen el gen propi de l'MBP i s'estén al llarg de 179 kb en humans (Pribyl et al., 1993). S'ha vist en ratolins mutats parcialment per l'MBP que aquesta proteïna té un paper important en la compactació de la mielina (Privat et al., 1979; Roach et al., 1985). En ratolins *shiverer*, on s'elimina una llarga porció del gen de l'MBP, es veu una menor compactació de la mielina en l'SNC (Readhead et al., 1990). En concordança amb els resultats en ratolins, també s'ha vist que rates *Long Evans* amb una mutació en el gen MBP que provoca una transcripció aberrant del gen presenten una pèrdua de la mielina compacta de l'SNC (Carre et al., 2002).

#### *PLP/DM20* (de l'anglès, *proteolipid proteins*)

Constitueixen el 50% de les proteïnes de la mielina. El gen PLP està format per 7 exons, té una longitud de 15 kb i està en el cromosoma Xq22 en humans (Willard et al., 1985; Morello et al., 1986). Aquest gen, per mecanismes d'empalmament alternatiu, codifica dues isoformes conegudes com a *PLP* i *DM20*. PLP conté els 7

exons, mentre que DM20 conté una deleció de 35 aminoàcids en la part 5' de l'exó 3. S'ha vist que la proteïna PLP humana és 100% homòloga a la proteïna PLP murina (Diehl et al., 1986; Macklin et al., 1986). Quan s'anul·la l'expressió de PLP i DM20, els oligodendròcits mantenen la seva capacitat de mielinitzar i compactar les beines de mielina, però a nivell estructural s'observa que les línies intraperiòdiques de mielina es fusionen i afecten així la seva estabilitat física. Aquest fet suggereix que la PLP en la mielina forma una membrana molt estable un cop la compactació ha tingut lloc (Bögler et al., 1990; Klugmann et al., 1997). La patologia principal dels ratolins genoanul·lats per PLP és una degeneració dels axons mielinitzats (Griffiths et al., 1998).

#### *CNP (de l'anglès, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase)*

Representa el 4% de les proteïnes de mielina. En humans el gen CNP està format per 4 exons distribuïts al llarg de 7 kb en el cromosoma 17q21. Per mecanismes d'empalmament alternatiu es generen 2 isoformes CNP1 i CNP2, amb un pes molecular de 48 i 46 kDa, respectivament (O'Neill et al., 1997). La proteïna CNP no es localitza exclusivament en la mielina, sinó que també està en les cèl·lules fotoreceptores de la retina (Vogel et al., 1988). Aquesta proteïna es localitza en el citoplasma axonal no compactat de l'oligodendroglia i en els llaços (de l'anglès, *loops*) paranodals (Trapp et al., 1989). En ratolins transgènics la sobreexpressió de CNP pertorba la formació de la mielina i crea prolongacions aberrants de la membrana dels oligodendròcits (Gravel et al., 1996). Per una altra banda, els ratolins genoanul·lats per CNP sembla que mielinitzen normalment, però presenten protuberàncies axonals i un procés de degeneració que els causa la mort prematura a l'etapa adulta (Lappe-Siefke et al., 2003).

#### *MAG (de l'anglès, myelin associated glycoprotein)*

Representa un 1% de les proteïnes de mielina. El gen MAG s'estén al llarg de 16 kb pel cromosoma 19 en humans. Està format per 13 exons i per empalmament alternatiu es generen 2 isoformes: L-MAG (*large-MAG*) i S-MAG (*small-MAG*). Aquestes dues proteïnes corresponen a polipèptids de 72 i 67 kDa, respectivament. L-MAG està implicat en l'activació de la proteïna tirosina quinasa Fyn i suggereix una implicació de la cascada de fosforilació de les tirosines en la mielogènesi. S'ha vist que ratolins deficientes en Fyn presenten alteracions de la mielinització i que la

diferenciació morfològica dels oligodendròcits depèn de l'activació tirosina quinasa de Fyn (Urenjak et al., 1992; Osterhout et al., 1999).

Entrant més en detall de la funció de MAG, s'ha vist que els ratolins deficients en MAG presenten retards en la compactació i un major nombre de beines de mielina que embolcallen els axons. Aquest fet suggereix que MAG té un paper d'ajuda als oligodendròcits perquè distingeixin axons mielinitzats dels no mielinitzats en l'SNC (Li et al., 1994; Montag et al., 1994). A més, s'ha vist que els ratolins deficients per l'L-MAG però amb S-MAG intacte presenten les mateixes alteracions que els animals deficients per MAG, per contra la mielina del sistema nerviós perifèric (SNP) es manté normal. Aquestes dades indiquen que l'L-MAG té un paper crític en l'SNC, mentre que l'S-MAG estaria directament implicada en la mielina de l'SNP (Fruttiger et al., 1995; Carenini et al., 1997; Fujita et al., 1998). Estudis in vitro de cèl·lules de Schwann transfectades correlacionen la sobreexpressió de MAG amb una hipermielinització i, contràriament, una baixa expressió de MAG amb una hipomielinització (Meyer-Franke et al., 1994; Filbin et al., 1996). Una altra funció atribuïda a MAG és la d'inhibir el creixement axonal en l'SNC després d'una lesió, i permet així la reparació del dany (Filbin et al., 1996; Qiu et al., 2000). Recentment s'ha vist que MAG pot ser proteolitzada en el seu domini transmembrana, i forma un producte derivat soluble (*dMAG*). *dMAG* s'ha implicat en el procés de desmielinització a causa que la seva formació es veu augmentada en pacients amb esclerosi múltiple (Moller et al., 1996).

*MOG* (de l'anglès, *myelin-oligodendrocyte glycoprotein*)

És una de les proteïnes minoritàries de la mielina que només està present en mamífers (Birling et al., 1993). En humans, el gen *MOG* es localitza en el complex major d'histocompatibilitat I (MHC I) en el cromosoma 6p21.3-p22. Aquest gen està format per 8 exons, els quals per mecanismes d'empalmament alternatiu generen 6 transcrits diferents (Pham-Dinh et al., 1995). *MOG* està en la membrana plasmàtica de les prolongacions dels oligodendròcits i en la lamel·la més externa de la beina de mielina (Brunner et al., 1989). També és considerat un marcador d'oligodendròcits madurs a causa que la seva presència correlaciona amb els últims estadis de maduració d'aquestes cèl·lules glials (Solly et al., 1996). Malgrat que la seva funció no es coneix del tot, la seva localització en la superfície cel·lular la fan accessible a un atac autoimmune. De fet, la immunització amb aquesta proteïna en

l'experimentació animal causa una recaiguda-remissió d'una forma d'encefalomielitis al·lèrgica experimental (EAE), malaltia que presenta similituds clíniques amb l'esclerosi múltiple (Iglesias et al., 2001). Recentment, es considera MOG com un important autoantigen de l'esclerosi múltiple (Berger et al., 2003).

*MOBP* (de l'anglès, *myelin-associated oligodendrocyte basic protein*)

És una proteïna bàsica de mielina. El gen MOBP es localitza en el cromosoma 3p22 en humans (Holz et al., 1997). Hi ha 3 isoformes generades per empalmament alternatiu que corresponen a polipèptids de 8.2, 9.7 i 11.7 kDa. Es localitzen en la línia densa de la mielina on sembla que juguen un paper en la compactació de la mielina de forma similar a l'MBP. Tal com es detalla en l'apartat 1.3.3., quan el procés de mielinització s'inicia, l'RNAm de MOBP a l'igual que succeeix amb l'RNAm d'MBP, entre d'altres, és traslladat del cos cel·lular cap a les prolongacions dels oligodendròcits (Montague et al., 1997).

Membres de la família tetraspanina

Proteïnes involucrades en processos de proliferació i migració oligodendroglials. Dintre d'aquesta família destaquem OSP (de l'anglès, *oligodendrocyte-specific protein*) i Cx32. OSP és una proteïna present en el SNC i en oligodendròcits que es troba codificada, tant en humans com en ratolins, en el cromosoma 3. L'estudi de ratolins deficients han permès determinar que OSP és una *tight junction protein* (Morita K et al, 1999). Cx32 són proteïnes de membrana que faciliten la transferència d'ions i molècules petites entre les cèl·lules (Bergoffen et al., 1993) i que es troben expressades en oligodendròcits però no en la mielina compacta. Aquestes estan especialitzades en formar unions tipus gap entre les fibres de mielina (Scherer SS et al., 1995).

*OMgp* (de l'anglès, *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*)

Proteïna glicosilada que s'uneix a la mielina a través del glicosil fosfatidilinositol i que en humans es troba codificada en el cromosoma 17. Es tracta d'un potent inhibidor del creixement de les neurites en cultius *in-vitro* de neurones (Wang et al., 2002; Huang et al., 2005).

#### 4.1.2. Lípids

La composició lipídica de la mielina és la mateixa que hi ha en altres membranes cel·lulars, però amb una proporció molar diferent. Aquests lípids són el colesterol, els fosfolípids i els glicolípid, i es presenten en la mielina amb una proporció molar de 4:3:2 a 4:4:2; i és el colesterol el lípid majoritari. En la mielina normal no hi ha èsters de colesterol. La mielina es caracteritza per la seva riquesa en glicoesfingolípid, particularment galactocerebròsids com les galactosilceramides (GalC) i sulfatides com les sulfogalactosilceramides. GalC representa el 20% dels lípids de la mielina madura. En la mielina també trobem galactolípid menors com són els èsters grassos de cerebròsids i els galactocerebròsids que contenen àcid siàlic com el gangliòsid GM1 i el GM4 (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

#### 4.2. Origen i maduració del llinatge oligodendroglial

Les neurones i altres cèl·lules de l'SNC s'originen a partir de l'ectoderm dorsal de l'embrió temprà. Aquest ectoderm s'engrandeix i forma la placa neural. A mesura que avança la gestació, els plecs neurals es fusionen formant el tub neural. L'extrem rostral del tub neural origina l'encèfal i el cabal forma la medul·la espinal.

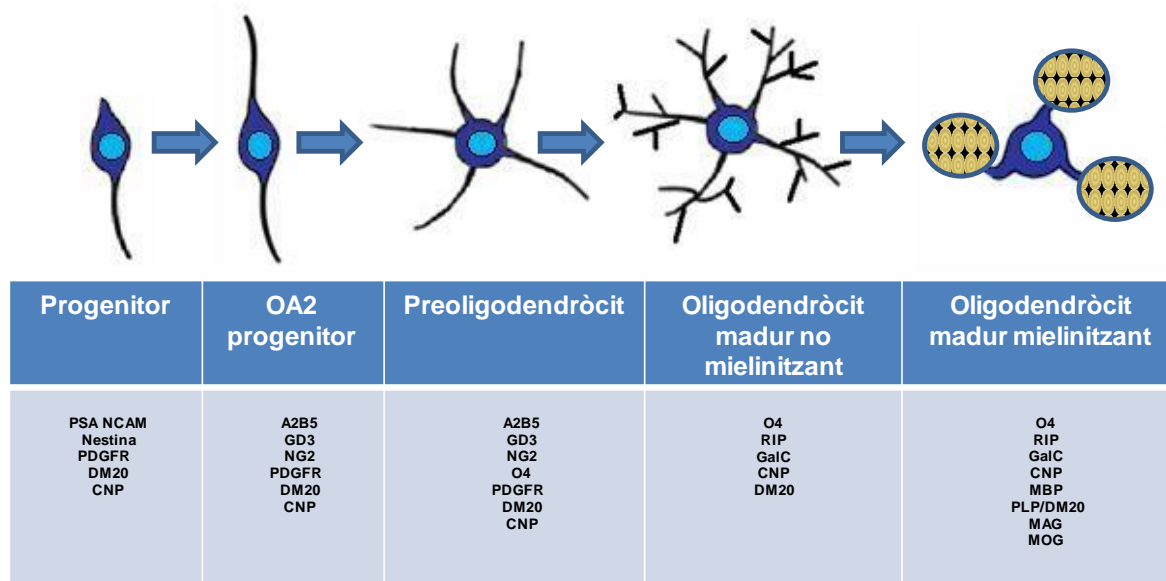
Cap a la quarta setmana del desenvolupament embrionari es formen en el tub neural les primeres poblacions cel·lulars, *els neuroblasts*, els quals són precursors de neurones.

Cap a la dinovena setmana de gestació es comencen a originar els precursors de la neuroglia, *els glioblasts*. D'aquests últims, els precursors d'oligodendròcits s'originen en les regions ventrals del tub neural, i en la zona ventricular i subventricular. Un cop formats aquests oligodendròcits precursors migren per l'SNC abans que es diferenciïn en oligodendròcits mielinitzants. Aquest procés de migració és massiu i de llarg recorregut, per tal de colonitzar específicament diferents territoris del cervell i està regulat pels factors de transcripció Olig1 i Olig2. Un cop finalitzen la seva migració es col·loquen en els tractes de fibres que seran substància blanca, perden part de la seva mobilitat, adquireixen el marcador O4 i es transformen en preoligodendròcits.

Els preoligodendròcits es transformen en oligodendròcits immadurs, cèl·lules que en el cas de rates es caracteritzen per la presència del marcador GalC i la pèrdua d'expressió dels antigens GD3 i A2B5. En rates, la maduració en oligodendròcits madurs no mielinitzants té lloc quan expressen de forma successiva en el temps



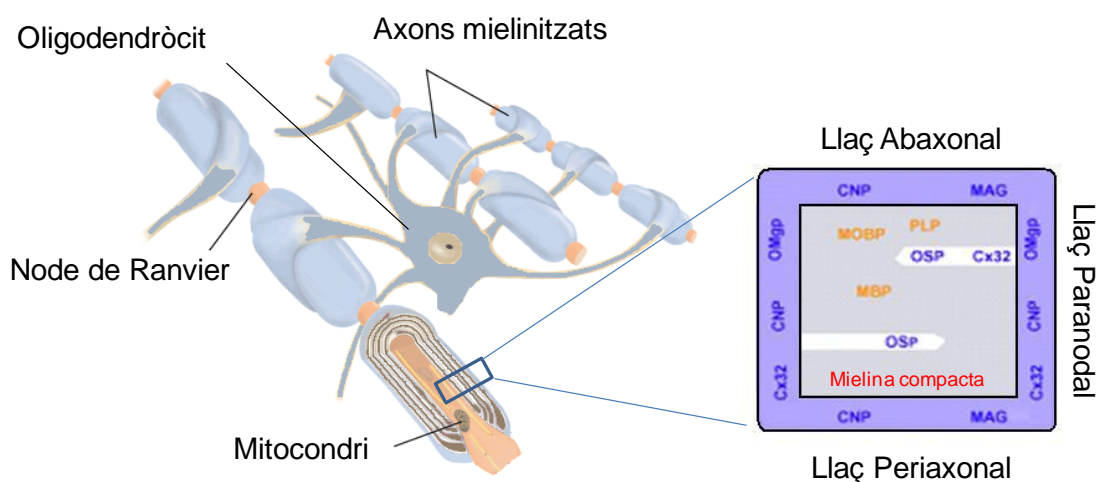
diferents proteïnes de la mielina: CNP, MBP, MAG i PLP, respectivament. Finalment, l'expressió de la proteïna MOG correlaciona amb l'últim estadi de diferenciació en oligodendròcits madurs mielinitzants (figura 4).



**Figura 4.** Procés de maduració del llinatge oligodendroglial. Existeix tant una evolució morfològica com antigènica des de l'etapa de progenitor d'oligodendròcits fins l'estadi de màxima maduresa dels oligodendròcits, cèl·lules capaces de dur a terme la mielinització. Aquesta figura està adaptada de Bauman i Pham-Dinh, 2001.

### 4.3. Distribució de les proteïnes de mielina en oligodendròcits

La membrana de mielina està composta per diferents subdominis amb una distribució proteica desigual (Figura 5). La mielina compacta es caracteritza per un enriquiment en glicoesfingolípid, galactocerebrósids sulfatats i un enriquiment de la majoria de proteïnes de la mielina: PLP, DM-20, MBP i MOBP. Les regions no compactes de la mielina estan constituïdes per CNP, MAG, MOG i Cx32 (Kramer et al., 2001). La OSP es localitza en una regió molt precisa: en les unions que marquen el límit entre la mielina compacta i la no compacta (Bronstein et al., 2000a; Bronstein et al., 2000b).



**Figura 5.** Esquema d'un oligodendrocit mielinitzant i distribució de les proteïnes de mielina en els diferents dominis de membrana de l'oligodendrocit. A destacar els dominis de la mielina que són: mielina compacta, llaços periaxonals, abaxonals i paranodals (Modificada de Kramer et al., 2001)

#### 4.4. Mielinització

Durant la formació de la mielina, els oligodendrocits produeixen la membrana de mielina a una velocitat que ocupa el primer lloc de tots els sistemes productors de membranes cel·lulars conegudes. La mielina es sintetitza com una extensió de la membrana plasmàtica i manté una composició bioquímica característica durant l'estat adult.

La mielinització és un procés complex, altament regulat durant el desenvolupament en el qual una sèrie de lípids i proteïnes de les cèl·lules glials mielinitzants s'activen d'una forma coordinada la síntesi d'una sèrie de lípids i proteïnes. La mielina es sintetitza durant el desenvolupament postnatal pels oligodendrocits en el SNC i per les cèl·lules de Schwann en el SNP. La funció de la mielina en el SNC i el SNP pareix idèntica però existeixen diferències en la biologia cel·lular de la mielinització dels oligodendrocits en respecte a les cèl·lules de Schwann. La cèl·lula de Schwann té una associació molt íntima amb l'axó que mielinitza i s'alinea al llarg del mateix, definint un sol internode mentre que varies extensions d'un sol oligodendrocit mielinitzen diferents internodes d'axons diferents (Bunge RP., 1968).

#### 4.4.1. Reconeixement oligodendròcit-axó

En general, es requereix d'un calibre mínim (al voltant d'1µm) per tal que l'axó pugui ser mielinitzat, però es desconeix encara com es seleccionen aquets axons. Certes molècules d'adhesió com L1 i NCAM s'expressen en axons no mielinitzats i durant la mielinització disminueixen la seva expressió (Charles et al., 2002). No obstant, no està clara la connexió entre la desaparició d'aquestes molècules i l'inici de la formació de la beina de mielina al voltant de l'axó. Els factors de creixement neuronals NGF també poden estar relacionats amb el reconeixement de l'axó per part de les cèl·lules glials. Els NGF s'uneixen a receptors axonals, provocant la transcripció de gens neurals que regulen la habilitat dels oligodendròcits o de les cèl·lules de Schwann per la mielinització (Chan et al., 2004). Aquesta primera fase es dona en els preoligodendròcits, els quals s'estableixen al llarg de les fibres de la substància blanca, mantenint la seva capacitat de divisió. A més a més, aquests preoligodendròcits, es converteixen en oligodendròcits immadurs adquirint diferents marcadors, llestos per començar el procés de mielinització.

La utilització d'estratègies transgèniques o *knockout* han demostrat que en el SNP, la neuregulina 1 (Nrg1) regula el gruix de la beina de mielina. La neuregulina 1 s'expressa en els axons de les neurones, així com en les motoneurones. Els receptors de neuregulina ErbB2 i ErbB3 s'expressen en les cèl·lules de Schwann. Els nivells de Nrg1 axonal per mitjà de la seva unió al receptor ErbB2 determinen el nombre de làmines de mielina que les cèl·lules de Schwann formaran al voltant d'un axó (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005). És més, la isoforma tipus III de la Nrg1 és la única que es conserva en la superfície de l'axó i que activa la fosfoinositol quinasa 3, necessària per la mielinització (Taveggia et al., 2005).

#### 4.4.2. Síntesi de la mielina i formació del domini paranodal

Un cop establert el reconeixement de l'axó per part de les cèl·lules glials té lloc la segregació de la mielina des de la membrana plasmàtica de la cèl·lula mielinitzant a l'axó. Un avanç important, per entendre com es segrega la mielina des de la membrana plasmàtica, va ser el descobriment del fet que certes proteïnes de les cèl·lules mielinitzants es sintetitzen *in situ*, és a dir, en les extensions de l'oligodendròcit que rodeja l'axó. Aquest és el cas de la MOBP, la MBP, la Call i la CNP (Ghandour and Skoff, 1991; Tansey et al., 1996; Gould et al., 1999). Altres proteïnes implicades en la mielinització es sintetitzen en el cos cel·lular com la MAG,

MOG, PLP i DM-20 entre altres. La síntesi de les proteïnes en les extensions dels oligodendròcits requereix del sistema de microtúbuls i de microfilaments. En la literatura s'ha descrit un transport actiu de l'RNAm que implica el reconeixement d'elements coneguts com a *cis-acting RNA elements* per part de factors d'unió d'RNA *trans-acting*.

Aquesta interacció resulta en la formació d'un complex ribonucleoproteic (RNP) que és transportat amb l'ajuda de proteïnes motores a través dels filaments del citoesquelet. Quan arriben al seu destí els transcrits són alliberats, ancorats i traduïts.

Hi ha alguns RNAm codificadors de proteïnes de mielina, el més conegut del quals és l'RNAm de l'MBP, que són transportats en forma de grànuls d'RNA a través dels microtúbuls cap a les terminacions dels processos oligodendroglials on es forma la mielina (Barbarese et al., 1999; Boccaccio et al., 2000).

A més a més, els microtúbuls i els microfilaments juguen un paper molt important en la extensió de les ramificacions de les cèl·lules mielinitzants. Una proteïna que participa en l'organització dels microtúbuls i els microfilaments és la CNP. La CNP promou el creixement dels microtúbuls i la arborització de les ramificacions dels oligodendròcits facilitant la polimerització dels microtúbuls en els seus extrems (Lee et al., 2005). La CNP també indueix la reorganització dels microfilaments d'actina afavorint la formació de fil·lopodis, que són essencials per l'establiment de les ramificacions (De Angelis and Braun, 1996). Una altra dada que aporta importància al sistema dels microfilaments durant la mielinització és que en absència d'aquests mateixos, l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes de la mielina s'inhibeixen, impedit així, el procés de mielinització en les cèl·lules de Schwann (Bunge et al., 1989).

La formació del domini paranodal (unió axo-gliàl entre la beina de mielina i l'axolema) que separa el node del juxtapanode, té lloc durant les primeres fases de la mielinització. En la formació paranodal s'han identificat la paranodina, la contactina i la neurofascina 155 com a proteïnes principals. També es detecten els constituents del node de Ranvier com la neurofascina 186, l'anquirina G, la NrCAM i la  $\beta$ IV-espectrina. Seguidament apareixen els canals de sodi necessaris per la propagació del potencial d'acció de l'axó. Actualment s'assumeix que una o varies proteïnes de l'axó actuen de pioneres en la formació del node en resposta a proteïnes de membrana o proteïnes de difusió de les cèl·lules mielinitzants. Un cop

arriben al node, actuen com vehicle per agrupar altres proteïnes, incloent-hi els canals de sodi (Sherman and Brophy, 2005).

#### **4.4.3. Alteracions en el comportament dels ratolins deficients per proteïnes de la mielina**

##### *GM2/GD2 sintetasa*

La GM2/GD2 sintetasa és un enzim clau en la biosíntesi dels gangliòsids important per al manteniment dels axons i de la beina de mielina (Sheikh et al., 1999).

Els animals deficients per aquest enzim desenvolupen neuropaties com dèficits en els reflexos, en la força, en la coordinació i en l'equilibri. També presenten anormalitats en el pas: una longitud i amplada del pas reduïda, un increment de la longitud entre les potes de darrera i una davallada en el nombre d'aixecaments sobre les seves extremitats posteriors (en anglès *rearings*). Els mutants deficients de GM2/GD2 sintetasa caminen fent petits moviments, presenten tremolors i catalèpsia i desenvolupen defectes degeneratius i en la mielinització (Chiavegatto et al., 2000).

##### *Tenascina-C*

Glicoproteïna de matriu extracel·lular àmpliament expressada durant els processos de desenvolupament i reparació cel·lular. La presència d'aquesta glicoproteïna evita la migració dels oligodendròcids progenitors, prevenint d'aquesta manera que tinguin lloc la mielinització. Els ratolins deficients de tenascina-C presenten un fenotip normal tant a nivell anatòmic com histològic (Saga et al., 1992). Mostren, no obstant, hiperlocomoció i dèficits en la coordinació (Kiernan et al., 1999)

##### *Prosaposina*

Proteïnes activadores de glicoesfingolípid hidrolases, localitzades en els lisosomes. Una disrupció en l'expressió de prosaposines provoca una acumulació de glicoesfingolípid en microglia i neurones. Això condueix a processos de neurodegeneració i desmielinització. El funcionament motor i de l'equilibri dels animals deficients per aquesta proteïna va ser avaluat pel test de ponts estrets (de l'anglès, *narrow bridges*). Aquests animals exhibien una major dificultat en travessar tots els ponts i un deteriorament progressiu en la realització d'aquest test al llarg de les setmanes. L'activitat exploratòria i la resposta a la novetat es van analitzar amb

el test de l'activitat motora, mentre que el pas dels animals es va avaluar amb la tècnica de les petjades. Els animals deficientes en prosaposina presentaven hiperactivitat i dèficits en la coordinació (Sun et al., 2008).

### *Receptor Nogo*

Nogo és un membre de la família *reticulon*, del qual existeixen 3 transcrits o isoformes (Nogo A, B i C). En sistema nerviós central Nogo-A es troba en elevades quantitats en oligodendròcits i mielina, mentre que Nogo-C és expressat majoritàriament en neurones. La isoforma C és la menys abundant. Els animals deficientes amb aquest receptor presenten un deteriorament de la capacitat motora fina en les extremitats anteriors (Cafferty et al., 2006).

### *Doble knock-out: MAG i Galgt1*

MAG és una proteïna implicada en la formació de la beina de mielina que s'uneix als gangliòsids GD1a i GT1b (molècules de la superfície de l'axó). Els animals deficientes per aquesta proteïna aparentment no presenten dèficits en coordinació motora i en tasques d'aprenentatge (Montag et al., 1994).

Els ratolins deficientes en Galgt1 no poden sintetitzar gangliòsids i per tant no expressen GD1a i GT1b. Els ratolins deficientes per Mag, per Galgt1 i els doble deficientes en Mag i Galgt1 presenten dèficits motors i comportamentals. En l'anàlisi per *rota-rod*, on es mesura l'equilibri, la coordinació i el control muscular, els 3 mutants no poden mantenir-se sobre el cilindre rotatori quan gira a 10 rpm, essent el deficient doble el que té una puntuació més baixa. El reflex d'estirar els membres posteriors quan el ratolí és agafat per la cua es troba clarament deteriorat en els 3 mutants, obtenint els pitjors resultats els deficientes dobles. Aquests, per contra tendeixen a retraure les seves extremitats posteriors, mantenint-les prop del cos. Tots els mutants presenten hiperactivitat. Els deficientes en Galgt1 són 2.3 vegades més actius que els controls mentre que els deficientes en Mag i els doble mutants Mag/Galgt1 són aproximadament 1.6 vegades més actius que els controls (Pan et al., 2005).

### *Triple deficient PLP-MBP-MAG*

La proteïna proteolipídica (PLP) i DM<sub>20</sub>, són dos transcrits implicats en la formació de la beina de mielina i en el manteniment de l'axó (Stoffel et al., 1984). L'MBP té un rol

crucial en la compactació de la mielina. La longevitat d'aquests animals es similar, excepte en els ratolins deficients per MBP, que és més curta. Els deficients per Plp i Mag no tenen un fenotip aberrant, però el canvi el doble deficient Plp-Mag presenta tremolors en les extremitats posteriors. En tasques d'aprenentatge de tipus laberint d'aigua (de l'anglès, water maze) els animals deficients per Mbp van ser descartats d'aquest assaig per ser incapaços de nedar, els deficients Plp i Mag presentaven un comportament d'aprenentatge normal i en canvi els doble deficients Plp-Mag eren incapaços d'adquirir una discriminació espacial per trobar la plataforma. En el test a camp obert, l'activitat motora dels mutants simples per Mbp i els triple mutants Plp-Mbp-Mag era força més baixa que la resta.

El patró postural i motor es va analitzar mitjançant el test de subjecció, el test de moviment sobre un pont horitzontal i el test de descens vertical. Els mutants deficients per Mag i els doble deficients Plp-Mag eren incapaços d'assolir la plataforma tant en el primer com en el segon test. En el test de descens vertical, en cap dels casos es van observar diferències respecte als controls.

En el comportament d'aprenentatge pel test *rota-rod*, els més afectats van ser els triple mutants (Uschkureit T et al., 2000).

#### **4.5. Models experimentals de desmielinització i remielinització**

La mielinització és un procés altament complex que implica la proliferació, migració i la diferenciació de les cèl·lules progenitores d'oligodendròcits (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Alguns tipus de lesions del SNC provoquen la desmielinització i la pèrdua axonal, donant lloc a malalties com l'esclerosi múltiple. La desmielinització es caracteritza per la mort dels oligodendròcits madurs mielinitzants, delectant-se una davallada de proteïnes que participen en la mielinització. El SNC intenta recuperar-se d'aquestes lesions mitjançant la remielinització (Chang et al., 2002). Així, després un dany en la mielina, els OPCs (cèl·lules precursors d'oligodendròcits) es diferencien en oligodendròcits immadurs (que expressen marcadors de proliferació com NG2, PDGF $\alpha$  i GalC) passant a oligodendròcits madurs (que expressen CNP, MBP, PLP i MAG) capaços de mielinitzar els axons. El procés de remielinització no és el mateix que el procés de mielinització que es dona durant el desenvolupament (veure capítol anterior). Els axons remielinitzats poden distingir-se dels axons mielinitzats normalment ja que tenen un menor gruix de la beina de mielina i una menor longitud internodal (Franklin and Hinks, 1999). Amb la finalitat d'entendre el

complex procés de desmielinització i remielinització s'han desenvolupat diferents models experimentals en rosegadors.

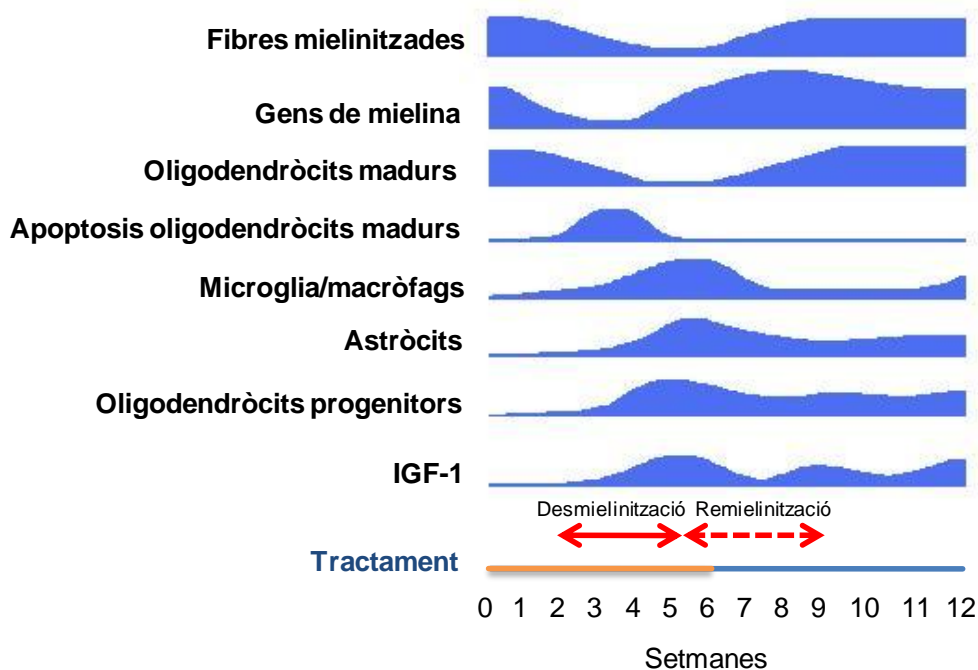
#### 4.5.1. Model per administració de cuprizona

La administració oral als animals rosegadors d'un quelant de coure, anomenat cuprizona, que resulta tòxic pels oligodendròcits, provoca una desmielinització en àrees específiques com el cos callós i hipocamp del SNC i, seguit per una remielinització espontània.

Aquest model està molt ben descrit. Es coneixen molt bé les dosis de cuprizona a utilitzar, les soques de ratolins a utilitzar, el període de temps en el qual transcorre la desmielinització i la remielinització i la resposta inflamatòria que té lloc (Matsushima and Morell, 2001; Stidworthy et al., 2003). Actualment, s'aplica la administració oral de cuprizona al 0.2% en ratolins de la soca C57BL/6J de 8 setmanes d'edat. La desmielinització comença a les 3 setmanes de tractament, i cap a les 4-5 setmanes de tractament més del 90% dels axons estan desmielinitzats. Cap a les 6 setmanes de tractament, es dona una recuperació espontània de la mielinització en el 50% dels axons. Si en aquest període s'interromp la administració de cuprizona, a les quatre setmanes s'observa una remielinització del 90% dels axons. Si pel contrari, es continua amb el tractament, la desmielinització prossegueix i sobre la setmana 12 de tractament amb cuprizona hi ha un altre intent de remielinització espontània. Cap a les 14 setmanes de tractament amb cuprizona, es comencen a detectar anomalies sistèmiques i els animals moren cap a la setmana 16 de tractament, probablement per dany hepàtic (Arnett et al., 2001; Mason et al., 2000a; Mason et al., 2001a; Mason et al., 2001b; Mason et al., 2000b; McMahon et al., 2001).

En aquest model, la desmielinització té lloc per apoptosi dels oligodendròcits madurs a les 2-4 setmanes de l'inici del tractament (Matsushima and Morell, 2001). En resposta a aquest dany, es dona un reclutament de la microglia, macròfags i astròcits que promouran la remielinització activant els OPCs a les 3-4 setmanes de tractament (Figura 6).





**Figura 6.** Esquema que mostra els canvis cel·lulars, morfològics i moleculars durant el procés de desmielinització/remielinització induïda per cuprizona al 0,2%. El primer canvi que s'observa és la regulació a la baixa dels gens de la mielina. Prèviament al procés de desmielinització hi ha una reducció en el nombre d'oligodendròcits. Al mateix temps que ocorre la desmielinització, hi ha una acumulació massiva dels macròfags i de la microglia. Finalment hi ha un restabliment gradual de la mielina donat per la aparició dels precursors oligodendroglials, que generen una nova població d'oligodendròcits madurs mielinitzants (Adaptada de Matshusima i Morell).

Han estat molts els estudis que han avaluat des del punt de vista anatòmic l'efecte de la cuprizona en diferents regions del sistema nerviós central. S'ha detectat desmielinització tant en àrees de substància blanca com gris.

Les estructures que s'han vist afectades per la cuprizona han estat el cos callós, el còrtex cerebral (Skripuletz et al., 2009), neocòrtex, hipocamp (Koutsoudaki et al., 2009), el nucli del cerebel (Groebe et al., 2009)

Hoffmann i col·laboradors (2008), en un estudi recent, han comprovat que en l'hipocamp la cuprizona provoca una desmielinització massiva que inclou la pèrdua de neurones en el gir dentat provocant l'aparició d'episodis epilèptics.

Yang i col·laboradors (2009) han realitzat un estudi exhaustiu sobre els efectes de la cuprizona en substància blanca i han relacionat aquestes anormalitats amb comportaments de tipus esquizoide. D'aquest estudi es desprèn que les estructures més afectades per la cuprizona són: el cos callós, la càpsula externa, el caudat putamen i la comissura dorsal de l'hipocamp. En altres àrees com el còrtex

cerebral, l'hipocamp i el bulb olfatori, s'ha observat la ruptura de la beina de la mielina.

Un avantatge interessant a destacar en aquest model, és que no existeix ruptura de la barrera hematoencefàlica i per tant s'evita entrar en les complexitats del sistema immunitari (Matsushima and Morell, 2001). A l'igual que en altres models, podem avaluar el grau de desmielinització i remielinització mitjançant tècniques de neuroimatge basades en la difusió radial anisotròpica de les molècules d'aigua (Song et al., 2005).

Liebetanz i col·laboradors (2006) han descrit un nou test (MOSS, de l'anglès *motor skill sequence*) per avaluar l'activitat motora i que consisteix en: habituar els animals a rodes compostes per barres creuades a una distància regular per posteriorment exposar-los a rodes compostes per barreres creuades a una distància irregular per tal d'avaluar la coordinació motora.

Posteriorment, s'ha publicat un treball sobre comportament animal en aquest model de des/remielinització induït per cuprizona, en el que s'han utilitzat una sèrie de tests comportamentals com: la bateria d'observació funcional (*FOB*), *open field test* i el *rota-rod test*. En l'inici de la desmielinització (3<sup>a</sup> i 4<sup>a</sup> setmana de tractament amb cuprizona al 0.2%), els animals mostraven un increment en l'activitat del SNC i una inhibició de la resposta anxiogènica enfront a un nou estímul. A les 5 setmanes de tractament, quan la desmielinització és màxima, l'equilibri i la reactivitat motora dels animals es va alterar. L'anàlisi per *rota-rod* va demostrar que el grup tractat presentava un deteriorament de la coordinació motora respecte als animals control. Aquest deteriorament motor va persistir després de 6 setmanes d'haver deixat la cuprizona (Franco-Pons et al, 2007).

Altres articles sobre aquest model, fan èmfasis sobre possibles estratègies que confereixen protecció enfront un episodi de desmielinització o bé incrementen la taxa de remielinització. La quetiapina és un fàrmac que prevé la desmielinització cortical i el deteriorament de la memòria espacial de treball (Xiao et al., 2008). El 17beta-estradiol i la progesterona tenen un efecte protector envers la desmielinització i estimulen la remielinització. L'efecte beneficià dels esteroides requereix d'interaccions amb els oligodendròcits, prevenint la seva degeneració o bé estimulant que les cèl·lules precursors d'oligodendròcits (OPC) passin a remielinitzar les fibres mielíniques danyades (Acs et al., 2009).

Torkildsen i col·laboradors (2009) han demostrat que una dieta amb salmó té un efecte protector contra els canvis comportamentals induïts per la desmielinització. L'injecció intracraneal de factors de creixement en animals exposats a cuprizona incrementa la taxa de proliferació i migració cel·lular en cos callós (Kumar et al., 2007).

## 5. DDR1

Els receptors domini discoidina 1 i 2 (DDR1 i DDR2) formen una subfamília de receptors tirosina quinasa transmembrana (RPTK) (de l'anglès, *receptor protein tyrosine kinase*).

Els RPTK són importants reguladors de les vies de transducció del senyal intracel·lular, i controlen diversos processos cel·lulars com la proliferació, diferenciació, transformació, senescència i apoptosi.

Durant el desenvolupament embrionari i en teixit adult DDR1 s'expressa en l'epiteli de diferents òrgans com: cervell, ronyó, pulmó, tracte gastrointestinal, glàndula mamària, còlon, fetge, tiroides i còrnia (Alves et al., 1995; Tanaka et al., 1998; Hou et al., 2001; Mohan et al., 2001; Sakamoto et al., 2001; Curat i Vogel, 2002; Ferri et al., 2004). La seva expressió és particularment abundant en cervell (Vogel et al., 1999). L'expressió de DDR1 es veu incrementada en diferents tipus de càncers com el càncer de mama, d'ovari, d'esòfag, de pulmó i de cervell (Laval et al., 1994; Barker et al., 1995; Pérez et al., 1996; Nemoto et al., 1997; Weiner et al., 2000; Alves et al., 2001; Heinzelmann-Schwarz et al., 2004; Ram et al., 2006).

S'ha vist que els ratolins deficients per DDR1 presenten una mida i pes menor fins a la pubertat. En el cas de les femelles presenten problemes d'implantació dels embrions, retard en el creixement de la glàndula mamària, absència de l'obertura alveolar i no secreten la proteïna de la llet. També presenten un increment de col·lagen en la matriu extracel·lular de l'epiteli mamari (Vogel et al., 2001). Per tant, DDR1 és important en el desenvolupament postnatal de la glàndula mamària.

## 5.1. Estructura gènica

El gen DDR1 es va clonar per primera vegada l'any 1993, en una llibreria de cDNA de placenta humana mitjançant la hibridació d'una sonda de 8 aminoàcids (HRDLAARN) homòloga al domini tirosina quinasa dels RTK (Johnson et al., 1993). Es va anomenar *DDR*. Simultàniament va ser identificat per altres grups i va rebre noms diferents, com el gen NEP homòleg al DDR1 en ratolí (Zerlin et al., 1993), *trkE* (Di Marco et al., 1993), *PTK-3* en rata (Sánchez et al., 1994), *RTK6* (Laval et al., 1994), *Cak* (Pérez et al., 1994) i *MCK-10* (Alves et al., 1995).

En el ratolí el gen DDR1 es localitza en el cromosoma 17 mentre que en humans el gen DDR1 es localitza en el cromosoma 6.

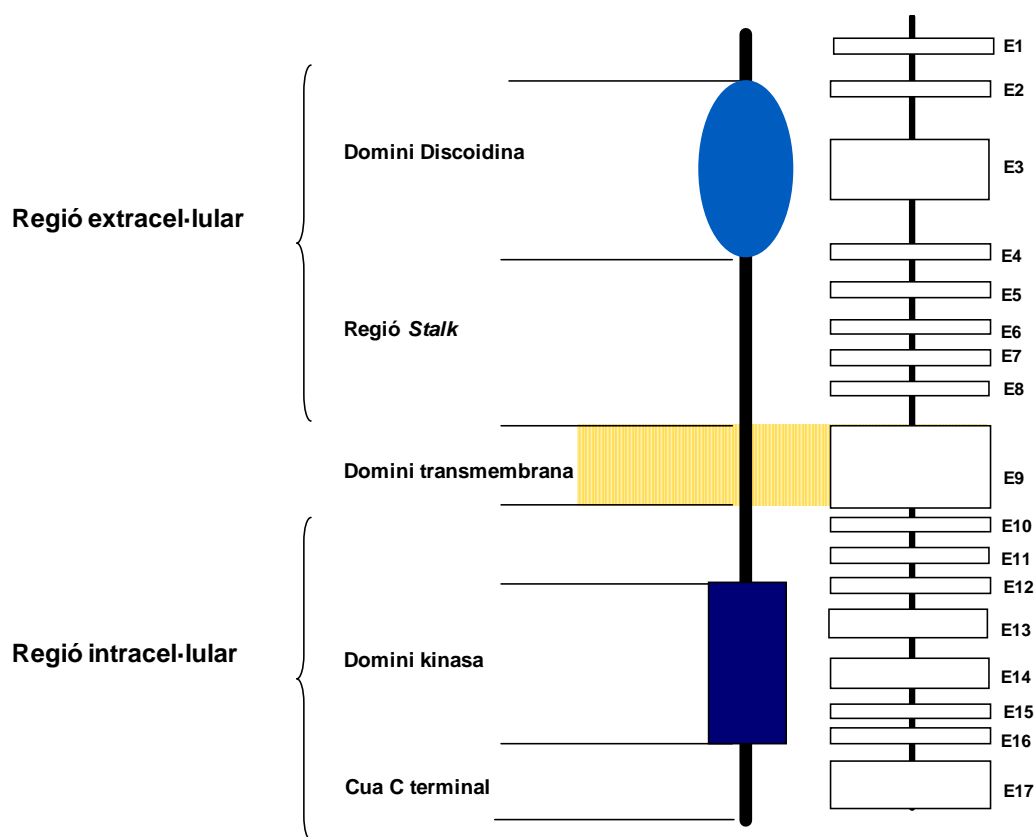
El gen DDR1 en ratolí està format per 12 exons que comprenen una longitud de 3,814 Kb del DNA genòmic. El percentatge d'homologia del gen DDR1 en ratolí respecte a l'humà es del 93,33%.

En aquesta tesi es descriuen 2 transcrits o isoformes diferents de DDR1. Aquestes 2 isoformes de DDR1 es generen com a conseqüència de diferents mecanismes d'empalmament alternatiu i són conegudes amb *CAK I* i *CAK II*. La diferència d'ambdues isoformes radica en: 1) localització tissular. *CAK I* s'expressa majoritàriament en cervell embrionari i adult, mentre *CAK II* s'expressa en cèl·lules epitelials; 2) la deleció d'un total de 37 aminoàcids (aa) de la regió rica amb aa glicina i prolina, essent el transcrit més llarg el *CAK I* (Perez et al., 1996). En humans s'han descrit 5 transcrits que venen anomenats amb el sufix a-e.

## 5.2. Estructura proteica

El proteïna DDR1 en ratolí està formada per 911 aminoàcids, dels quals els 19 primers codifiquen pel pèptid senyal, mentre que la regió extracel·lular està compresa entre les posicions aminoacídiques 20 i 414, amb una longitud de 395 aa. La regió transmembrana, annexa a la regió extracel·lular, es codificada per 27 aa (posició 415-441). En el domini citoplasmàtic (470 aa) hi trobem una regió rica amb aminoàcids glicina i prolina (posició 379-599), el domini tirosina quinasa (posició 608-903) i la cua C-terminal (posició 903-911) (Figura 7).

A continuació es fa una descripció més detallada de l'estructura proteica i funcionalitat d'aquestes regions.



**Figura 7.** Estructura gènica i proteica del gen DDR1 en ratolí. En la part de la dreta de la figura hi trobem la estructura gènica amb els exons que la componen i en la part esquerra hi figura els dominis de l'estructura proteica.

### 5.2.1. Regió extracel·lular: domini discoidina i regió *stalk*

La regió extracel·lular de DDR1 està composta pel pèptid senyal, el domini discoidina i la regió *stalk*.

#### *Domini discoidina*

És el lloc de DDR1 on s'uneix el seu lligand, el col·lagen. A diferència del mecanisme d'activació de la resta dels RPTK DDR1 només reconeix el col·lagen quan està en forma dimèrica i, per tant, la causa directa d'aquesta dimerització no és la unió del lligand (Schlessinger, 1997; Leitinger, 2003).

En aquest domini s'han identificat diversos residus agrupats en 3 llaços: llaç 1 (Ser52-Thr57), llaç 3 (Arg105- Lys112) i llaç 4 (Ser175), que són crítics per la unió del col·lagen al receptor (Abdulhussein et al., 2004).

### *Regió stalk*

No presenta homologia amb cap altra proteïna. Aquesta regió és responsable del reordenament estructural de la proteïna un cop s'ha unit el lligand i de la transmissió del senyal a través de la membrana cel·lular. Conté dues seqüències importants: una seqüència de glicosilació important per a aquesta transmissió transmembranal del senyal (Curat et al., 2001) i una seqüència diana per proteases, probablement de la família de les MT-MMP o ADAM (Vogel et al., 2002). Els canvis conformacionals en la regió *stalk* com a conseqüència de la unió del col·lagen permeten l'acció d'aquests enzims proteolitzant DDR1 en dos fragments: una subunitat  $\beta$  fosforilada de 62 kD que roman unida a la membrana i un ectodomini soluble de 58 kD. Sembla que aquest ectodomini manté unit el col·lagen i n'impedeix la interacció amb altres receptors de membrana (Vogel et al., 2002).

### **5.2.2. Regió jxtamembrana**

És una regió rica en prolines i conté diverses seqüències consens amb residus tirosina que poden ser llocs d'autofosforilació.

Conté el motiu LXNPXY que correspon al motiu consens XNPXpY d'unió al domini PTB de la proteïna adaptadora Shc. En línies cel·lulars de càncer de mama humanes aquest motiu d'unió entre la molècula adaptadora Shc i domini PTB de la regió jxtamembrana té lloc en la tirosina 513 fosforilada de la isoforma DDR1b (Vogel et al., 1997). Aquesta unió ha estat confirmada recentment per Foehr i col·laboradors l'any 2000 en diferents quimeres de DDR1. En cèl·lules THP-1 diferenciades s'ha vist que hi ha el reclutament de la molècula adaptadora ShcA en el mateix motiu LXNPXY de la isoforma DDR1b fosforilada; unió que causa l'activació de la proteïna MAPK p38, el factor NF $\kappa$ B i TAB1 $\beta$  a través de la via TRAF6 (Matsuyama et al., 2003; Yoshimura et al., 2005). Anteriorment, Matsuyama i col·laboradors l'any 2003 van observar que l'activació de la via MAPK p38 per a aquesta unió induïa la producció d'MCP-1, IL-8, MIP-1 $\alpha$  i MMP-9 en cèl·lules bronquioalveolars BALF.

Hi ha altres llocs potencials d'unió a proteïnes amb dominis Sh2 o PTB en aquesta regió, concretament 2 tirosines que es localitzen en l'exó 12: la Tyr 506 (YSGD) i la Tyr 547 (YMEP) (Alves et al., 1995).

Recentment s'ha identificat un probable domini SH2 d'unió per a Nck-2 en una Tyr484 (YQEP) (Koo et al., 2006).

### 5.2.3. Regió intracel·lular: domini tirosina quinasa i cua C-terminal

#### *Domini tirosina quinasa*

Aquest domini presenta una elevada homologia amb els receptors tirosina quinasa de les neurotrofines. No obstant això, la cinètica d'activació del receptors domini discoidina difereix de la resta de RPTK. L'autofosforilació del domini tirosina quinasa és lenta, s'inicia al cap de 2 hores d'unir-se al col·lagen i és màxima a les 18 hores. Per contra, en la resta d'RPTK aquest procés de fosforilació és immediat (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997).

El domini tirosina quinasa de DDR1 comparteix una sèrie de característiques amb els receptors de neurotrofines trkA/B/C: un gap d'un aminoàcid entre els residus 623 i 624, una Thr732 i Phe808 en lloc d'una Ala732 i Tyr808 present en altres tirosines quinases, un probable lloc d'autofosforilació en la Tyr759 seguit d'una altre Tyr, 11 aminoàcids extra en una regió corresponent a un domini característic de les proteïnes c-Kit, PDGF i CSF-1 i 3 residus corresponents d'una inserció de 5 residus (Leu-X-Ala-Val-X) del domini catalític dels trk (Di marco et al., 1993). En aquesta regió s'ha identificat també l'existència d'una Tyr740 d'unió a Shp-2 (Koo et al., 2006).

Les isoformes DDR1d i DDR1e no tenen activitat catalítica. Partint de la seva estructura s'ha postulat que aquests receptors sense domini quinasa actuarien com a repressors mitjançant la formació d'heterodímers, i regularien així el mateix receptor DDR1 (Alves et al., 2001).

#### *Cua C-terminal*

La cua C-terminal present en les isoformes DDR1a, DDR1b i DDR1c conté només 9 aminoàcids. Presenta un motiu d'unió LNTV per proteïnes amb dominis PDZ. En la cua C-terminal de la isoforma DDR1d hi ha un motiu GAPV. En aquest motiu també es poden unir proteïnes amb un o diversos dominis PDZ. Les proteïnes PDZ tenen un paper clau en l'organització dels receptors Eph i en la localització HER2 (Lin et al., 1999; Borg et al., 2000).

### 5.3. DDR1 i SNC

A part de certs estudis d'expressió de DDR1 en cervell humà embrionari i adult (Di Marco et al., 1993; Pérez et al., 1994; Alves et al., 1995; Johansson et al., 2005; Ram et al., 2006) i la seva expressió incrementada en diferents tipus de càncers cerebrals, els únics estudis que han analitzat més detalladament l'expressió de DDR1 en el sistema nerviós central s'han realitzat en models murins.

El primer d'aquests estudis el va realitzar Zerlin i col·laboradors l'any 1993, observant expressió localitzada de DDR1 en diferents estructures de l'SNC durant el desenvolupament embrionari i el postnatal. Concretament va observar durant el desenvolupament embrionari que l'expressió de DDR1 es concentrava en les cèl·lules neuroepiteliales de la zona ventricular. Aquesta expressió ja es manifestava a l'inici de la neurulació. En cervell adult de ratolí, l'expressió de DDR1 es localitzava en cèl·lules gials del cos callós, regions ventrals de l'hipotàlem i el pons, entre d'altres.

Sánchez i col·laboradors l'any 1994 van confirmar aquests resultats en cervell de rata. Van analitzar l'expressió de DDR1 més detalladament mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, en diferents estadis del desenvolupament embrionari de l'SNC i van trobar que: 1) en embrions de 12-13 dies (E12.5) l'expressió de DDR1 es concentrava en el prosencèfal, romboencèfal, mesencèfal i medul·la espinal, 2) en embrions de 15-16 dies (E15.5) aquesta expressió es concentrava en les zones proliferatives ventrals i 3) en embrions de 17-18 dies (E17.5) l'expressió de DDR1 es trobava en regions més localitzades com el caudat, el putamen i la zona ventricular del còrtex cerebral del telencèfal, en el tàlem dorsal del diencèfal, en el col·licle inferior del mesencèfal i, finalment, en el cerebel i en les estructures dorsals de la medul·la del prosencèfal. En cap estructura del diencèfal es va detectar expressió de DDR1.

En cervell adult de rata va observar que la major expressió de DDR1 es trobava en les regions de substància blanca i va corroborar així els resultats obtinguts en ratolí per Zerlin (Zerlin et al., 1993; Sánchez et al., 1994).

Bhatt i col·laboradors l'any 2000 van publicar l'únic estudi que fins a l'actualitat hi ha sobre la funció de DDR1 en el cerebel de ratolí. Durant el desenvolupament embrionari DDR1 és expressat per cèl·lules granulars de la capa externa del cerebel i la seva activació per unió del col·lagen és essencial pels processos d'elongació axonal. L'expressió de DDR1 en les cèl·lules granulars es manté en l'edat adulta, fet



que suggereix un probable paper de DDR1 en el manteniment i extensió de les prolongacions axonals i regulació de la formació de sinapsis.

El nostre grup ha estudiat en detall l'expressió de DDR1 durant el neurodesenvolupament del ratolí i en l'adult mitjançant tècniques d'hibridació *in situ* i immunohistoquímica (Franco-Pons et al., 2006). Els resultats obtinguts amb aquestes tècniques concorden amb els estudis esmentats anteriorment. No obstant això, es va observar en diferents estadis postnatsals del cervell que l'expressió de DDR1 segueix un patró espaciotemporal que se solapa al procés de mielinització i que aquesta expressió és màxima quan es produeix el pic en la mielinització postnatal. A més, es va identificar els oligodendròcits madurs com les cèl·lules que expressen DDR1 (Franco-Pons et al., 2006). Més tard, el nostre grup ha descrit una variant nucleotídica o SNP del gen DDR1 (rs1049623) amb clara associació amb l'esquizofrènia. Quan es va estratificar l'anàlisi per gènere l'associació entre l'SNP rs1049623 i esquizofrènia existia només en homes (Roig B et al, 2007).

L'estudi d'expressió en cervell humà ha permès determinar que en les prolongacions dels oligodendròcits que formen la mielina hi ha tant l'RNAm com la proteïna DDR1. Hi ha un transport actiu d'RNAm de DDR1 cap a les prolongacions dels oligodendròcits que implica el reconeixement d'elements coneguts com a cis-acting RNA elements per part de factors d'unió d'RNA trans-acting. Aquesta interacció resulta en la formació d'un complex ribonucleoproteic (RNP) que és transportat amb l'ajuda de proteïnes motores a través dels filaments del citoesquelet. Quan arriben al seu destí els transcrits de DDR1 són alliberats, ancorats i traduïts.

Paral·lelament, s'ha vist que la isoforma DDR1b en cervell humà s'expressa en l'endoteli de vasos sanguinis i que en el soma d'alguns astròcits i oligodendròcits també s'expressa DDR1.

En estudi cas-control analitzat per RT-PCR quantitativa mostra que les isoformes de DDR1 presenten una expressió específica i diferencial en el cervell humà. D'aquest estudi, s'han identificat la isoforma a i c de DDR1 com les isoformes implicades en el procés de mielinització i s'ha observat una menor expressió d'RNAm de DDR1 total, MAG i OLIG2 en pacients esquizofrènics enfront els seus controls, tot i que no s'ha arribat a assolir una significació estadística (tesi doctoral B Roig, 2007).

#### 5.4. Paper de DDR1 en altres teixits

Com ja s'ha comentat repetidament en capítols anteriors, l'únic lligand que es coneix de DDR1 és el col·lagen, component majoritari de la matriu extracel·lular. Les funcions que es coneixen de DDR1 s'associen en aquesta matriu extracel·lular. Fins al present, DDR1 està implicat en:

1. Diferenciació cel·lular de monòcits a macròfags o cèl·lules dendrítiques (Matsuyama et al., 2003; Matsuyama et al., 2004), així com ja s'ha comentat prèviament, en l'elongació axonal de les cèl·lules granulars del cerebel (Bhatt et al., 2000).
2. Processos de proliferació i adhesió cel·lular: El col·lagen és un modulador de la proliferació de les cèl·lules musculars llises o mesangials. S'ha vist que cèl·lules mesangials aïllades del ratolí deficient per a DDR1 i estimulades amb col·lagen redueixen dràsticament la seva capacitat d'adhesió, en part a causa d'una menor activitat de les MMP-2 i MMP-9 en comparació amb les cèl·lules normals. Contràriament, les cèl·lules mesangials aïllades de ronyó presenten una major proliferació en aquests ratolins deficientes per a DDR1 (Hou et al., 2001; Curat i Vogel., 2002; Hou et al., 2002).
3. Processos de migració cel·lular: Les cèl·lules mesangials aïllades del ratolí deficientes per DDR1 presenten una menor capacitat de migració (Hou et al., 2002). La migració dels leucòcits requereix d'una interacció coordinada amb la matriu extracel·lular. La isoforma DDR1a promou la migració dels leucòcits en una matriu tridimensional de col·lagen. La isoforma DDR1b sembla que actuaria de forma contrària, d'inhibidor d'aquesta migració (Kamohara et al., 2001).
4. Processos de degradació de la matriu extracel·lular: L'activació de DDR1 per unió al col·lagen activa les metal·loproteïnases MMP-2 i MMP-9 (Hou et al., 2001; Hou et al., 2002; Matsuyama et al., 2005a; Matsuyama et al., 2005b). La sobreexpressió de DDR1 en diferents càncers està associat a la invasió de les cèl·lules tumorals a causa d'una major activitat d'aquestes metal·loproteïnases.
5. Producció de quimioquines com la MCP-1, IL-8 i MIP- $\alpha$  a causa de l'activació del receptor per col·lagen en els macròfags alveolars durant els processos inflamatoris (Matsuyama et al., 2004).



# Hipòtesi

## **Hipòtesi general**

El desenvolupament del cervell té dues grans etapes, la neurogènesis (naixement, proliferació, migració i diferenciació de les neurones) que acaba poc després del naixement i la gliogènesi (naixement, proliferació, migració i diferenciació de les cèl·lules glials entre les que hi ha els oligodendròcits) que s'estén fins l'edat adulta i que té lloc en forma de tres grans onades (a la infantesa a l'adolescència i a l'entrada de l'etapa adulta). En concret el desenvolupament de la mielina produïda pels oligodendròcits. L'esquizofrènia debuta precisament en les etapes de mielinització (adolescència i inici de l'etapa adulta). Per tant alteracions genètiques en proteïnes clau de la mielinització poden formar part del component genètic de susceptibilitat per l'esquizofrènia.

El receptor domini discoidina 1, DDR1, és una proteïna involucrada en el procés de mielinització i variants en el seu gen s'associen amb l'esquizofrènia. Per tant aquestes variants en el gen DDR1 poden provocar alteracions en la formació i el manteniment de la mielina que s'associen amb les alteracions funcionals característiques de l'esquizofrènia.

## **Hipòtesi específica de la tesi**

El receptor DDR1 s'expressa en oligodendròcits madurs paral·lelament a d'altres proteïnes de la mielinització com la MBP.

Quan falta DDR1 el procés de mielinització s'altera. Per tant els ratolins deficientes en DDR1 que aparentment tenen una arquitectura cerebral normal han de respondre deficitàriament qual se'ls sotmet a desmielinització experimental.



# Objectius

Aquesta tesi doctoral té per objectiu general determinar la implicació de DDR1 en el procés de mielinització. Amb aquest supòsit ens plantejem tres objectius concrets:

- Estudi 1. Caracteritzar a nivell ultraestructural la beina de mielina i els axons i avaluar el comportament en el model de des/remielinització induït per cuprizona durant el segon període de remielinització.
- Estudi 2. Avaluar la conducta del model murí de des/remielinització induït per cuprizona i determinar les mesures morfomètriques del gruix de la beina de mielina i de l'axó en els ratolins deficientes per DDR1.
- Estudi 3. Analitzar l'expressió de DDR1 i altres proteïnes de mielina quan les cèl·lules oligodendroglials HOG16 són sotmeses a diferenciació.



# Material i mètodes

## **4.1. Material**

L'estudi va ser aprovat per la Comissió d'Investigació de l'Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata, pel Comitè Ètic d'experimentació animal de la universitat Rovira i Virgili segons directiva de la Comunitat Europea (86/609/EEC) i de la Universitat de Toronto, respectivament. Tots tres estudis van ser finançats pel *Stanley Medical Research Institute* pels projectes 03R392 i 05R896

### **4.1.1. Mostra de l'estudi 1**

Aquest estudi es realitzà amb 144 ratolins de la soca C57BL/6J, tots ells mascles.

### **4.1.2. Mostra de l'estudi 2**

En aquest cas es van utilitzar 32 ratolins, la meitat dels quals fou de la varietat *knock-out* per DDR1 i la resta procedents de la soca C57BL/6J, tots ells mascles.

Els exemplars *knock-out* per DDR1 es van generar per l'entrecreuament de la soca 129Sv amb la CD1. El resultat d'aquest aparellament es va entrecruar amb la soca C57BL/6J durant més de 20 generacions (Avivi-Green et al., 2006).

### **4.1.3. Mostra de l'estudi 3**

Els espècimens amb que es va treballar van ser la línia cel·lular oligodendroglial HOG16, cedida per Eucellbank (Departament de biologia cel·lular, Universitat de Barcelona, Espanya) i amb el permís del Dr. G. Dawson (Universitat de Chicago, Estats Units d'Amèrica).

## **4.2. Antecedents**

### **4.2.1. Model de desmielinització i remielinització per DDR1 +/-**

En el projecte DDR1 (FIS PI020498) ja vàrem realitzar un experiment de desmielinització/remielinització en ratolins per administració de cuprizona 0.2%. En aquell experiment vàrem explorar l'expressió de DDR1 per hibridació in situ, immunohistoquímica i per RT-PCR. Simultàniament es va fer una avaluació del comportament dels ratolins ja que en la literatura no existia cap estudi descrit. Els resultats de l'experiment es recullen en dos articles ja publicats (Franco-Pons et al., 2006 i Franco-Pons et al., 2007).

En síntesi vàrem observar un augment de l'expressió de DDR1 en oligodendròcits mielinitzants a partir de la 3-4 setmana de tractament amb cuprizona i un retorn a la



normalitat en l'expressió de DDR1 després de 6 setmanes d'alimentació dels ratolins amb dieta normal. Pel que fa al comportament es va observar un augment de l'activitat en les primeres setmanes (3-5 setmanes de tractament amb cuprizona) i uns dèficits motors a les 5-6 setmanes de tractament que no desapareixien ni després de les 6 setmanes amb dieta normal. Algunes limitacions en el disseny d'aquest primer experiment més les troballes de resultats nous ens va portar a plantejar-nos de repetir l'experiment. Per altra banda, repetint l'experiment vam recopilar més dades sobre aquest model abans d'aplicar-lo en les ratolins deficients en DDR1.

Per aquest experiment vam creure molt important centrar-nos en els següents objectius:

- Valoració setmanal de: ingesta sòlida i líquida, pes.
- Afinar en les proves de comportament, concretament en la valoració dels paràmetres: explorar el dèficit d'inhibició (amb el test de dos compartiments); confirmar activitat i ansietat (open field); locomoció (rota-rod i emprentes al caminar) i coordinació motora (amb el test body suspension).
- Determinar si aquells animals que després d'abandonar la dieta amb cuprizona i rebre dieta estàndard durant 20 setmanes presenten diferències significatives en quant al seu comportament respecte als animals control.

#### **4.2.2. Model de desmielinització i remielinització per DDR1 +/+ i -/-**

Partint dels resultats obtinguts en els dos estudis de neurocomportament realitzats en el model murí tractat en cuprizona al 0,2% (Franco-Pons et al., 2007) vam decidir seguir amb aquesta línia d'investigació per tal d'avaluar quins dèficits conductuals presentaven els ratolins de la varietat *knock-out* per DDR1.

En una primera fase, es va provocar la desmielinització dels ratolins *knock-out* per DDR1 mitjançant el subministrament de cuprizona al 0.2% a través de la dieta. En la segona fase de l'experiment es va voler comprovar si la remielinització s'assolia substituint la dieta amb cuprizona per una dieta de manteniment convencional. Així doncs els objectius que ens vam marcar en aquest estudi van ser:

- Determinar la ingesta sòlida, líquida i el pes periòdicament.
- Valoració de paràmetres neuroconductuals com l'ansietat i el dèficit d'inhibició (amb el test de dos compartiments), locomoció (emprentes al

caminar) i coordinació motora (amb el test body suspension). Fer una valoració general de l'estat de l'animal (amb el test FOB).

- Valorar a nivell histològic si l'animal *knock-out* per DDR1 és capaç de remielinitzar i mantenir la integritat de l'axó.

#### **4.2.3. Diferenciació de la línia cel·lular oligodendroglial HOG16**

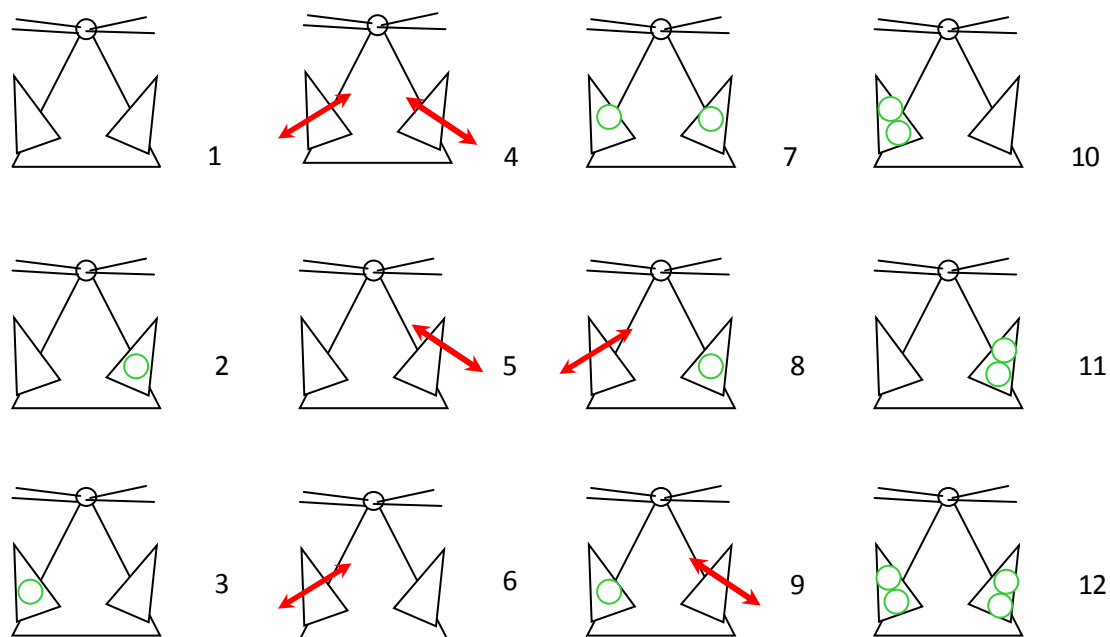
En un estudi previ, es va corroborar tant a nivell proteic com d'mRNA que l'expressió de DDR1 estava estretament lligada amb el procés de mielinització post natal en ratolí, suggerint que DDR1 participava en el desenvolupament i manteniment de la beina de mielina (Franco-Pons et al., 2006). Partint d'aquestes dades, vam voler explorar amb més detall el rol de DDR1 i altres proteïnes en el procés de mielinització. Per aquest motiu vam creure convenient centrar-nos en l'estudi qualitatiu (per immunohistoquímica de fluorescència) i quantitatiu (per RT-PCR quantitativa) de DDR1 en l'estadi previ a la mielinització i en l'estadi mielinitzant dels oligodendròcits.

### **4.3. Disseny experimental**

#### **4.3.1. Disseny experimental estudi 1**

L'administració oral de 0.2% de cuprizona en ratolins de la soca C57BL/6J de 8 setmanes d'edat provoca una toxicitat als oligodendròcits que moren i com a conseqüència es produeix una desmielinització. Si després de 6 setmanes d'administració de cuprizona es retorna els animals a dieta normal es recuperen i remielinitzen els axons desmielinitzats. El primer pic de re-mielinització es dona entre les setmanes 4-5 de l'experiment i el segon pic entre les setmanes 8-9. El model està molt ben descrit ( Matsushima i Morell et al., 2001; Franco-Pons et al., 2009).

En el moment del lliurament per part del proveïdor (Harlan laboratoris, Espanya), els 144 ratolins de la soca C57BL/6J mascles tenien 6 setmanes d'edat. Es van tenir dues setmanes en adaptació (quarantena) i s'inicià l'experiment tan bon punt els animals van tenir 8 setmanes d'edat. Tots aquests, al començament de l'experiment tenien una mitjana de pes de  $23 \pm 3$ g. Van ser apropiadament identificats (Figura 8) i distribuïts en 12 animals per caixa segons el seu pes i el tipus de tractament que havien de seguir.



**Figura 8.** Identificació dels animals en les caixes. Es mostra diferents combinacions de tallants i forats que es van fer amb la finalitat de facilitar l'identificació dels ratolins.

Els grups control (C0, C1, C2, C3, C4 i C5) van rebre dieta estàndard mentre que els grups tractats (T1, T2, T3, T4, T5 i T6) van rebre dieta complementada amb cuprizona al 0.2%.

Els ratolins tractats van ser alimentats amb cuprizona durant 3 setmanes (T1) i 6 setmanes (T2, T3, T4, T5 i T6). La dieta complementada amb cuprizona va ser substituïda el dia 42 del protocol experimental per dieta estàndard durant 2 (T3), 4 (T4), 5 (T5) i 20 setmanes (T6). Els grups C0, C1, C2, C3, C4 i C5 van ser alimentats amb dieta estàndard durant 0, 3, 6, 8, 10 i 12 setmanes respectivament. Un resum d'aquest protocol es mostra a la taula 1 i 2.

T (setmanes)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	26
Tractament		X	X	X	X	X	X						
Comportament (Nivell 1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Comportament (Nivell 2)				X			X		X		X		X
Sacrifici (Teixits)	X			X			X		X		X	X	X

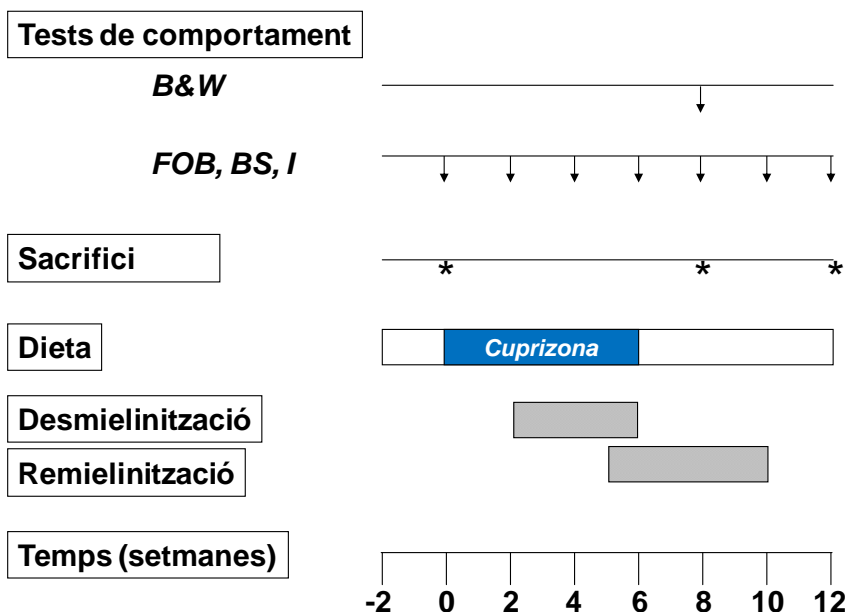
**Taula 1.** Disseny experimental. Durant les 6 primeres setmanes els ratolins van ser alimentats amb dieta complementada amb cuprizona al 0,2%. Setmanalment es va valorar la quantitat d'ingesta sòlida, líquida i el pes dels ratolins (Nivell 1 de comportament). En les setmanes 3, 6, 8, 10, 12 i 26 es va fer la valoració de paràmetres comportamental com l'ansietat, inhibició, activitat, coordinació motora, locomoció i estat general de l'animal (Nivell 2 de comportament). Els sacrificis es mostren amb una X de color vermell.

Setmana	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	26
Control	12			12			12		12		12	12	
Tractat				12			12		12		12	12	12

**Taula 2.** Distribució dels animals en funció de la setmana de sacrifici. 144 ratolins es van emprar en aquest estudi, 12 dels quals es van sacrificar inicialment. La resta es va sacrificar de forma gradual al llarg de l'estudi. Un grup de 12 ratolins es va deixar recuperar 20 setmanes després d'haver finalitzat el tractament amb cuprizona per avaluar si aquests havien recuperat el 100% de les seves capacitats neurobiològiques.

### 4.3.2. Disseny experimental estudi 2

Un total de 36 ratolins de vuit setmanes d'edat van ser pròpiament identificats i establats en caixes segons el seu genotip (*knock-out* vs salvatge) i tipus de tractament (tractat vs control). 11 animals DDR1 +/+ i DDR1 -/- van ser alimentats amb dieta tipus estàndard mentre que 7 animals DDR1 +/+ i DDR1 -/- van ser alimentats amb dieta complementada amb cuprizona al 0,2%. 4 animals DDR1 +/+ i 4 animals DDR1 -/- van ser sacrificats a la setmana 0. 3 ratolins de cadascun dels grups es varen sacrificar a la vuitena setmana i la resta, un total de 16 animals, van ser sacrificats a l'última setmana. Es va escollir la setmana 8 perquè coincideix amb el segon pic de remielinització (Matsushima i Morell, 2001). La figura 9 mostra l'esquema general del protocol aplicat en aquest cas.



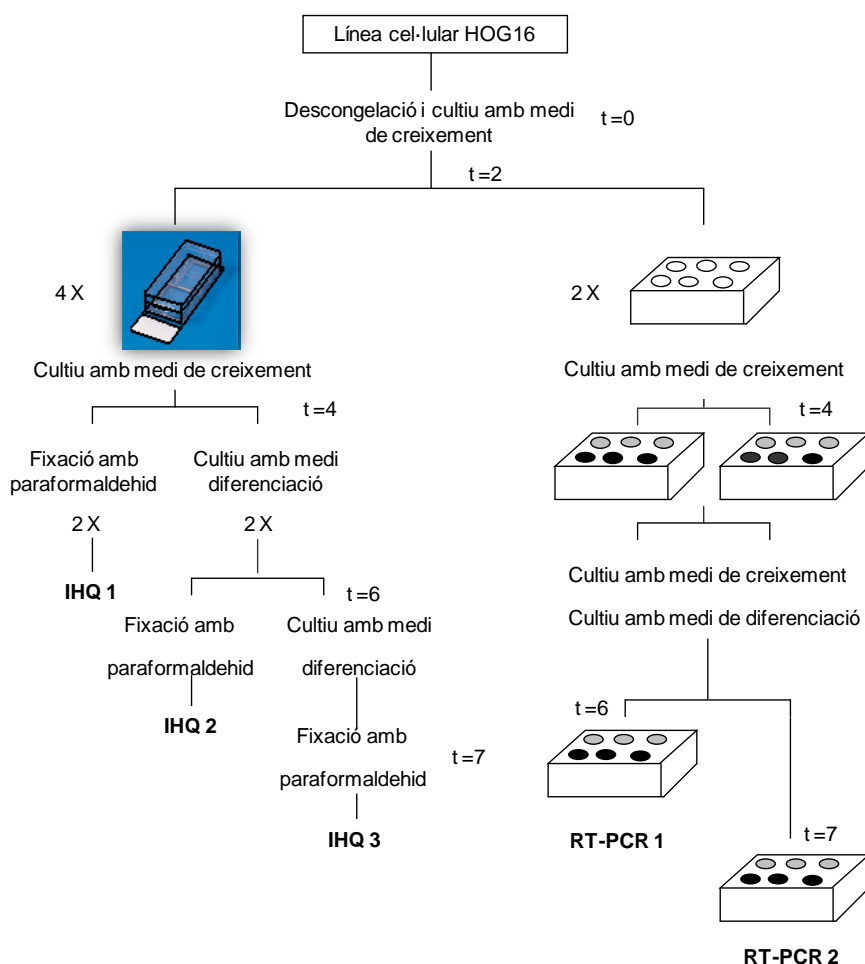
**Figura 9.** Esquema general del protocol procedimental seguit. Els ratolins van ser alimentats amb cuprizona al 0,2% durant 6 setmanes i posteriorment van rebre dieta estàndard. Els tests de comportament es van dur a terme setmanalment en el cas de la bateria d'observació funcional (FOB), suspensió corporal (BS) i petjades (I). El test dels 2 compartiments (B&W) es va fer un sol cop i coincidint amb el segon pic de remielinització (8<sup>a</sup> setmana). Els sacrificis es van programar per les setmanes 0, 8 i 12.

#### 4.3.3. Disseny experimental estudi 3

Les cèl·lules van créixer en una placa de 6 pous amb medi de creixement (MC) i quan es va assolir una confluència del 50%, aquestes cèl·lules es van dividir en 2 grups. La meitat dels pous van continuar creixent amb MC mentre que en l'altra meitat el medi de creixement va ser substituït per medi de diferenciació (MD). Les cèl·lules es van incubar en un ambient humit, a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Per la composició d'ambdós medis (Taula 3) es va seguir el protocol utilitzat per Buntix i col·laboradors (2003). Després de 48 hores d'incubació, s'extragué el medi de cultiu i les cèl·lules es van dissoldre amb tampó de lisis. Aquest experiment es va fer per triplicats de cada pou i en tres setmanes diferents. Experiments paral·lels van ser duts a terme fent ús d'una *Lab-Tek II chamber slide system* (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Després de 48 hores d'incubació, a l'igual que en el cas anterior, el medi de cultiu es va extraure i les cèl·lules es van fixar. La figura 10 mostra el protocol que s'ha seguit. En aquesta línia cel·lular es va descartar la presència de micoplasmes amb el kit comercial EZ-PCR *Mycoplasma* (Biological Industries).

Línea cel·lular oligodendroglial HOG16	
Medi de Creixement	Medi de Diferenciació
<ul style="list-style-type: none"> <li>•DMEM alt en glucosa (Gibco)</li> <li>•10% sèrum fetal boví (Hyclone)</li> <li>•50 U/ml penicil·lina (Gibco)</li> <li>•50 mg/ml estreptomicina (Gibco)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•DMEM alt en glucosa</li> <li>•0,05% sèrum fetal boví</li> <li>•30 nM triiodothironina (Sigma)</li> <li>•30 nM seleni (Sigma)</li> <li>•0,5 µg/ml insulina (Sigma)</li> <li>•50 µg/ml transferrina (US Biological)</li> <li>•50 U/ml penicil·lina</li> <li>•50 mg/ml estreptomicina</li> </ul>

**Taula 3.** Composició dels medis de cultiu. Pel cultiu de la línea cel·lular oligodendroglial HOG16 es va utilitzar medi de creixement per incrementar la població d'oligodendròcits pre-mielinitzants i quan es va assolir una confluència del 50%, aquestes cèl·lules van créixer amb medi de diferenciació, el qual va permetre que els oligodendròcits pre-mielinitzants s'activessin i evolucionessin a oligodendròcits madurs mielinitzants.



**Figura 10.** Esquema del procediment metodològic seguit en el cultiu de la línea cel·lular HOG16. Es va estudiar la diferenciació d'aquest llinatge cel·lular mitjançant la immunohistoquímica de fluorescència (IHQ) i la RT-PCR quantitativa. La durada total fou de 7 dies.

## 4.4. Metodologia emprada

### 4.4.1. Tractament del teixit

Tots els ratolins es van anestesiari per injecció intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg) dissolt amb tampó salí al 0,9%. Posteriorment els animals es van perfondre amb paraformaldehid al 4% (PFA). Els cervells dels ratolins es van extreure utilitzant eines quirúrgiques. L'hemisferi dret és va tallar en seccions de 2 mm i es va emmagatzemar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Finalment, aquestes seccions es van postfixar en glutaraldehid al 2,5%, més tard es van processar amb tetraòxid d'osmi al 1%, deshidratats amb una bateria d'alcohols i imbibits amb resina epoxy. Del cos callós per microtomia es van obtenir talls semifins que es van tenyir amb blau de toluïdina per ser analitzats al microscopi òptic (Nikon Eclipse 600, Barcelona, Espanya) i per altra banda, es van obtenir talls ultrafins d'aquesta mateixa estructura, que després de ser tenyits amb acetat i nitrat d'uranil van ser examinats a 60 kV al microscopi electrònic de transmissió (JEOL JEM-1011, Tokio, Japó).

### 4.4.2. Mesures del gruix de mielina i el diàmetre de l'axó

Talls semifins procedents del cos callós van ser analitzades amb el microscopi òptic (Nixon Eclipse 600). Un total de 100 axons mielinitzats per animal (3 animals per grup experimental) van ser morfològicament mesurats a 100 augments mitjançant el software AnalySISTM (Soft Imaging System, Münster, Alemanya). Es van prendre mesures de les diagonals horitzontals (h) i verticals (v) considerant la globalitat axó i beina de mielina (T) i únicament l'axó (A). Aquestes mesures les van realitzar dos observadors cecs. El gruix de la beina de mielina es va calcular com la diferència entre l'àrea total ( $T = \pi \times h_T/2 \times v_T/2$ ) i l'àrea de l'axó ( $A = \pi \times h_A/2 \times v_A/2$ ) i els valors es van representar com  $\mu\text{m}^2$  (95%CI).

### 4.4.3. Tests de comportament

L'estudi I i II d'aquesta tesis es van portar a terme amb la col·laboració de l'equip de la Dra. Maria Teresa Colomina (grup de Toxicologia i Salut Ambiental de la Universitat Rovira i Virgili). Un observador cec va ser l'encarregat d'executar els tests de comportament animal. Els animals es trobaven exposats a cicles de 12 hores de llum, aïllats i en una habitació d'accés restringit. Setmanalment, als animals se'ls passava la bateria d'observació funcional (de l'anglès functional observation battery, FOB), el test del camp obert (de l'anglès open field), el test de coordinació i

aprenentatge (de l'anglès *rota-rod*), el test de suspensió corporal (de l'anglès *body suspension*) i el test de les petjades (de l'anglès *imprinting*). Als animals se'ls va avaluar un sol cop pel test dels dos compartiments (de l'anglès *black and white compartment test*).

#### **4.4.3.1. Bateria d'observació funcional (FOB)**

Aquest test originalment va ser dissenyat per avaluar els efectes neurotòxics en rates (Moser, 2000), tot i que més tard ha estat adaptat a ratolins (Golub et al., 2004; Sills et al., 2000). El protocol utilitzat consta de 18 punts que valoren diferents aspectes de les funcions del sistema nerviós central. Al principi de l'anàlisi es va valorar l'estat del ratolí en la caixa on es va observar l'estat general d'alerta i postura. Es va extraure el ratolí de la seva gàbia i es va posar sobre la ma de l'observador per puntuar la reactivitat a la manipulació i observar el seu aspecte general. Posteriorment, es va observar el ratolí en una caixa blanca exploratòria (60cm x 90cm), per tal d'analitzar conductes que reflexen la activitat del sistema nerviós central com la postura i la normalitat o anormalitat de la mateixa, la mobilitat, la presència de moviments tòncics o clònics, el nombre de aixecaments verticals sobre les seves extremitats posteriors (de l'anglès *rearings*) i conductes de neteja (de l'anglès *grooming*). En la caixa blanca exploratòria es van anotar el nombre de miccions i defecacions com a indicadors del funcionament del sistema nerviós autònom, la facilitat o dificultat per treure l'animal del recinte (indicador de reactivitat o excitabilitat del sistema nerviós) i la resposta a estímuls sensitius com la capacitat de resposta de l'animal al contacte i al soroll. Es van valorar com indicadors del funcionament motor la capacitat de l'animal per donar-se la volta quan aquest es col·loca sobre la seva espatlla, la capacitat de subjecció en les seves extremitats i la capacitat per escalar en una reixeta vertical.

#### **4.4.3.2. Activitat a camp obert ("open field")**

L'activitat i la resposta a un nou ambient van ser mesurades en un aparell format per un quadre de fusta 1m x 1m rodejat per una paret de 47 cm d'alçada. El camp té dues zones definides, la perifèria (correspon a l'àrea que es troba a 15 cm de la paret) i l'àrea central (la resta d'àrea de la caixa). Els ratolins es col·locaven en el centre del quadrat a l'inici de l'experiment. Durant l'execució del test, els animals es podien moure lliurement a través de l'*open field* i el temps donat per explorar-lo era



de 15 minuts. El recorregut de l'animal i el nombre de *rearings* va ser enregistrat amb una vídeo càmera (model Sony CCD-IRIS) situada sobre el quadre i connectada al programa de vídeo Ethovision® de Noldus Information Technologies (Wageningen, Països Baixos).

La defecació i la distància recorreguda en el centre del quadrat es van analitzar com una mesura de l'ansietat (DeFries et al., 1974; Torrente et al.; 2005)

#### **4.4.3.3. Coordinació motora i aprenentatge (“rota-rod”)**

La coordinació motora es va avaluar en l'aparell de *rota-rod* (Letica Scientific Instruments) amb una roda impulsada per un motor que roda a diferents velocitats i que permet analitzar l'equilibri i la coordinació del ratolí. Els animals es valoraran en 2 dies consecutius: el primer dia servirà perquè l'animal aprengui la tasca (Assaig d'aprenentatge) i el següent dia correspon al test (Assaig del test).

Assaig d'aprenentatge: 2 trials de 120 segons a una velocitat constant de 16 rpm. El ratolí té un interval de 30 minuts entre ambdós trials per descansar. L'animal es va situar en el cilindre rotatori amb un angle de 45° i a una velocitat constant de 16 rpm. En cas que l'animal caigui, es para el cronòmetre i quan es torna a col·locar l'animal damunt del cilindre, es continua comptant el temps, fins que aquest pugui completar els 120 segons sobre el cilindre. Durant cadascun dels 2 trials, l'observador apunta el temps que tarda en caure l'animal per primer cop, les vegades que l'animal cau i si realitza voltes senceres sobre el seu eix sense caure (de l'anglès flips).

Assaig del test: 1 trial de màxim 120 segons a una velocitat de 16 rpm i a una acceleració constant. En començar l'avaluació, es col·loca a l'animal damunt del cilindre que roda a una velocitat de 16 rpm i amb una acceleració constant. La prova finalitza al cap de 120 segons o quan l'animal cau. En aquest cas, l'observador ha d'apuntar el temps que l'animal ha aguantat dalt del cilindre.

#### **4.4.3.4. Suspensió corporal (“body suspension”)**

Els animals van ser suspesos per les seves extremitats anteriors amb una goma elàstica per posteriorment mesurar el temps que aquests trigaven en soltar-se i caure. En un segon assaig es va quantificar l'ús de les extremitats posteriors utilitzant una vareta de fusta de 4 mm de diàmetre que permetia una millor subjecció dels animals. Els animals havien d'arrupir i balancejar les seves extremitats posteriors per agafar-se a la vareta i d'aquesta manera estabilitzar la posició del cos

(Metz et al., 2004). L'observador havia d'anotar si l'animal era capaç d'utilitzar ambdues extremitats posteriors per subjectar la vareta o pel contrari només s'hi podia agafar amb una de les extremitats o bé no era capaç d'utilitzar-ne ninguna.

#### **4.4.3.5. Petjades (“imprinting”)**

L'anàlisi de les petjades va ser descrit per primer cop per De Medinaceli et al. (1982). El test va permetre avaluar la coordinació de les extremitats i el suport del pes corporal. La superfície de les extremitats en contacte amb el terra es va pintar: negre per les extremitats anteriors i roig per les posteriors. Les petjades van fer-se en un paper de 5 cm d'amplada per 40 cm de llargada. Aquest recorregut ens va permetre estandarditzar la direcció de les petjades en línia. Una sèrie d'almenys 6 petjades consecutives van ésser enregistrades per cada sessió per tal de determinar els valors mitjans de la longitud del pas. La longitud del pas comprenia la distància entre el centre de la petjada de dos passes consecutives de cada costat del cos. Addicionalment, per tal d'avaluar la coordinació de les extremitats, la distància entre el centre de les petjades de les extremitats anteriors i posteriors de cada costat del cos van ser mesurades (Metz et al., 2004; Pierre et al., 2002).

#### **4.4.3.6. Dos compartiments (“Black & White compartment test”)**

El test dels 2 compartiments es basa en l'aversion innata dels rosegadors als llocs il·luminats i al seu comportament exploratori en resposta a agents estressants com seria un ambient lluminós (Crawley and Goodwin, 1980). Els paràmetres avaluats van ser el temps de latència per entrar al compartiment lluminós, el nombre de vegades que el ratolí creuava del compartiment fosc al clar i el temps en que l'animal s'hi estava al compartiment clar. Aquest test és una bona mesura de l'ansietat del ratolí. Obstant, degut a la capacitat d'aprenentatge dels ratolins, aquest test solament es pot aplicar un sol cop.

#### **4.4.3.7. Immunohistoquímica de fluorescència**

Les cèl·lules eren rentades en tampó fosfat salí (PBS), fixades amb paraformaldehid al 2% durant 30 minuts, permeabilitzades amb tampó fosfat salí amb Triton X-100 al 0,005% durant 30 minuts més, tres rentats amb PBS i posteriorment s'eliminà les restes de PBS i es va deixar incubar a 4°C al llarg de tota la nit amb l'anticòs primari diluït amb PBS (sc532, dilució 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Madrid, Espanya).

El següent dia es va deixar temperar la mostra uns 30 minuts aproximadament i seguidament es van fer tres rentats amb PBS per prosseguir amb l'incubació de l'anticòs secundari obtingut de cabra amb especificitat per reconèixer l'anticòs primari obtingut de ratolí, i marcat amb FITC. Després de 30 minuts d'incubació, les cèl·lules es van rentar 3 cops amb PBS per eliminar l'excés d'anticòs secundari per ésser observades al microscopi òptic.

#### 4.4.3.8. Aïllament del RNAm

El cultiu de les cèl·lules es va aturar per addició del tampó de lisi lliure de RNAases (Applied Biosystems, Madrid, Espanya). Les mostres amb tampó de lisi es van mantenir 1 hora a 4°C. L'obtenció del RNA es va dur a terme utilitzant l'aparell ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Madrid, Espanya). L'RNA de les cèl·lules es va extreure pel mètode de Trizol (Invitrogen). La concentració i puresa del RNA es va estimar per espectrofotometria (absorbància 260 nm/280 nm).

#### 4.4.3.9. Quantificació d'RNAm per RT-PCR a temps real

Amb 1 µg d'RNA total de cada mostra per retrotranscripció es va obtenir el cDNA per mitjà de l'utilització d'hexàmers a l'atzar (de l'anglès random hexamers) i de la transcriptasa reversa SuperScript II Rnase H<sup>-</sup> (Invitrogen, Barcelona, Espanya). L'expressió del RNAm es va quantificar per PCR quantitativa per mitjà de la tecnologia TaqMan en l'aparell ABI PRISM 5700 Sequence Detector System combinat amb el sistema de l'assaig 5' nuclease (Applied Biosystems). Totes les reaccions es van realitzar per triplicat usant 5 µl de cDNA en un volum final de 25 µl. L'RNAm de G3PDH va ser utilitzat com a control endogen. Els primers TaqMan i les sondes van ser específics per humà: DDR1, APC, CNPase, MBP i MOBP. Els *pre-designed Assays on Demand* utilitzats van ser els següents: l' Hs00233612\_m1 pel gen DDR1, l' Hs00181051\_m1 pel gen APC, l' Hs00263981\_m1 pel gen CNPase, l' Hs00922788\_m1 pel gen MBP i l' Hs00379220\_m1 pel gen MOBP.

L'expressió d'RNAm per cada mostra es va calcular aplicant el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  segons les instruccions d'Applied Biosystems. La quantificació de cDNA va realitzar-se respecte al calibrador de la mostra control que pel mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  es va assignar arbitràriament com 1.

#### **4.4.3.10. Anàlisi d'imatge**

Seccions representatives van ser analitzades amb un microscopi de fluorescència (Nikon Eclipse 600, Barcelona, Espanya) equipat amb una càmera i filtres que van permetre l'excitació dels electrons de la molècula FITC (495/10 nm de longitud d'ona).


Les estructures marcades amb FITC van ser digitalment fotografiades utilitzant objectius de diversa magnificació (x2 a x40, x100) després d'estar exposades a la longitud d'ona excitatòria per FITC uns 40 segons, segons les instruccions del software (AnalySIS<sub>TM</sub> software, Soft Imaging System, Münster, Alemanya).

Microfotografies de la regió del cos callós van ser analitzades amb el microscopi electrònic de transmissió (JEOL JEM-1011, Tokio, Japó) a una magnificació de 500 i 200 nm.

#### **4.4.3.11. Anàlisi estadística**

Les comparacions de les mesures preses entre grups van ser analitzades pel test de l'ANOVA o pel test T-student per dades no aparellades. El test de Tukey va ser utilitzat per comparacions múltiples de grups en el moment adequat. Els tests no paramètrics van ser aplicats en el cas que no es complís el supòsit d'homogeneïtat de variàncies (test de Kruskal-Wallis). Les variables categòriques van analitzar-se per el test  $\chi^2$ .

En l'estudi 2, l'ANOVA es va utilitzar per determinar l'efecte de 2 factors: el genotip i el tractament amb cuprizona; i el pes es va afegir com a covariable en alguns punts del test FOB per demostrar efectes significatius del genotip. La significació es va assignar com  $p < 0.05$ .



# Resultats

## 5.1. ESTUDI 1.

### Caracterització conductual durant el segon període de remielinització de ratolins tractats amb cuprizona al 0.2% durant 6 setmanes.

#### 5.1.1. Antecedents

Tal com hem comentat en la introducció d'aquesta tesis, DDR1 es troba en oligodendròcits madurs i presenta els seus nivells més alts d'expressió durant l'estadi de mielinització post natal en ratolí (Franco-Pons et al., 2006). Aquests resultats suggereixen que DDR1 participa en el desenvolupament i manteniment de la beina de mielina. Aquests resultats ens van permetre plantejar-nos un segon estudi, finançat pel *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS, projecte PI02-0498), on vàrem realitzar l'experiment de desmielinització/remielinització en ratolins per administració de cuprizona 0.2%. Es va fer una avaluació del comportament dels ratolins ja que en la literatura no existia cap estudi descrit. Els resultats de l'experiment es recullen en l'article signat per Franco-Pons i col·laboradors (2007) i que resumim a continuació:

Es va utilitzar un conjunt de tests comportamentals: la bateria d'observació funcional (*FOB*), *open-field test* i el *rota-rod test*. S'observà que en l'inici de la desmielinització (3<sup>a</sup> i 4<sup>a</sup> setmana de tractament amb cuprizona al 0.2%), els animals mostraven un increment en l'activitat del SNC i una inhibició de la resposta ansiògena enfront a un nou estímul. A les 5 setmanes de tractament, quan la desmielinització és màxima, l'equilibri dels animals es va alterar així com la reactivitat sensoriomotora. A més a més, l'anàlisi per *rota-rod* va demostrar que el grup tractat presentava un deteriorament de la coordinació motora respecte als animals control. Després de finalitzar l'administració per via oral de cuprizona al 0.2% (6<sup>a</sup> setmana) els animals van rebre dieta estàndard fins a les 12 setmanes, moment en el que s'avaluà el comportament dels animals i es va poder confirmar que aquests encara presentaven deficiències motores.

#### 5.1.2. Objectius

Partint dels resultats que anteriorment hem descrit, ens vam plantejar els següents objectius:

1. Avaluar el comportament dels animals en el període posterior a interrompre el tractament amb cuprizona i durant el segon pic de remielinització (setmana 8 de l'experiment).
2. Ampliar el nombre de proves de comportament, per afinar amb més detall en la valoració de paràmetres com l'ansietat, el dèficit d' inhibició, l'activitat i la marxa.
3. Avaluar el dany axonal i en la beina de mielina en els animals tractats amb cuprizona.
4. Recopilar la major informació possible sobre logística abans d'aplicar aquest model en ratolins deficients en DDR1.

### 5.1.3. Resultats

#### **Evolució del pes durant l'experiment**

El pes va incrementar al llarg del procediment experimental tot i que estava atenuat en el grups tractats amb cuprizona.

A les 8 setmanes d'iniciar l'estudi, el grup control havia incrementat el seu pes en un 114% mentre que el grup tractat ho havia fet en un 105% ( $p < 0.05$ ). Al final de l'estudi l'increment total del pes corporal fou de 121% pels controls i d'un 118% per als tractats amb cuprizona (la diferència entre els dos grups no resulta estadísticament significativa).

#### **Gruix i estructura de la beina de mielina**

Es va escollir el cos callós com estructura de substància blanca representativa per a l'estudi ultraestructural de la beina de mielina. Els resultats obtinguts amb el microscopi electrònic de transmissió es mostren en la Figura 11. En els animals controls el percentatge de axons mielinitzats es superior al 50%. A les 3 setmanes de seguir el tractament amb cuprizona la proporció d'axons mielinitzats es manté però la capa de mielina té una aparença més laxa i a més presenta punts de discontinuïtat (Figura 11, panells c i d). A la 6ena setmana de l'experiment mentre l'animal ha estat alimentat amb cuprizona la proporció d'axons mielinitzats decau per sota 20% i s'observa que els axons que tenen mielina la tenen molt poc compactada (Figura 11, panells e i f). A la 8ena setmana de l'experiment, després de dues setmanes sense administració de cuprizona, s'observa una proporció més gran d'axons mielinitzats i la mielina tot i que està més compactada té una gruixària

inferior que en les controls (Figura 11, panell g). A la 10ena setmana experimental la proporció d'axons mielinitzats es similar a la dels animals controls. El gruix i la compactació de la mielina també són normals (Figura 11, panell i), si bé encara s'observen alguns axons amb la beina de mielina alterada (Figura 11, panell j). A la 12ena i 20ena setmana de l'experiment l'aspecte de la mielina es similar al dels animals controls (Figura 11, panells k-m).

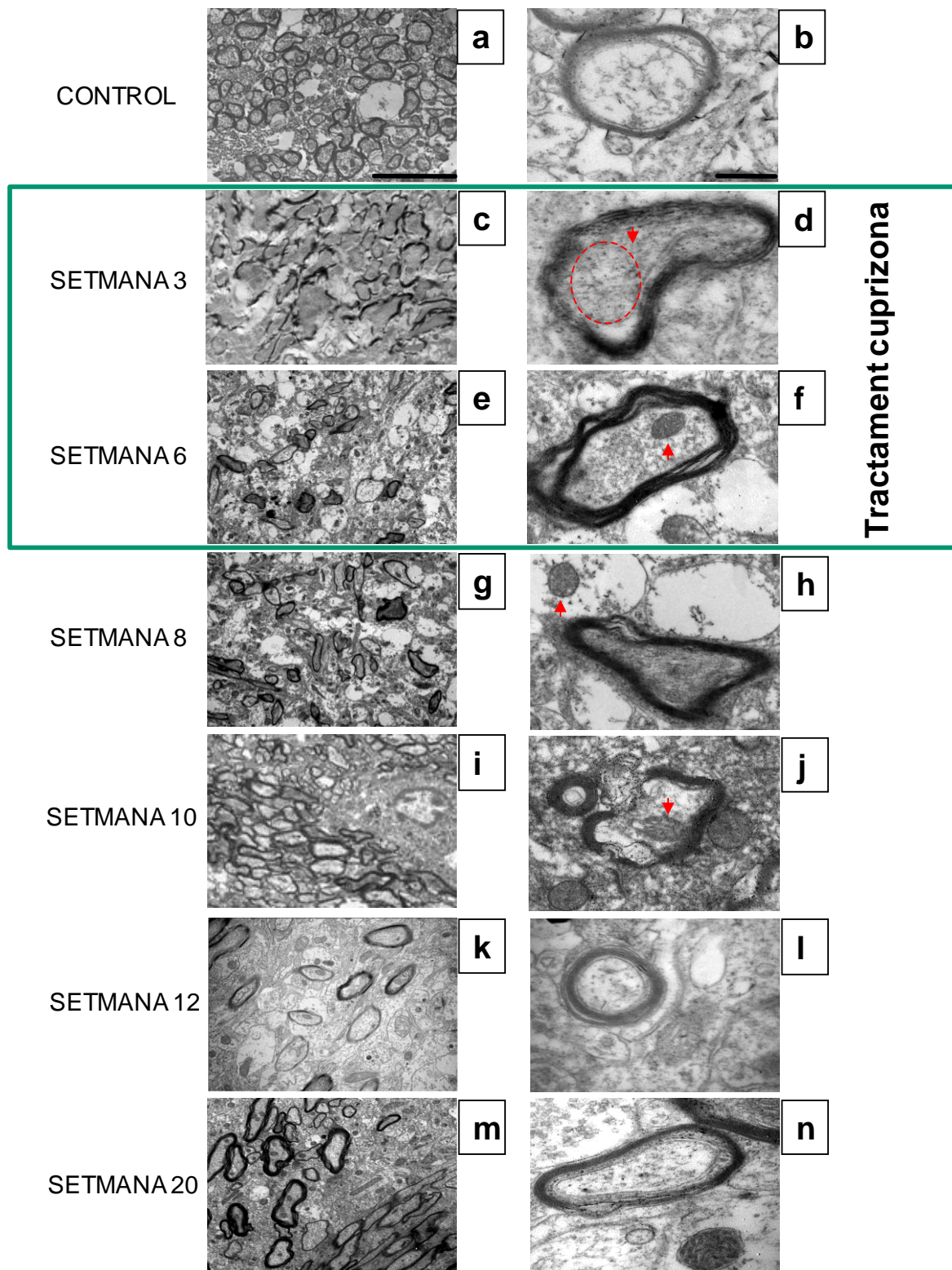
### **Estructura dels axons**

A la 3ena setmana de l'experiment quan fa 3 setmanes que reben tractament amb cuprizona, els axons dels animals tenen la morfologia (mida i forma) i la electrodensitat interna similar a la que presenten els animals controls (Figura 11, panells c i d).

Després de 6 setmanes de tractament s'observa una gran alteració en els axons. Per una banda existeix una alta proporció d'axons desmielinitzats amb l'estructura interna desorganitzada (com si estiguessin buits). Per altra banda es detecta en molts d'aquests axons la presència de mitocondris gegants (Figura 11, panells e i f). Dues setmanes després de retirar la cuprizona l'aparença dels axons és molt similar: hi segueix havent pocs axons mielinitzats i els no mielinitzats són clars i amb presència de mitocondris gegants (Figura 11, panells g i h).

A la setmana 10 de l'experiment, quan els ratolins ja porten 4 setmanes alimentats amb dieta normal, la majoria dels axons ja estan mielinitzats i tenen una aparença similar a la dels controls (Figura 11, panell i). No obstant, encara s'observen alguns axons amb mitocondris gegants (Figura 11, panell j). Tot i que s'ha descrit que a partir de les 6 setmanes d'haver deixat el tractament amb cuprizona els ratolins recuperen la normalitat en l'estructura de la mielina nosaltres encara observem algunes alteracions, com la presència més abundant de mitocondris gegants, en alguns axons a la setmana 12 i la setmana 20 de l'experiment (Figura 11, panells k-m).





**Figura 11.** Anàlisi ultraestructural per TEM del cos callós. Marcada desmielinització a la setmana 3 i a la setmana 8. Durant el pic de remielinització (8<sup>a</sup> setmana), els axons presenten una beina de mielina compactada i més prima que en la setmana prèvia i posterior al pic. El grup de 20 setmanes té un aspecte semblant al control. Les fletxes indiquen la posició de mitocondris gegants. L'escala emprada és de 500 i 200 nm.

## Tests de comportament

Els paràmetres de comportament que van mostrar un resultat estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ ) per efecte del tractament amb cuprizona es mostren en les taules 5 i 6. S'han obviat la resta de resultats per mostrar-ho de forma més clara.

### *Bateria d'observació funcional: functional observational battery –FOB-*

Un total de 18 paràmetres van ser puntuats per determinar el comportament anòmal dels rosegadors, indicant una disfunció del sistema nerviós central o perifèric. Els resultats estadísticament significatius es mostren a la taula 4. Els ratolins tractats amb cuprizona mostraven una menor activitat de neteja en la gàbia que els controls a les tres setmanes d'iniciar el tractament ( $p < 0.05$ ), mentre que a les sis, a les deu i a les dotze setmanes els tractats mostraven una davallada en la reacció al contacte respecte als seus controls ( $p < 0.05$ ). A les vuit setmanes el nombre d'aixecaments verticals a la gàbia fou significativament diferent ( $p < 0.05$ ), essent els tractats els qui realitzaven un menor nombre d'aixecaments verticals. Els animals tractats aconseguen finalitzar el test de pantalla invertida en més proporció que els animals controls (tot i que es giren, no pugen la pantalla fins el cap damunt) ( $p < 0.05$ ) després de deu setmanes d'iniciar l'experiment. A les dotze setmanes l'activitat de neteja a camp obert és major en els ratolins tractats amb cuprizona que en els controls ( $p < 0.05$ ).

En el grup de recuperació (20 setmanes) s'observa una disminució en la reacció dels animals al treure'ls de la gàbia respecte els seus controls ( $p < 0.05$ ).

Setmana	Paràmetre	Grup		Nivell de significació
		Controls	Tractats	
3	Activitat neteja (gàbia)	2.33± 0.65	0.75± 0.25	0.04
6	↓ Reacció al contacte	8/12	12/12	0.039
8	Aixecaments verticals	4.92±1.12	2.08±0.70	0.043
10	↓ Reacció al contacte	8/12	12/12	0.029
	Pantalla invertida (no finalitzen la prova)	6/12	1/12	0.025
12	Activitat neteja (camp obert)	0.67±0.23	1.64±0.28	0.013
	↓ Reacció al contacte	32/12	22/12	0.035
20	↓ Reacció al treure'ls de la gàbia	3/12	10/10	0.015

**Taula 4.** Diferències significatives entre grups en els paràmetres valorats per la bateria d'observació funcional (FOB). Només es mostren els resultats significatius ( $p < 0.05$ ). Resultats expressats com mitjana  $\pm$  error típic, excepte en les variables categòriques reacció al contacte, pantalla invertida i reacció al treure'ls de la gàbia, on els resultats s'han expressat en freqüències (nombre d'animals afectats/nombre total d'animals avaluats).

#### *Test Suspensió corporal: body suspension*

A la setmana 8 i 12 de l'estudi, els animals tractats amb cuprizona van mostrar un dèficit en la coordinació muscular i habilitat per utilitzar les extremitats posteriors ( $p < 0.05$ ). A la setmana 10 el tractament amb cuprizona va provocar una disminució de la força de subjecció dels animals ( $p < 0.05$ ). Els resultats es mostren a la taula 5.

#### *Test de les petjades: imprinting*

El grup tractat amb cuprizona presentava una distància entre passes significativament menor que el grup control a la setmana 8 i 11 de l'estudi ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ , respectivament). Resultats recollits en la taula 5.

#### *Test de coordinació motora i aprenentatge: rota-rod*

A la setmana 3 els animals tractats amb cuprizona presentaven una disminució de la latència a caure en el primer assaig d'aprenentatge ( $p < 0.05$ ), i en el segon assaig d'aprenentatge ( $p < 0.05$ ). En aquesta mateixa setmana també s'observà un major nombre de caigudes durant el primer assaig d'aprenentatge en el grup tractat ( $p < 0.001$ ). En la setmana 8, no obstant, el major nombre de caigudes durant el primer assaig d'aprenentatge s'observà en el grup control ( $p < 0.05$ ). Els resultats per aquest test es mostren a la taula 5.

Setmana	Test	Paràmetre	Grup		Nivell de significació
			Controls	Tractats	
3	RR	Latència caiguda al primer intent d'aprenentatge	30.17±12.50	2.50±0.31	0.049
		Latència caiguda al segon intent d'aprenentatge	57.42±11.08	21.92±7.67	0.015
		Caigudes primer intent	4.75±1.25	10.42±1.36	0.006
8	RR	Caigudes primer intent	16.25±2.89	8.92±1.51	0.027
	BS	Coordinació	1.83 ±0.11	1.25 ± 0.18	0.012
	IM	Distància entre passes	7.09±0.92	6.54±0.12	0.002
10	BS	Força de subjecció	3.33±0.58	1.83±0.40	0.046
12	BS	Coordinació	1.58 ±0.19	0.91 ± 0.16	0.015
	IM	Distància entre passes	3.92±0.06	3.59±0.06	0.001

**Taula 5.** Avaluació coordinació motora pel test de la coordinació motora i d'aprenentatge (RR), el test de suspensió corporal (BS) i pel test de les petjades (IM). Només es mostren els resultats significatius ( $p < 0.05$ ). Resultats expressats com la mitjana  $\pm$  error típic. La variable categòrica coordinació s'ha expressat com a freqüència (puntuació obtinguda al test/nombre total d'animals avaluats).

#### *Test dels dos Compartiments: Black and White compartment test*

Els resultats per aquest test es mostren a la taula 6. El tractament amb cuprizona comportava una disminució de les entrades al compartiment clar a la setmana 8 ( $p < 0.05$ ) i un augment de les entrades a les setmanes 10 ( $p < 0.05$ ) i 12 ( $p < 0.05$ ) de l'estudi.

D'altra banda, el temps en el compartiment fosc en els animals tractats amb cuprizona fou menor a la setmana 10 ( $p < 0.01$ ), 12 ( $p < 0.05$ ) i 20 ( $p < 0.05$ ).

A la setmana 12, el paràmetre latència d'entrada al compartiment clar fou inferior en el grup tractat amb cuprizona respecte al grup control ( $p < 0.05$ ).

#### *Activitat en el camp obert: open field*

Fins a la setmana 6 de l'estudi no observem resultats estadísticament significatius. Observem que durant l'interval de temps comprès entre els 0 i 5 primers minuts, els animals que han rebut cuprizona fan menys entrades al centre ( $p < 0.01$ ), s'hi estan menys temps ( $p < 0.01$ ), la distància recorreguda al centre i la distància total recorreguda són menors ( $p < 0.01$ ) i el nombre d'aixecaments verticals al centre durant aquest primer interval de temps és inferior ( $p < 0.01$ ).

Pel que fa al nombre d'aixecaments verticals en tot el camp obert, s'ha observat que en tots tres intervals de temps i en el còmput total, els grups tractats amb cuprizona són els qui en fan menys ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ , respectivament). En aquesta mateixa setmana, el grup tractat amb cuprizona presenta els valors de la distància total recorreguda ( $p < 0.05$ ) i distància total recorreguda al centre ( $p < 0.05$ ) inferiors als valors obtinguts en els controls.

A la setmana 10 la relació entre la distància recorreguda al centre i la distancia total recorreguda és superior en els tractats ( $p < 0.05$ ) en l'interval de temps comprés entre els 10 i 15 minuts.

En la setmana 12 els resultats estadísticament significatius s'observen en el primer interval de temps (entre els 0 i 5 minuts). En el grup tractat, la freqüència d'entrada al centre és inferior ( $p < 0.05$ ), a l'igual que el temps que romanen al centre ( $p < 0.05$ ), la distància recorreguda al centre ( $p < 0.05$ ) i el nombre d'aixecaments verticals al centre ( $p < 0.05$ ). La relació entre la distància recorreguda al centre respecte la distancia total recorreguda és superior en els controls ( $p < 0.05$ ).

El temps que els animals s'estan al centre és més baix en el grup tractat amb cuprizona ( $p < 0.05$ ) durant el primer interval de temps (entre els 0 i 5 minuts) a la setmana 20 d'aquest l'estudi Els resultats per aquest test es mostren a la taula 6.

Setmana	Test	Paràmetre	Grup		Nivell de significació
			Controls	Tractats	
6	OF	Freqüència d'entrades al centre 0-5'	17.17±1.65	10.83±0.69	0.002
		Temps al centre 0-5'	31.13±3.86	18.47±1.31	0.008
		Distància recorreguda al centre 0-5'	567.08±62.31	328.67±26.64	0.002
		Distància total recorreguda 0-5'	3405.42±246.05	2612.17±129.35	0.009
		Rearings al centre 0-5'	14.17±1.50	8.58±0.62	0.002
		Rearings 0-5'	32.92±3.85	20.75±2.25	0.012
		Rearings 5-10'	35.50±3.44	26.33±1.77	0.027
		Rearings 10-15'	33.75±2.48	25.92±2.57	0.039
		Distància total recorreguda	8973.20±448.09	7476.63±313.69	0.012
		Distància total recorreguda al centre	1746.14±169.54	1304.45±104.30	0.037
	Rearings totals	102.17±6.66	73.00±4.98	0.002	
8	B&W	Entrades al compartiment clar	6.92±0.50	5.17±0.42	0.014
10	B&W	Entrades al compartiment clar	5.42± 0.50	7.08± 0.53	0.032
		Temps en el compartiment fosc	197.33± 4.62	175.75± 5.55	0.007
	OF	Distància recorreguda centre/total 10-15'	0.20±0.13	0.25±0.21	0.034
12	B&W	Latència d'entrada	64.17± 11.31	35.08± 5.85	0.036
		Entrades al compartiment clar	5.17± 0.37	7.25± 0.74	0.022
		Temps en el compartiment fosc	186.50± 6.78	165.83± 3.88	0.017
	OF	Freqüència d'entrades al centre 0-5'	16.25±1.69	11.00±1.37	0.025
		Temps al centre 0-5'	30.35±3.47	18.78±2.65	0.015
		Distància recorreguda al centre 0-5'	454.09±44.28	312.41±38.33	0.024
	Rearings al centre 0-5'	12.00±1.31	7.83±1.33	0.036	
	Distància recorreguda centre/total 0-5'	0.16±0.02	0.12±0.01	0.047	
20	B&W	Temps en el compartiment fosc	186.50±6.78	157.10±8.83	0.014
	OF	Temps al centre 0-5'	46.95±6.27	28.14±4.59	0.030

**Taula 6.** Avaluació de l'ansietat de l'animal mitjançant el test dels dos compartiments (B&W) i el test de l'activitat a camp obert (OF) . Només es mostren els resultats significatius ( $p < 0.05$ ). Resultats expressats com la mitjana ± error típic.

## 5.2. ESTUDI 2.

### **Caracterització conductal i estructura de la mielina en el ratolí deficient per DDR1 i estudi de la seva capacitat de remielinització.**

#### 5.2.1. Antecedents

Un cop establert al nostre laboratori el model de demielinització-remielinització per administració oral de cuprizona i establertes les pautes d'alteració del comportament dels ratolins sotmesos a aquest model, vàrem iniciar l'estudi següent per avaluar quins dèficits conductuals presentaven els ratolins deficientes per DDR1 i com responien a la desmielinització causada per l'administració de cuprizona.

#### 5.2.2. Objectius

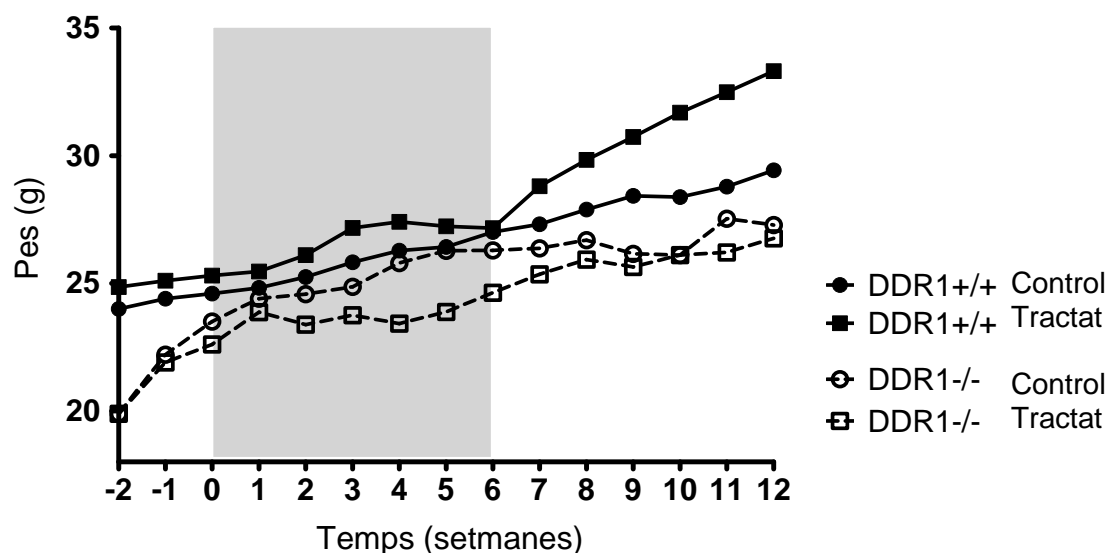
1. Estudiar morfològicament l'estructura de les fibres mielinitzades en el cos callós com una àrea representativa de substància blanca en el ratolí deficient per DDR1.
2. Avaluar el comportament dels ratolins deficientes per DDR1 i comparar els resultats amb els obtinguts en els animals salvatges.
3. Estudiar morfològicament l'estructura de les fibres mielinitzades en el cos callós en el ratolí deficient per DDR1 durant el procés de desmielinització i en la etapa de remielinització.
4. Avaluar el comportament dels ratolins deficientes per DDR1 durant el procés de desmielinització i en la etapa de remielinització.
5. Comparar l'estructura de les fibres mielinitzades del cos callós en el ratolí deficient per DDR1 amb l'estructura dels ratolins salvatges durant el procés de desmielinització i en la etapa de remielinització.
6. Comparar les alteracions en el comportament del ratolí deficient per DDR1 amb el ratolí salvatge durant el procés de desmielinització i en la etapa de remielinització

### 5.2.3. Resultats

#### Pes i resultats generals

El pes es va mesurar setmanalment tal com s'indica en la Figura 12. Al final de l'estudi l'increment total del pes corporal fou de 115% per la varietat salvatge DDR1 (DDR1+/+) control i d'un 130% per la varietat DDR1+/+ tractat (nivell de significació  $p < 0.0001$ ). Figura 12, panell B.

Tant els animals DDR1-/- controls com tractats presentaven al final de l'estudi un increment del 107% i 105% respectivament (valor  $p$  no significatiu). Els animals DDR1-/- eren més petits i per aquest motiu es va utilitzar el seu pes com a covariable quan va ser necessari. Un dels animals deficientes per DDR1 no va guanyar pes i va tenir que ser sacrificat i eliminat de l'estudi.



**Figura 12.** Evolució del pes dels animals. El pes va ser mesurat setmanalment. Es mostren els valors de les mitjanes sense la seva desviació estàndard per evitar confusions alhora d'interpretar el gràfic. L'ANOVA va revelar diferències estadísticament significatives segons el genotip, tractament i temps ( $p < 0.05$ ).

#### Efecte del genotip sobre l'axó i la beina de mielina en el cos callós

La mida de l'axó va veure's incrementada al transcurs de l'estudi en els ratolins control DDR1+/+ amb una mitjana de  $0.87 \mu\text{m}^2$  a la setmana 0 fins assolir el valor de  $1.52 \mu\text{m}^2$  a la setmana 12, en decrement de la densitat dels axons (Figura 13, panel a). Una marcada correlació negativa ( $\rho = -0.7$ ,  $P < 0.05$ ) entre la mida de l'axó i la seva



densitat es va observar a les 12 setmanes de l'estudi, fet que evidencia el creixement dels axons.

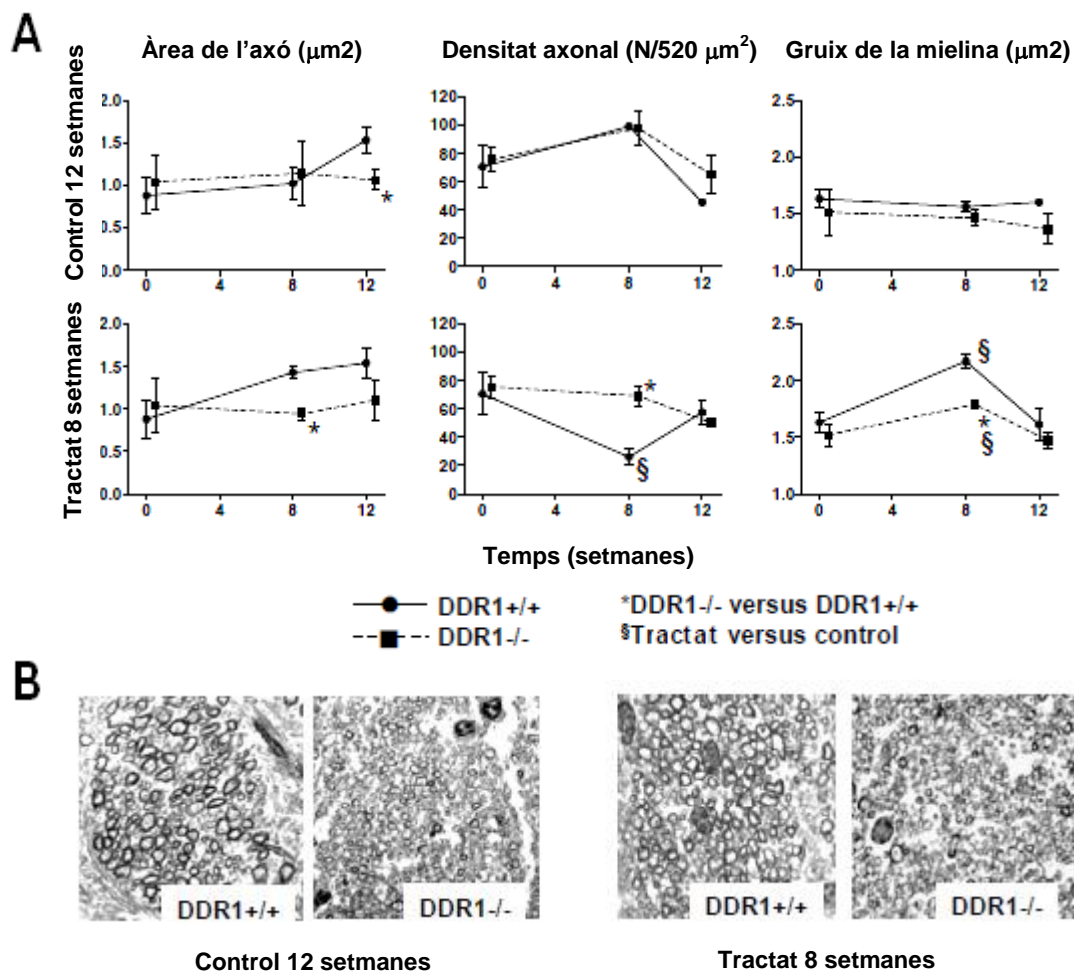
Una dada interessant per destacar en els ratolins deficients per DDR1 és una major variabilitat en la mida de l'axó, essent la mitjana a la setmana 12 de l'estudi més petita que la dels seus homòlegs portadors del gen (Figura 13, panel a i b,  $p < 0.05$ ). El gruix de la beina de mielina fou lleugerament més petita en els animals DDR1<sup>-/-</sup> al llarg de l'experiment comparat amb els DDR1<sup>+/+</sup> (Figura 13, panel a, dades estadísticament no significatives). Els animals deficients per DDR1 mostraven uns axons més petits, més densos i amb una beina de mielina més prima que els DDR1<sup>+/+</sup> (Figura 13, panels a i b).

### **Efecte del tractament amb cuprizona sobre l'axó i la beina de mielina en el cos callós**

Tal i com era d'esperar, durant el segon pic de remielinització (setmana 8) els animals del grup tractat DDR1<sup>+/+</sup> van exhibir una densitat de l'axó menor si ho comparem amb el grup control (Figura 13, panel a i b,  $p < 0.05$ ). A la setmana 12 la densitat de les fibres de mielina fou similar a la del control. El gruix de la beina de mielina al pic de remielinització en els animals del grup tractat DDR1<sup>+/+</sup> fou significativament major ( $p < 0.05$ ) que en el grup control.

A la setmana 8, els animals DDR1<sup>-/-</sup> tractats amb cuprizona presentaven diferències estadísticament significatives respecte tots els paràmetres de mielina comparat amb els animals DDR1<sup>+/+</sup> tractats amb cuprizona (mida de l'axó, densitat i gruix de la beina de mielina; tots amb una  $p < 0.005$ ; Figura , panels a i b). A més a més, els DDR1<sup>-/-</sup> tractats amb cuprizona diferien dels DDR1<sup>+/+</sup> control no tractats només en el gruix de la beina de mielina ( $p < 0.05$ ).

A la setmana 8, cal remarcar l'increment del 133% en el gruix de la beina de mielina observat en els animals DDR1<sup>+/+</sup> respecte un 117% observat als DDR1<sup>-/-</sup>, fet que evidencia que en els DDR1<sup>-/-</sup> responen menys a la remielinització dels axons. Un cop finalitzat el tractament amb cuprizona, els paràmetres de la mielina van retornar a valors similars tant els grups control DDR1<sup>+/+</sup> com en els grups control DDR1<sup>-/-</sup> (setmana 12 de l'estudi).



**Figura 13.** Àrea i densitat axonal i gruix de les fibres de mielina durant el procés de remielinització en el cos callós. **A.** Els gràfics de la dreta i esquerra representen el calibre de l'axó, la densitat axonal i gruix de la beina de mielina. Símbols representats per la mitjana  $\pm$  desviació típica. Línies contínues amb cercles representen els DDR1 +/+ mentre que les línees discontinües amb quadrats representen els DDR1 -/-. El test T-Student va ser usat per comparar les mitjanes entre genotips (diferències estadísticament significatives a  $*p < 0.05$ ) i entre el tractat i el grup control (§ $p < 0.05$ ). Els valors àrea de l'axó, densitat axonal i el gruix de la beina de mielina van ser calculats a partir de 100 mesures. Dos investigadors cecs van avaluar l'estat del teixit aplicant mesures morfomètriques. **B.** Tinció amb blau de toluïdina de seccions semifines de fibres de mielina procedents del cos callós. La mostra es va observar a 100X. DDR1 -/- presenta un gruix de la mielina inferior i durant la remielinització induïda als animals tractats amb cuprizona (8<sup>a</sup> setmana), aquests presenten diferències significatives amb els ratolins de la varietat salvatge.

## Tests de comportament

### *Test Bateria d'observació funcional: functional observational battery*

#### Diferències entre DDR1<sup>-/-</sup> i DDR1<sup>+/+</sup>

Un total de 18 paràmetres van ser avaluats per analitzar l'estat general de l'animal. En global es va observar un efecte del genotip en les diferències observades pel FOB (Taula 5). Els ratolins DDR1<sup>-/-</sup> mostraven alteracions en el caminar i dèficits en la coordinació motora (test de la pantalla invertida) comparat amb els DDR1<sup>+/+</sup> ( $p < 0.01$ ). Aquest efecte del genotip sobre el caminar era independent del temps experimental. A partir de la 6<sup>a</sup> setmana, els animals deficients per DDR1 mostraven una davallada en la reacció per contacte (test de resposta al contacte,  $p < 0.05$ ).

Anàlisis quantitius del FOB van mostrar també que el genotip influenciava en el comportament. Animals deficients amb DDR1<sup>-/-</sup> tenien la tendència de tenir menys activitat de neteja en el test al camp obert que els ratolins DDR1<sup>+/+</sup>, essent els valors significativament diferents en les setmanes 3, 5, 7 i 12 (Taula 5,  $p < 0.05$ ). Hi ha una tendència d'incrementar el nombre d'aixecaments verticals quan s'observa l'animal en la seva caixa: el grup DDR1<sup>-/-</sup> presenta diferències significatives respecte al control en la setmana 12 (Taula 5,  $p < 0.0001$ ).

#### Efecte del tractament amb cuprizona entre DDR1<sup>-/-</sup> i DDR1<sup>+/+</sup>

Els animals DDR1<sup>+/+</sup> tractats amb cuprizona durant 6 setmanes presentaven algunes alteracions com: 1) En la setmana 7, els animals mostren dificultat per donar-se la volta quan l'animal es col·loca sobre la seva espatlla. ( $p < 0.05$ ) 2) Hi ha una davallada en la reacció a la manipulació a partir de la setmana 10 ( $p < 0.05$ ) (Taula 5). Els animals DDR1<sup>-/-</sup> tractats van presentar efectes contraposats respecte els DDR1<sup>-/-</sup> controls puntualment: diferències estadísticament significatives, en quan a la capacitat de donar-se la volta, a les setmanes 1 i 6 ( $p < 0.05$ ) i en quan a la mobilitat a les setmanes 7, 9 i 10 ( $p < 0.05$ ) (Taula 5).

El tractament amb cuprizona en el grup DDR1<sup>+/+</sup> fa decreixer l'activitat d'aixecaments verticals i l'activitat de neteja, essent estadísticament significatiu en les setmanes 3, 7 i 12 (Taula 6,  $p < 0.05$ ). El tractament en cuprizona als ratolins DDR1<sup>-/-</sup> només comporta una davallada dels aixecaments verticals (Taula 6,  $p < 0.05$ ).

Es va utilitzar el test estadístic ANOVA per mesures repetides considerant el genotip i el tractament com a factors i els dies com a variables moduladores per determinar un possible efecte de la durada de l'estudi en el nombre d'aixecaments verticals i en l'activitat de neteja a la gàbia i a camp obert. No es van observar efectes per cap dels paràmetres analitzats. El reduït nombre d'animals en que es va poder treballar hauria de tenir-se en compte en vers els resultats obtinguts.

Setmana	Paràmetre	Grup			
		Controls		Tractats	
		Ddr1+/+	Ddr1-/-	Ddr1+/+	Ddr1-/-
1	Pas	0/7	<b>6/6***</b>	-	-
	Abnormalitats al pas	0/7	<b>6/6***</b>	-	-
	Pantalla invertida	4/7	<b>6/6**</b>	-	-
2	Pas	2/7	<b>5/6*</b>	1/7	5/6
	Abnormalitats al pas	1/6	<b>5/6*</b>	1/7	5/6
	Pantalla invertida	3/6	<b>6/6*</b>	3/7	5/6
	Capacitat per adreçar-se	1/6	3/6	0/7	<b>0/6*</b>
3	Pas	0/7	<b>6/6**</b>	0/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/7	<b>6/6***</b>	0/7	6/6
	Pantalla invertida	2/7	<b>5/6*</b>	0/7	4/6
4	Pas	0/7	<b>6/6**</b>	0/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/7	<b>6/6***</b>	0/7	6/6
	Pantalla invertida	1/7	<b>4/6*</b>	0/7	4/6
5	Pas	0/7	<b>6/6**</b>	1/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/7	<b>6/6***</b>	1/7	6/6
	Movilitat	0/7	<b>3/6*</b>	1/7	5/6
	Pantalla invertida	1/7	<b>5/6*</b>	0/7	5/6
	Capacitat per adreçar-se	0/7	<b>4/6*</b>	0/7	3/6
6	Pas	0/7	<b>6/6**</b>	0/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/7	<b>6/6***</b>	0/7	6/6
	↓ reacció al contacte	0/7	<b>3/6*</b>	0/7	3/6
	Movilitat	0/7	<b>1/6*</b>	0/7	6/6
	Capacitat per adreçar-se	0/7	3/6	2/7	<b>5/6*</b>
7	Pas	0/7	<b>6/6**</b>	0/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/7	<b>6/6***</b>	0/7	6/6
	↓ reacció al contacte	0/7	<b>4/6**</b>	1/7	4/6
	Capacitat per adreçar-se	0/7	<b>5/6**</b>	<b>4/7*</b>	6/6
	Movilitat	0/7	1/6	0/7	<b>6/6*</b>
	miccions (camp obert)	1/7	3/6	2/7	<b>0/6*</b>
8	Pas	0/6	<b>6/6**</b>	1/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/6	<b>6/6**</b>	0/6	6/6
	↓ reacció al contacte	0/6	<b>5/6**</b>	1/7	4/6
9	Pas	0/6	<b>6/6**</b>	0/7	6/6
	Abnormalitats al pas	0/6	<b>6/6**</b>	0/7	0/6
	↓ reacció al contacte	0/6	<b>5/6**</b>	1/7	3/6
	Movilitat	0/6	0/6	0/7	<b>3/3*</b>
10	Abnormalitats al pas	0/3	<b>4/4**</b>	0/4	4/4
	↓ reacció al contacte	0/3	<b>4/4**</b>	2/4	4/4
	↓ reacció a la manipulació	0/3	1/4	<b>3/4*</b>	3/4
	Movilitat	0/3	0/4	0/4	<b>3/4*</b>
11	Abnormalitats al pas	0/3	<b>3/3*</b>	0/4	4/4
	↓ reacció al contacte	0/3	<b>4/4**</b>	1/4	4/4
	↓ reacció a la manipulació	0/3	1/4	<b>3/4*</b>	3/4
12	Pas	0/3	<b>4/4*</b>	0/4	4/4
	Abnormalitats al pas	0/3	<b>4/4**</b>	0/4	4/4
	↓ reacció al contacte	0/3	<b>4/4**</b>	0/4	4/4
	↓ reacció a la manipulació	0/3	1/4	<b>3/4*</b>	4/4

**Taula 5.** Anàlisi qualitatiu per l'FOB. Resultats expressats com el nombre d'animals afectats/ nombre d'animals assajats. Amb negreta els resultats significatius. El grau de significació ve marcat per \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) i \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Els diferents grups es comparen amb els seus controls (control DDR1-/- versus control DDR1+/+, tractat DDR1+/+ versus control DDR1+/+, tractat DDR1-/- versus control DDR1-/-).

Setmana	Paràmetre	Grup			
		Controls		Tractats	
		<i>Ddr1+/+</i>	<i>Ddr1-/-</i>	<i>Ddr1+/+</i>	<i>Ddr1-/-</i>
3	<i>Rearings</i> (caixa)	7.14±1.94	4.33±1.69	<b>1.00±0.53*</b>	1.83±1.45
	<i>Groomings</i> (camp obert)	1.28±0.18	<b>0.17±0.17**</b>	1.00±0.22	0.67±0.21
5	<i>Groomings</i> (camp obert)	2.00±0.31	<b>0.33±0.21**</b>	1.14±0.34	0.17±0.17
7	<i>Rearings</i> (caixa)	4.57±1.44	4.67±1.08	3.29±1.23	<b>1.00±0.68*</b>
	<i>Groomings</i> (camp obert)	2.29±0.57	<b>0.33±0.21*</b>	<b>0.85±0.14*</b>	1.17±0.65
12	<i>Rearings</i> (caixa)	1.33±1.33	<b>5.75±0.48*</b>	1.75±1.43	<b>0.75±0.75**</b>
	<i>Groomings</i> (camp obert)	2.33±0.33	<b>1.25±0.25*</b>	<b>1.25±0.25*</b>	0.75 ±0.48

**Taula 6.** Anàlisi quantitativ per l'FOB. Resultats expressats com la mitjana ± desviació estàndard. Amb negreta els resultats significatius. El grau de significació ve marcat per \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) i \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Els diferents grups es comparen amb els seus controls (control DDR1-/- vs control DDR1+/+, tractat DDR1+/+ vs control DDR1+/+, tractat DDR1-/- vs control DDR1-/-).

### *Test Suspensió corporal: body suspension*

#### Diferències entre DDR1-/- i DDR1+/+

Es va detectar novament, l'efecte del genotip en les diferències observades en aquest test: força de subjecció (Taula 7,  $p < 0.001$ ) i en la coordinació muscular (Taula 7,  $p < 0.001$ ). Els ratolins deficientes en DDR1 presentaven una força de subjecció i coordinació muscular empobrida comparat amb els animals DDR1+/+ controls.

#### Efecte del tractament amb cuprizona entre DDR1-/- i DDR1+/+

El tractament en cuprizona va deteriorar lleugerament la força de subjecció a l'igual que la coordinació muscular, a partir de la tercera setmana en els animals DDR1+/+, tot i que aquestes diferències van ser estadísticament significatives en la setmana 3 per la força de subjecció ( $p < 0.05$ ) i en la setmana 7 per la coordinació muscular ( $p < 0.05$ ). El tractament en cuprizona no va afectar el comportament en els ratolins DDR1-/- (Taula 7).

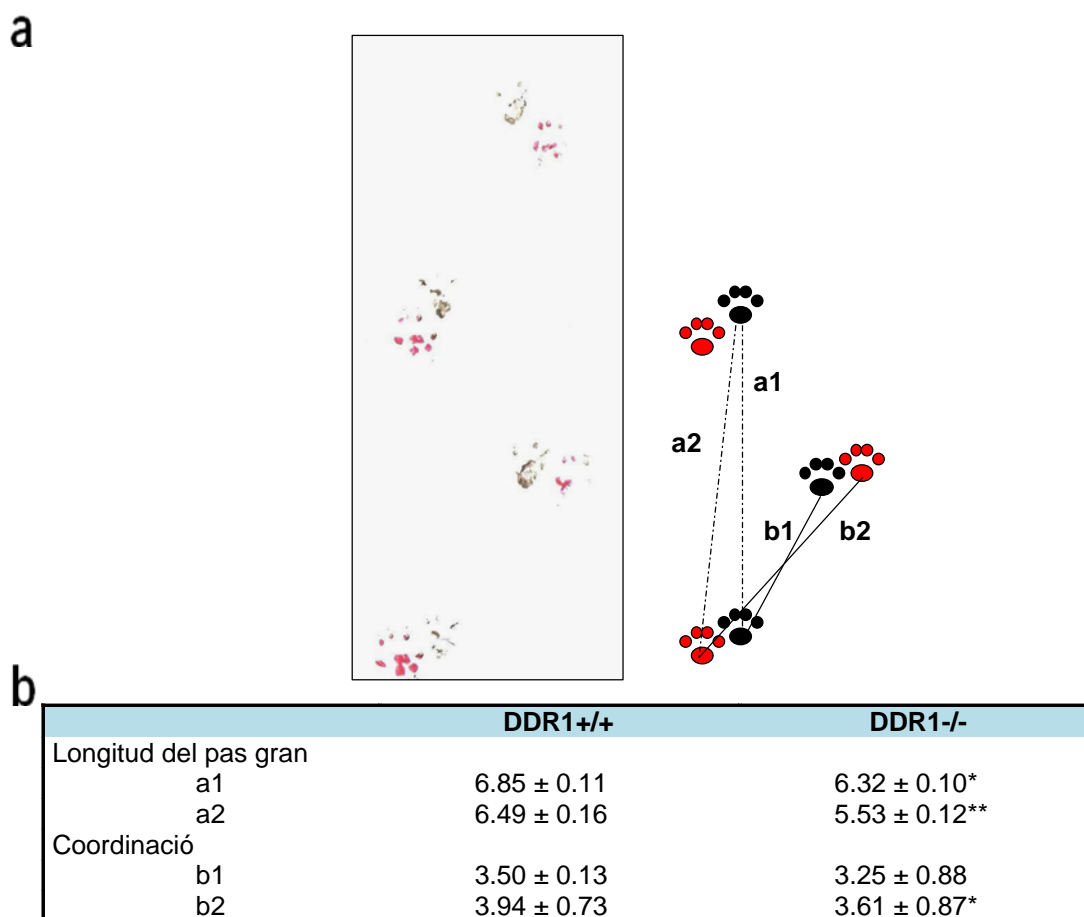
## Resultats

Setmana	Grup			
	Controls		Tractats	
	<i>Ddr1+/+</i>	<i>Ddr1-/-</i>	<i>Ddr1+/+</i>	<i>Ddr1-/-</i>
<b>Força de subjecció extremitats anteriors</b>				
1	4.21±0.48	<b>1.67±0.28***</b>	-	-
2	3.71±0.48	<b>1.83±0.31**</b>	4.14±0.59	2.50±0.56
3	4.00±0.31	<b>1.50±0.22***</b>	<b>2.71±0.28*</b>	2.00±0.26
4	3.57±0.37	<b>1.33±0.21***</b>	2.57±0.43	1.33±0.21
5	4.57±0.81	<b>1.17±0.17**</b>	3.00±0.49	1.00±0.00
6	3.71±0.75	<b>1.17±0.17*</b>	2.43±0.30	1.00±0.00
7	3.86±0.80	<b>1.00±0.00*</b>	2.43±0.43	1.00±0.00
8	3.83±0.87	<b>1.00±0.00*</b>	3.14±1.01	1.17±0.17
9	3.33±0.33	<b>1.20±0.20**</b>	4.87±1.75	2.00±0.52
10	3.67±0.33	<b>1.00±0.00*</b>	2.00±0.57	1.25±0.25
11	4.00±0.58	<b>1.00±0.00**</b>	2.50±0.29	1.50±0.29
12	5.00±1.00	1.50±0.29	3.00±0.41	2.00±0.41
<b>Coordinació muscular i habilitat per utilitzar les extremitats posteriors</b>				
1	1.79±0.15	<b>0.92±0.19**</b>	-	-
2	1.71±0.18	1.33±0.33	2.00±0.00	0.50±0.22
3	1.86±0.14	<b>0.67±0.21**</b>	1.57±0.20	0.33±0.33
4	1.71±0.18	<b>0.50±0.22**</b>	1.29±0.29	0.33±0.33
5	1.71±0.18	<b>0.50±0.22**</b>	1.57±0.20	0.33±0.33
6	1.71±0.18	<b>0.67±0.21**</b>	1.57±0.20	0.33±0.33
7	1.71±0.18	<b>0.67±0.21**</b>	<b>0.86±0.26*</b>	0.33±0.33
8	1.67±0.21	<b>0.67±0.33*</b>	1.00±0.22	0.33±0.33
9	1.83±0.17	<b>0.20±0.20***</b>	1.63±0.18	0.33±0.33
10	2.00±0.00	<b>0.25±0.25**</b>	1.50±0.50	0.50±0.50
11	1.67±0.33	<b>0.25±0.25*</b>	1.50±0.50	0.75±0.48
12	2.00±0.00	<b>0.25±0.25**</b>	1.75±0.25	0.75±0.48

**Taula 7.** Test *Suspensió Corporal*. Resultats expressats com la mitjana ± desviació estàndard. Amb negreta els resultats significatius. La força de subjecció en les extremitats anteriors és el temps que el ratolí va estar suspès sobre una goma elàstica. La coordinació muscular es va mesurar com la habilitat per utilitzar les extremitats posteriors (cap de les dues=0, utilitza una de les dues=1, utilitza les dues=2). El grau de significació ve marcat per \* (p<0,05), \*\* (p<0,01) i \*\*\* (p<0,001). Els diferents grups es comparen amb els seus controls (control DDR1-/- versus control DDR1+/+, tractat DDR1+/+ versus control DDR1+/+, tractat DDR1-/- versus control DDR1-/-).

### Test de les petjades: imprinting

Les mesures de les petjades es van realitzar setmanalment. Es va observar una influència significativa del genotip sobre: 1) la longitud del pas gran, distància mesurada entre la base central del peu de 2 petjades consecutives de cadascun dels constats ; 2) la distància entre la base central del peu en les extremitats anteriors i posteriors; 3) coordinació de les extremitats, mesurat com la distància entre les extremitats posteriors (Figura 14,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , respectivament). No es van apreciar efectes del pes en aquest test. Els ratolins DDR1<sup>-/-</sup> presentaven un longitud del pas gran més curta i un suport de la base més estret comparat amb els exemplars control (Figura 14). No es van apreciar efectes de la cuprizona en l'execució del test.



**Figura 14.** Anàlisi de petjades.. A. Petjada representativa d'un animal control. Les marques negres corresponen a les extremitats anteriors mentre que les vermelles corresponen a les extremitats posteriors. La longitud del pas gran (a1 i b1) i la coordinació motora (a2 i b2) van ser mesurats tal i com es descriu en la secció de material i mètodes d'aquesta tesis. B. Resultats expressats com la mitjana ± desviació estàndard. Amb negreta els resultats significatius Els animals DDR1<sup>-/-</sup> presentaven una longitud del pas més curta i una pitjor coordinació respecte els DDR1<sup>+/+</sup> (\*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$ , respectivament). No es van apreciar efectes de la cuprizona i del pes en l'execució d'aquest test.



### *Test dels dos Compartiments: Black and White compartment test*

#### Diferències entre DDR1<sup>-/-</sup> i DDR1<sup>+/+</sup>

Els ratolins DDR1<sup>-/-</sup> van invertir més segons per entrar en el compartiment clar (latència d'entrada) que els seus controls DDR1<sup>+/+</sup> (Figura 14 panel A,  $p < 0.001$ ).

Finalment, els ratolins DDR1<sup>-/-</sup> van fer un major nombre de transicions al compartiment clar que els seus homòlegs salvatges (Figura 14, panel C,  $p < 0.01$ ).

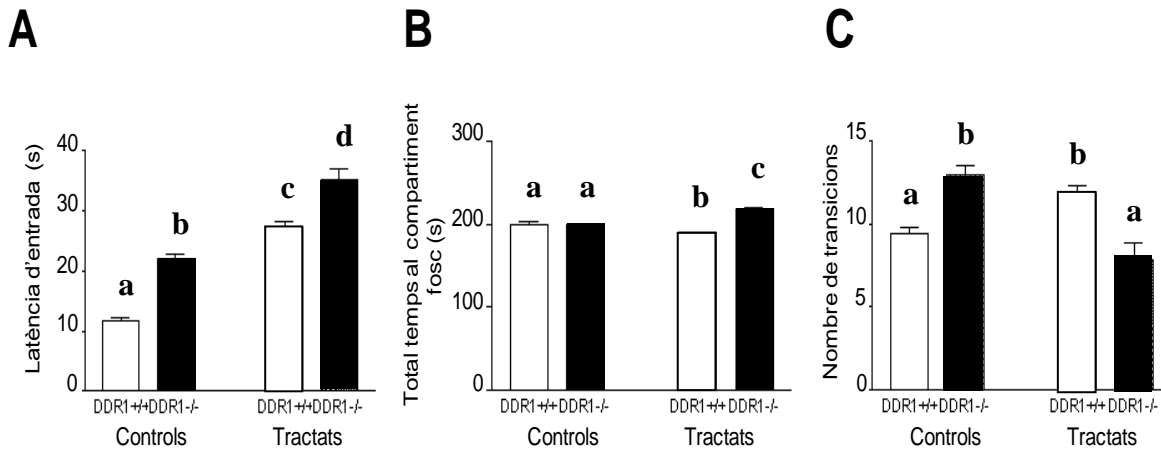
#### Efecte del tractament amb cuprizona entre DDR1<sup>-/-</sup> i DDR1<sup>+/+</sup>

El tractament en cuprizona comportava un increment de la latència d'entrada al compartiment clar ( $p < 0.05$ ) i aquest efecte fou més acusat en els ratolins DDR1<sup>-/-</sup> ( $p < 0.001$ , en la interacció del genotip i el tractament amb cuprizona). El panel A en la figura 14, mostra que tant els ratolins DDR1<sup>+/+</sup> com en els DDR1<sup>-/-</sup> que han estat tractats amb cuprizona, els ratolins inverteixen més temps en creuar al compartiment clar que els seus respectius controls ( $p < 0.001$ ).

Tot i que els ratolins deficientes en DDR1 no inverteixen més temps en el compartiment fosc que els ratolins salvatges (Figura 14, panel B), es va veure un efecte important de la cuprizona que depenia del genotip dels exemplars. Es va fer el test ANOVA considerant el temps total en el compartiment fosc com una variable dependent, cosa que va permetre determinar que aquest paràmetre estava influenciat pel genotip ( $p < 0.001$ ), el tractament per cuprizona ( $p < 0.05$ ) i la interacció entre aquests dos ( $p < 0.001$ ).

L'interessant d'aquest test és que el tractament en cuprizona feia disminuir el temps en el compartiment fosc en els animals DDR1<sup>+/+</sup> i ho incrementava en els cas dels DDR1<sup>-/-</sup>.

El nombre de transicions al compartiment clar també es veia influenciat pel tractament en cuprizona ( $p < 0.05$ ) i la interacció entre el genotip i el tractament en cuprizona. Els animals DDR1<sup>+/+</sup> van experimentar un increment en el nombre de transicions al compartiment clar ( $p < 0.05$ ) mentre que els DDR1<sup>-/-</sup> tractats amb cuprizona efectuaven un menor nombre de transicions ( $p < 0.001$ ). Aquest últim resultat està en concordança amb l'increment del temps total en el compartiment fosc observat en els DDR1<sup>-/-</sup> tractats amb cuprizona.



**Figura 15.** Test dels 2 compartiments. En el panel A, és representat la latència d'entrada al compartiment clar dels diferents grups, expressat en segons (s). En el B, hi figura el total de temps invertit dels animals de cada grup en el compartiment fosc, també expressat en segons (s). Finalment en el panel C, hi ha el nombre de transicions al compartiment clar per cadascun dels grups. Les comparacions entre grups es va fer amb el test ANOVA. Es va assignar el valor de significació a  $p < 0.05$ . Les lletres sobre les barres indiquen diferències estadísticament significatives entre els grups.

### 5.3. ESTUDI 3.

#### **El receptor domini discoidina 1 es troba sobre expressat durant la diferenciació de la línia cel·lular oligodendroglial HOG16**

##### 5.3.1. Antecedents

En un estudi previ, es va corroborar tant a nivell proteic com d'mRNA que l'expressió de DDR1 estava estretament lligada amb el procés de mielinització post natal en ratolí, suggerint que DDR1 participava en el desenvolupament i manteniment de la beina de mielina (Franco-Pons et al., 2006). Partint d'aquestes dades, vam voler plantejar-nos un nou estudi per tal d'avaluar amb més detall la contribució de DDR1 en el procés de mielinització emprant un model cel·lular *in vitro*. Els cultius primaris d'oligodendròcits humans són molt complicats d'establir i per això ens vàrem decantar per buscar una línia cel·lular establerta. A més també volíem que fos humana. Per cerca bibliogràfica vàrem trobar dues línies d'oligodendròcits immadurs que ens podien servir, la línia MOG13.13 i la línia HOG16. Ens vàrem posar en contacte amb Eucellbank (Universitat de Barcelona) per a que demanes les línies als investigadors i poses a punt els cultius. Eucellbank ens va proporcionar les cèl·lules lliures de micoplasmes. En el laboratori vàrem fer proves d'expressió de proteïnes de mielina i finalment varem escollir les cèl·lules HOG16 ja que aconseguíem millor un protocol de maduració (resultats no mostrats en aquesta tesi).

##### 5.3.2. Objectius

D'acord amb els resultats previs ens vam plantejar els següents objectius:

1. Esbrinar si en el procés de maduració de les cèl·lules HOG16 DDR1 augmentava la seva expressió de manera paral·lela a altres gens de proteïnes clàssicament conegudes com proteïnes de la mielina.
2. Determinar si hi ha canvis morfològics en els oligodendròcits que han estat sotmesos a diferenciació i en el patró d'expressió de DDR1.

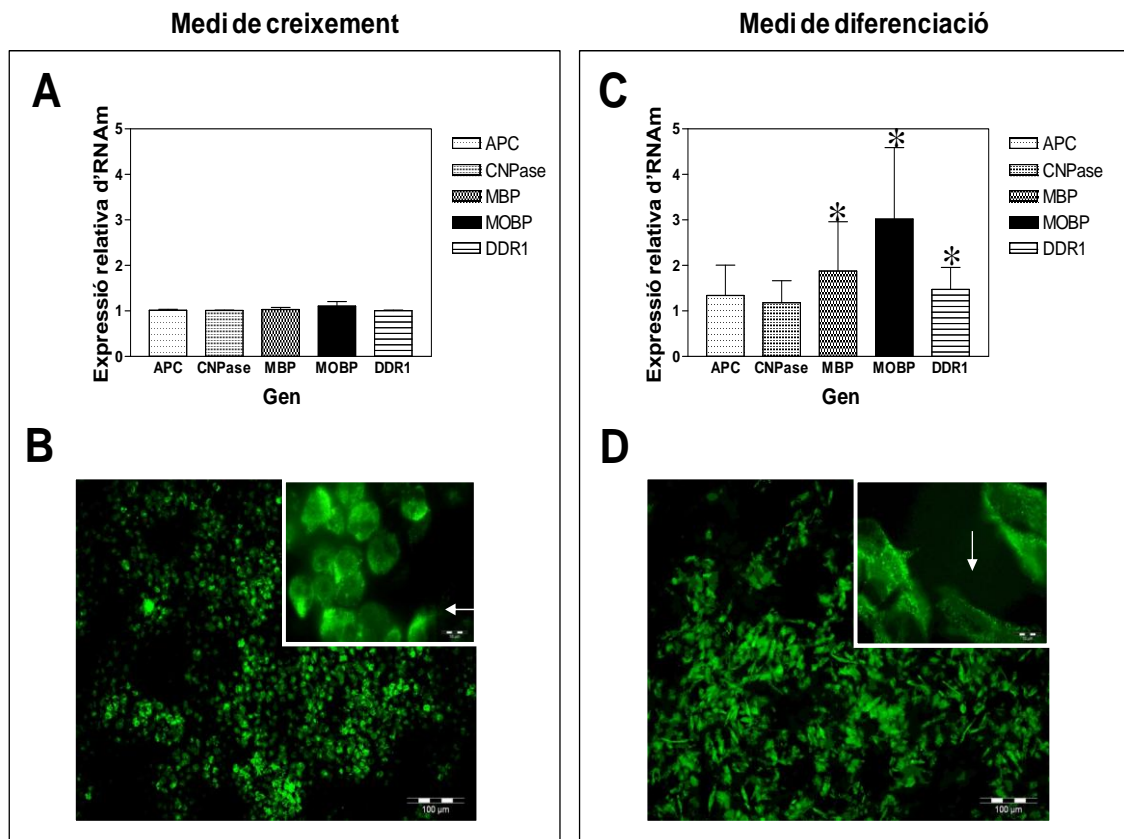
##### 5.3.3. Resultats

Buntinx i col·laboradors l'any 2003 van descriure el protocol de diferenciació per la línia cel·lular humana oligodendroglial HOG16. Segons el seu protocol experimental, les cèl·lules van ser diferenciades d'un estadi premyelinitzant a un fenotip més madur dels oligodendròcits, és a dir, cèl·lules capaces de sintetitzar

proteïnes de mielina. Aquest protocol va ser aprofitat per mesurar l'expressió del RNA missatger de DDR1 junt amb altres proteïnes relacionades amb el procés de mielinització; APC i CNPasa van ser utilitzats com marcadors d'oligodendròcits premyelinitzants, mentre que els gens MBP i MOBP foren utilitzats com a marcadors d'oligodendròcits mielinitzants (Baumann i Pham-Dinh, 2001).

La figura 15, panell A, mostra l'expressió relativa d'RNA missatger en les cèl·lules amb medi de creixement i en medi de diferenciació al cap de 48 hores. El cultiu de les cèl·lules 48 h amb medi de diferenciació va provocar increments significatius en l'expressió de gens codificadors de proteïnes de mielina com MOBP, MBP (Figura 15C; ANOVA,  $p=0.03$  i  $0.05$  respectivament). El gen DDR1 també va mostrar un increment significatiu en el procés de maduració (Figura 15C; ANOVA,  $p=0.04$ ). Per contra els gens APC i CNPasa van mostrar valors molt similars d'expressió sota ambdues condicions (Figura 15A i C).

La reacció d'immunohistoquímica de fluorescència va mostrar canvis morfològics en els oligodendròcits associats a la seva diferenciació. Les cèl·lules van passar d'una morfologia arrodonida (Figura 15B) a una d'estrellada (Figura 15D). En ambdós estadis cel·lulars DDR1 va presentar un patró citoplasmàtic puntejat (Figura 15B i D).



**Figura 15.** Anàlisi de DDR1 en cèl·lules HOG16 diferenciades in vitro. Panel A i C mostren la quantificació d'RNAm per RT-PCR quantitativa de DDR1, marcadors d'oligodendròcits (APC i CNPase) i marcadors de mielina (MBP i MOBP). El valor de significació s'ha establert com  $p < 0,05$ . Panel B i D mostren la immunohistoquímica de fluorescència per DDR1. L'escala emprada és de 100 i 10  $\mu\text{m}$ .



# Discussió

En aquesta tesi es presenta el gen receptor domini discoidina 1 com un nou gen important en el procés de mielinització. Els motius pels quals es va plantejar l'estudi d'aquest gen en relació a la mielinització van ser els següents:

- DDR1 a l'igual que molts receptors tirosina kinasa presenta una regió que s'ha vist que està relacionada amb el desenvolupament del cervell (Vogel, 1999).
- Patró d'expressió diferencial de DDR1 durant el neurodesenvolupament de rata i ratolí (Zerlin et al., 1993; Sánchez et al., 1994).
- DDR1 es troba expressat en oligodendròcits madurs i presenta els seus nivells més alts d'expressió durant l'estadi de mielinització post natal en ratolí (Franco-Pons et al., 2006).

## **Discussió de l'estudi 1**

L'objectiu d'aquest estudi es caracteritzar les capacitats funcionals del CNS dels ratolins tractats amb cuprizona al 0.2% un cop ha finalitzat el tractament (a partir de la sisena setmana de l'estudi) i concretament durant el segon pic de remielinització. Per aquest motiu es va utilitzar un grup de tests de comportament que van revelar disfuncions del CNS dels animals tractats amb cuprizona. La pèrdua de compactació i síntesi de la mielina en el cos callós fou un indicador del procés de desmielinització. Aquest fet es va demostrar mitjançant la microscopia electrònica de transmissió.

Es varen utilitzar un total de sis aproximacions diferents per tal d'avaluar el comportament dels rosegadors (la bateria d'observació funcional, el test de suspensió corporal, el test de les petjades, el test dels dos compartiments, el test de coordinació motora i aprenentatge i l'activitat a camp obert) demostrant canvis en l'activitat motora, en la força de subjecció, en la coordinació muscular, en la marxa i en l'activitat exploratòria. Els animals van mostrar a les tres setmanes de tractament amb cuprizona un deteriorament en la coordinació motora i una menor activitat de neteja en la gàbia.

A les sis setmanes d'iniciar el tractament, els animals mostraven hiporeactivitat al contacte i una disminució del comportament exploratori, es a dir, mostraven una marcada disminució tant de l'activitat horitzontal com vertical. Els animals tractats amb cuprizona van mostrar a les vuit setmanes de l'estudi un deteriorament en la coordinació muscular, mesurada per una disminució en l'habilitat d'utilitzar les extremitats posteriors, una menor longitud del pas i van mostrar una disminució de l'activitat motora. No obstant s'observa una disminució de les caigudes del grup tractat al primer intent d'aprenentatge a la prova del rotarod si els comparem amb els seus controls, aquesta millora espontània en la coordinació motora a les 8 setmanes podria estar relacionada amb el pic de remielinització que experimenten que a nivell conductual és podria haver vist traduït com un guany puntual en la seva coordinació motora. Aquesta millora en la coordinació motora durant el segon pic de remielinització també ha estat descrit per Hibbits N. i col·laboradors (2009). Aquests van examinar la coordinació sensoriomotora bilateral pel test roda complexa; que avalua la correcta transmissió dels senyals elèctrics entre els hemisferis cerebrals.

A les deu setmanes, els ratolins tractats amb cuprizona van mostrar hiporeactivitat al contacte, millor coordinació motora que els seus controls donada pel test de la pantalla invertida, aquesta millora puntual que s'observa podria estar d'alguna



manera relacionada amb el pic de remielinització experimentat en un estadi posterior o més probablement creiem que es podria explicar per una falta de motivació dels animals controls per pujar fins al capdamunt de la pantalla invertida i per tant podria ser més aviat un dèficit en el disseny de la prova (d'aquest subtest en concret) més que un dèficit real en coordinació motora del grup d'animals control.

En canvi, i seguint la pauta de les alteracions ja observades en els animals tractats a les deu setmanes s'observà deteriorament de la força de subjecció de les extremitats anteriors, menys ansietat i més activitat motora.

Els animals sotmesos a cuprizona al 0.2% van mostrar a les 12 setmanes de l'estudi un augment de les conductes d'autocura, hiporeactivitat al contacte, un deteriorament en la coordinació muscular, una menor amplada de pas, menys ansietat i un augment de l'activitat motora. Aquest deteriorament en la coordinació muscular observat en la 12ena setmana ha estat descrit per Hibbits N. i col·laboradors (2009). Els animals que van tenir un període de recuperació de vint setmanes després d'abandonar el tractament en cuprizona mostraven hiporeactivitat a la manipulació i menys ansietat.

Microfotografies realitzades amb el microscopi electrònic de transmissió van mostrar una marcada desmielinització a les 3 i 6 setmanes d'iniciar el tractament amb cuprizona, essent més evident a la tercera setmana. Aquesta marcada desmielinització es caracteritzà per una desestructuració de la beina de mielina i per l'aparició d'axons distròfics (Stidworthy MF et al., 2003). Durant el pic de remielinització, en la setmana 8, els axons presenten una beina de mielina més compactada i més prima que en la setmana prèvia i posterior a aquest pic (Stidworthy MF et al., 2003; Mason JL et al., 2001; Blakemore WF et al., 1973). En els animals de la setmana 20 la recuperació s'ha assolit amb èxit. En tots els grups menys en els controls, segurament degut a l'efecte tòxic de la cuprizona hi trobem mitocondris gegants, fet molt evident en els grups tractats a la 3<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> i 8<sup>a</sup> setmana (Flatmark et al., 1980; Petronilli et al., 1990).

Un estudi recent (Kipp M et al., 2009) evidencia homologies a nivell histopatològic del CNS en el model murí de desmielinització i remielinització induït per cuprizona al 0.2% i en humans afectats per esclerosis múltiple.

Cate SH i col·laboradors (2010) han demostrat *in vitro* i *in vivo* que en el procés de desmielinització les cèl·lules precursors que es troben dintre la zona subventricular de l'encèfal produeixen més astròcits i menys oligodendròcits i que aquest fet pot ser atribuïble a la sobreregulació del gen BMP.

## Discussió de l'estudi 2

En aquest estudi hem posat en evidència severos dèficits en el SNC dels ratolins knock-out per DDR1. Al final de l'estudi quan els animals tenien 5 mesos d'edat, els DDR1<sup>-/-</sup> presentaven l'àrea, la densitat de l'axó i el gruix de la beina de mielina en el cos callós diferent als animals DDR1<sup>+/+</sup>. Els animals deficients per DDR1 mostraven una reducció amb el calibre de l'axó i un major nombre d'axons amb una beina de mielina més prima. Consistent amb els canvis a nivell histològic observats, els animals van mostrar dèficits a nivell conductual. Els efectes més remarcables a nivell comportamental van ser: disfuncions motores com una disminució de la força de subjecció de les extremitats anteriors, anormalitats en el pas, alteracions en la marxa i una longitud del pas més curta. En el test FOB, els ratolins deficients per DDR1 mostraven una menor activitat de neteja, un major nombre d'aixecaments verticals i una davallada en la resposta a un estímul extern. A més a més, en el test dels 2 compartiments, els DDR1<sup>-/-</sup> mostraven un increment de l'ansietat i un increment de la activitat motora.

Tot i que l'arquitectura del cervell era aparentment normal, els ratolins deficients per DDR1 presentaven l'estructura axó-mielina alterada. La mitjana del diàmetre de l'axó en els animals DDR1<sup>-/-</sup> fou menor (una davallada del 33%) que en els DDR1<sup>+/+</sup>. En el transcurs de l'estudi (un total de 12 setmanes) els animals deficients per DDR1 van mostrar una progressiva davallada en el gruix de la beina de mielina mentre que en els animals portadors del gen DDR1 aquesta es mantenia. Aquest fet, indica que els animals DDR1<sup>-/-</sup> son capaços de sintetitzar la mielina però incapaços de mantenir-la de forma adequada. Troballes similars han estat descrites en ratolins deficients per gens de mielina com el CNP1 ((Lappe-Siefke et al., 2003), PLP (Griffiths et al., 1998), and MAG (Fruttiger et al., 1995; Weiss et al., 2001). En vers la habilitat de sintetitzar correctament la beina de mielina, tots animals deficients per proteïnes de mielina desenvolupaven a la llarga degeneració axonal. Al llarg de l'estudi, els DDR1<sup>-/-</sup> van mostrar un diàmetre de l'axó significativament més petit que els animals portadors del gen. Aquest resultat coincideix amb l'observació general del gruix de la beina de mielina i del manteniment de la integritat de l'axó al llarg de l'estudi, essent els animals deficients per proteïnes de mielina més propensos a mostrar neurodegeneració (Franklin & Kotter, 2008). Una observació a llarg termini dels animals deficients per DDR1 podria demostrar deficiències a nivell axonal més pronunciades.

El tractament amb cuprizona en els animals deficients amb DDR1 permet que tingui lloc la remielinització tot i que els seus homòlegs salvatges presenten un increment en el gruix de mielina del 39% enfront del 23% dels deficients amb DDR1. Al treure'ls la cuprizona de la dieta, ambdós grups recuperen els seus nivells basals, essent menor en el grup dels DDR1-/-.

Consistent amb aquestes troballes, més dèficits en quant al comportament han estat observats en l'animal DDR1-/-: increment en la taxa de mobilitat i en l'estat de vigilància i davallada en el nombre d'aixecaments verticals en la caixa. D'altra banda la força muscular i la coordinació no es van veure afectades pel tractament amb cuprizona, el qual indica que aquestes disfuncions poden estar causades per una neuropatia dels sistema nerviós perifèric (inherent en l'animal deficient per DDR1) i que la cuprizona afecta exclusivament a la mielinització del CNS (Komoly, 2005). Els DDR1 -/- tractats amb cuprizona també van mostrar en el període de remielinització un increment en la latència d'entrada al compartiment clar i van estar més temps en el compartiment fosc, la qual cosa indicava un increment de l'ansietat. S'ha de dur a terme una correcta interpretació d'aquests resultats ja que els animals DDR1-/- presenten dèficits motors a nivell basal, la qual cosa fa difícil observar dèficits causats pel tractament amb cuprizona.

L'ansietat es un tret complex controlat i modulats per diferents sistemes de neurotransmissors i per múltiples regions cerebrals (Clement & Chapouthier, 1998). Els animals DDR1 -/- van comportar un comportament ansiós caracteritzat per un increment de la latència d'entrada al compartiment clar. Aquests animals també van fer un major nombre de transicions el qual podria suposar un comportament hiperactiu. Els efectes de la cuprizona accentuen el comportament ansiós dels animals deficients per DDR1. Els DDR1 -/- van mostrar una major latència d'entrada al compartiment clar i un major temps de permanència al compartiment fosc. Obstant, el deteriorament motor i els canvis en l'activitat per l'administració de cuprizona podrien confondre'ns quan s'avalua l'ansietat ja que els animals DDR1+/+ tractats amb cuprizona van mostrar nivells més alts d'ansietat i hiperactivitat que els seus controls. Aquests resultats aparentment contradictoris van estat observats per Xu et al. (2009), els quals van observar una inhibició del comportament en el test "plus maze" però un comportament ansiós en les interaccions socials. Això probablement es degui a diferents sistemes neuronals que es veuen afectats per

l'exposició a cuprizona, fet que hauria de ser estudiat amb més detall en futurs treballs.

Els ratolins deficientes per DDR1 presenten una reducció del seu pes corporal avanç de la pubertat, en les femelles hi ha un deteriorament en la implantació del blastòcit i una incapacitat en lactar (Vogel et al., 2001). La pèrdua d'oïda es l'únic defecte estudiat en el sistema nerviós sensorial d'aquests animals (Meyer zum Gottesberge et al., 2008). Els autors d'aquest article mostren que els animals DDR1  $-/-$  presenten un empitjorament amb l'edat de la funció auditiva i de la arquitectura de l'orella interna (a partir del mes d'edat)..

La nostra observació en l'empitjorament de la resposta al contacte en el transcurs de l'estudi suggereix que els animals DDR1  $-/-$  poden també patir un deteriorament del sistema tàctil-sensorial. Meyer zum Gottesberge i col·laboradors (2008) van mostrar que la mielina en el gangli espiral estava alterada. Conseqüentment, com un receptor tirosina quinasa ancorat a membrana, DDR1 pot contribuir a la unió de les cèl·lules amb la membrana basilar de l'oïda interna o bé amb la beina de mielina.

En el Sistema Nerviós Central, el receptor DDR1 ancorat a la membrana dels oligodendròcits pot contribuir a la mielinització i remielinització interactuant amb la membrana de l'axó o amb la matriu extracel·lular. El col·lagen com a únic lligam conegut per DDR1 fins ara, corrobora la idea que DDR1 juga un important rol per promoure la extensió de la membrana. En concordança amb aquesta hipòtesi, els ratolins doble deficientes amb la proteïna  $\beta 1$  integrina tenen alteracions en la beina de mielina similars a les que hem observat en el nostre model (Lee et al., 2006). Les integrines són receptors de superfície que reconeixen molts components de la matriu extracel·lular. A més a més, els autors d'aquest article sostenen que el fenotip observat podria ser atribuïble al fet que altres receptors integrina es troben expressats en oligodendròcits. Els nostres resultats suggereixen que DDR1 tot i no ser un receptor integrina i la seva activació és independent del receptor  $\beta 1$  integrina (Vogel et al., 2000), pot explicar, al menys en part, el fenotip descrit en el model doble deficient per  $\beta 1$  integrina. Conseqüentment, seria interessant l'estudi del model doble transgènic  $\beta 1$  integrina  $-/-$  i DDR1  $-/-$ .

En sumari, l'animal deficient per DDR1 mostra dèficits ultraestructurals, motors i de comportament, juntament amb una disminució del potencial remielinitzador. Els resultats aquí mostrats, junt amb els resultats previs (Franco-Pons et al., 2007) donen suport a la hipòtesi que DDR1 és clau en el procés de mielinització. Cal

doncs, realitzar més estudis per millorar el nostre coneixement sobre el rol de DDR1 en les interaccions axó-mielina.

### Discussió de l'estudi 3

El nostre grup prèviament ha demostrat que el gen DDR1 està associat amb l'esquizofrènia (Roig et al., 2007) i que aquest es troba expressat durant el desenvolupament postnatal en ratolí assolint el valor màxim quan la mielinització té lloc (Franco-Pons, 2006). L'objectiu d'aquest estudi és explorar el rol de DDR1 en el procés de mielinització. Els nostres resultats posen de manifest una sobre regulació d'aquest receptor quan els oligodendròcits immadurs són estimulats a diferenciar-se. Treballar en cultius primaris d'oligodendròcits és força complicat donada la limitada viabilitat d'aquests, al fet que és difícil que oligodendròcits en un estadi madur proliferin in vitro i per la dificultat que comporta obtenir cultius purs, on no hi hagin altres tipus cel·lulars com els astròcits i la microglia.

Mitjançant l'ús de línees cel·lulars oligodendroglials, l'investigador pot induir la diferenciació d'aquests cap a un fenotip més madur. D'aquest estudi hem pogut determinar: 1) hi ha hagut canvis en l'expressió del gen DDR1; 2) hem mostrat canvis en l'expressió de gens de mielina; 3) s'ha demostrat que la diferenciació els hi provoca canvis morfològics.

S'ha demostrat que el gen DDR1 té un patró d'expressió similar al grup de les proteïnes estructurals de mielina, com la MBP i MOBP. Aquestes troballes indiquen que DDR1 és probablement un constituent de la mielina o bé una proteïna important en l'estadi de mielinització dels oligodendròcits. Tot i que no és possible detectar diferències quantitatives en el marcatge de DDR1 per immunohistoquímica de fluorescència, està clar que aquest receptor presenta un patró citoplasmàtic puntejat. Buntinx i col·laboradors l'any 2003 van descriure un patró similar per MBP en oligodendròcits.

Les nostres dades mostren una sobre expressió del gen DDR1 en oligodendròcits mielinitzants. Com a conseqüència, és meritori especular que una regulació a la baixa d'aquest gen podria estar associat a malalties de mielina. Lligat amb aquest fet, el nostre grup ha observat una associació del gen DDR1 amb l'esquizofrènia (Roig et al., 2007), on alteracions de mielina han estat descrites (McInnes i Lauriat, 2006; Walterfang, 2006).



# Conclusions



## Generals

L'estudi del model murí tractat amb cuprizona ha evidenciat disfuncions en el SNC tals com:

1. Pèrdua de la compactació i síntesi de la mielina en el procés de desmielinització.
2. Increment de la compactació i síntesi de la mielina durant el pic de remielinització.
3. Alteracions estructurals dels mitocondris pel tractament de la cuprizona.
4. Alteracions en el comportament.
  - a. Període d'exposició a la cuprizona: menor activitat del SNC, deteriorament de les funcions motores i menys ansietat.
  - b. Període de recuperació: major activitat del SNC, deteriorament de les funcions motores, menys ansietat i una menor activitat exploratòria.

En l'estudi del model de des/remielinització per cuprizona els animals deficientes amb DDR1 han mostrat:

1. Alteracions en l'àrea, la densitat de l'axó i el gruix de la beina de mielina.
2. Disminució del potencial remielinitzador.
3. Alteracions en el comportament: disfuncions motores, hiporeactivitat del SNC, increment de l'ansietat i de l'activitat exploratòria. Els efectes de la cuprizona accentuen el comportament ansiós d'aquests animals.

La diferenciació del llinatge cel·lular oligodendroglial HOG16 ha posat de manifest una sobre regulació del receptor DDR1 quan els oligodendròcits immadurs són estimulats a diferenciar-se. S'han observat canvis en l'expressió del gen DDR1, canvis en l'expressió de gens de mielina i s'ha demostrat que la diferenciació els hi provoca canvis morfològics. El patró d'expressió de DDR1 és similar al grup de les proteïnes estructurals de mielina, com la MBP i MOBP. Aquest fet indica que DDR1 és probablement un constituent de la mielina o bé una proteïna important en l'estadi de mielinització dels oligodendròcits.

En sumari, junt amb aquests resultats i els que hem obtingut prèviament, podem afirmar que DDR1 és clau en el procés de mielinització. Una regulació a la baixa d'aquest gen podria estar associat a malalties de mielina.



# Bibliografia

- Abdulhusein R, McFadden C, Fuentes-Prior P, Vogel WF (2004) Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor. *J Biol Chem* 279:31462-31470.
- Acs P, Kipp M, Norkute A, Johann S, Clarner T, Braun A, Berente Z, Komoly S, Beyer C (2009) 17beta-Estradiol and Progesterone Prevent Cuprizone Provoked Demyelination of Corpus Callosum in Male Mice. *Glia* 57:807-814.
- Alves F, Saupe S, Ledwon M, Schaub F, Hiddemann W, Vogel WF (2001) Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines. *FASEB J* 15:1321-1323.
- Alves F, Vogel W, Mossie K, Millauer B, Hofler H, Ullrich A (1995) Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* 10:609-618.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122.
- Avivi-Green C, Singal M, Vogel WF (2006) Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174:420-427.
- Barbarese E, Brumwell C, Kwon S, Cui H, Carson JH (1999) RNA on the road to myelin. *J Neurocytol* 28:263-270.
- Barker KT, Martindale JE, Mitchell PJ, Kamalati T, Page MJ, Phippard DJ, Dale TC, Gusterson BA, Crompton MR (1995) Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene* 10:569-575.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871-927.
- Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of

clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 349:139-145.

Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-2042.

Bhatt RS, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME (2000) Discoidin domain receptor 1 functions in axon extension of cerebellar granule neurons. *Genes Dev* 14:2216-2228.

Birling MC, Roussel G, Nussbaum F, Nussbaum JL (1993) Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Neurochem Res* 18:937-945.

Blakemore WF (1973) Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci* 20:73-83.

Boccaccio GL (2000) Targeting of mRNAs within the glial cell cytoplasm: how to hide the message along the journey. *J Neurosci Res* 62:473-479.

Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6368-6372.

Borg JP, Marchetto S, Le Bivic A, Ollendorff V, Jaulin-Bastard F, Saito H, Fournier E, Adelaide J, Margolis B, Birnbaum D (2000) ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2:407-414.

Bronstein JM, Chen K, Tiwari-Woodruff S, Kornblum HI (2000) Developmental expression of OSP/claudin-11. *J Neurosci Res* 60:284-290.

Bronstein JM, Tiwari-Woodruff S, Buznikov AG, Stevens DB (2000) Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *J Neurosci Res* 59:706-711.

- Brunner C, Lassmann H, Waehnel TV, Matthieu JM, Lington C (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52:296-304.
- Bunge RP (1968) Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 48:197-251.
- Bunge RP, Bunge MB, Bates M (1989) Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J Cell Biol* 109:273-284.
- Buntinx M, Vanderlocht J, Hellings N, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raus J, Ameloot M, Stinissen P, Steels P (2003) Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J Neurocytol* 32:25-38.
- Cafferty WB, Strittmatter SM (2006) The Nogo-Nogo receptor pathway limits a spectrum of adult CNS axonal growth. *J Neurosci* 26:12242-12250.
- Carenini S, Montag D, Cremer H, Schachner M, Martini R (1997) Absence of the myelin-associated glycoprotein (MAG) and the neural cell adhesion molecule (N-CAM) interferes with the maintenance, but not with the formation of peripheral myelin. *Cell Tissue Res* 287:3-9.
- Carre JL, Goetz BD, O'Connor LT, Bremer Q, Duncan ID (2002) Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neurosci Lett* 330:17-20.
- Cate HS, Sabo JK, Merlo D, Kemper D, Aumann TD, Robinson J, Merson TD, Emery B, Perreau VM, Kilpatrick TJ (2010) Modulation of bone morphogenic protein signalling alters numbers of astrocytes and oligodendroglia in the subventricular zone during cuprizone-induced demyelination. *J Neurochem*
- Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM, Zhang C, Chen L, Reichardt LF, Shooter EM, Barres BA (2004) NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 43:183-191.

- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:165-173.
- Charles P, Reynolds R, Seilhean D, Rougon G, Aigrot MS, Niezgoda A, Zalc B, Lubetzki C (2002) Re-expression of PSA-NCAM by demyelinated axons: an inhibitor of remyelination in multiple sclerosis? *Brain* 125:1972-1979.
- Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL (2000) A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp Neurol* 166:227-234.
- Clement Y, Chapouthier G (1998) Biological bases of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 22:623-633.
- Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13:167-170.
- Curat CA, Eck M, Dervillez X, Vogel WF (2001) Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding. *J Biol Chem* 276:45952-45958.
- Curat CA, Vogel WF (2002) Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 13:2648-2656.
- De Angelis DA, Braun PE (1996) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase binds to actin-based cytoskeletal elements in an isoprenylation-independent manner. *J Neurochem* 67:943-951.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77:634-643.
- DeFries JC, Hegmann JP, Halcomb RA (1974) Response to 20 generations of selection for open-field activity in mice. *Behav Biol* 11:481-495.

Di Marco E, Cutuli N, Guerra L, Cancedda R, De Luca M (1993) Molecular cloning of trkE, a novel trk-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues. *J Biol Chem* 268:24290-24295.

Diehl HJ, Schaich M, Budzinski RM, Stoffel W (1986) Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9807-9811.

Ferri N, Carragher NO, Raines EW (2004) Role of discoidin domain receptors 1 and 2 in human smooth muscle cell-mediated collagen remodeling: potential implications in atherosclerosis and lymphangiomyomatosis. *Am J Pathol* 164:1575-1585.

Filbin MT (1996) The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci* 8:84-92.

Flatmark T, Kryvi H, Tangeras A (1980) Induction of megamitochondria by cuprizone (biscyclohexanone oxaldihydrazone). Evidence for an inhibition of the mitochondrial division process. *Eur J Cell Biol* 23:141-148.

Foehr ED, Tatavos A, Tanabe E, Raffioni S, Goetz S, Di Marco E, De Luca M, Bradshaw RA (2000) Discoidin domain receptor 1 (DDR1) signaling in PC12 cells: activation of juxtamembrane domains in PDGFR/DDR/TrkA chimeric receptors. *FASEB J* 14:973-981.

Franco-Pons N, Tomas J, Roig B, Auladell C, Martorell L, Vilella E (2009) Discoidin domain receptor 1, a tyrosine kinase receptor, is upregulated in an experimental model of remyelination and during oligodendrocyte differentiation in vitro. *J Mol Neurosci* 38:2-11.

Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, Vilella E (2007) Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol Lett* 169:205-213.

- Franco-Pons N, Virgos C, Vogel WF, Urena JM, Soriano E, del Rio JA, Vilella E (2006) Expression of discoidin domain receptor 1 during mouse brain development follows the progress of myelination. *Neuroscience* 140:463-475.
- Franklin RJ, Kotter MR (2008) The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. *J Neurol* 255 Suppl 1:19-25.
- Fruttiger M, Montag D, Schachner M, Martini R (1995) Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur J Neurosci* 7:511-515.
- Fujita N, Kemper A, Dupree J, Nakayasu H, Bartsch U, Schachner M, Maeda N, Suzuki K, Popko B (1998) The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. *J Neurosci* 18:1970-1978.
- Ghandour MS, Skoff RP (1991) Double-labeling in situ hybridization analysis of mRNAs for carbonic anhydrase II and myelin basic protein: expression in developing cultured glial cells. *Glia* 4:1-10.
- Golub MS, Germann SL, Lloyd KC (2004) Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res* 153:159-170.
- Gould RM, Freund CM, Barbarese E (1999) Myelin-associated oligodendrocytic basic protein mRNAs reside at different subcellular locations. *J Neurochem* 73:1913-1924.
- Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B, Braun PE (1996) Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci* 7:453-466.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-1613.



- Groebe A, Clarner T, Baumgartner W, Dang J, Beyer C, Kipp M (2009) Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrocytosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum* 8:163-174.
- Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry J, Scolyer RA, Davies MJ, Heinzelmann M, Kalish LH, Bali A, Kench JG, Edwards LS, Vanden Bergh PM, Hacker NF, Sutherland RL, O'Brien PM (2004) Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 10:4427-4436.
- Hibbits N, Pannu R, John Wu T, Armstrong RC (2009) Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN Neuro* 1:10.1042/AN20090032.
- Hinks GL, Franklin RJ (1999) Distinctive patterns of PDGF-A, FGF-2, IGF-I, and TGF-beta1 gene expression during remyelination of experimentally-induced spinal cord demyelination. *Mol Cell Neurosci* 14:153-168.
- Hoffmann K, Lindner M, Groticke I, Stangel M, Loscher W (2008) Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Exp Neurol* 210:308-321.
- Holz A, Frank M, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Schwab ME (1997) Chromosomal localization of the myelin-associated oligodendrocytic basic protein and expression in the genetically linked neurological mouse mutants ducky and tippy. *J Neurochem* 69:1801-1809.
- Hou G, Vogel W, Bendeck MP (2001) The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest* 107:727-735.
- Hou G, Vogel WF, Bendeck MP (2002) Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res* 90:1147-1149.

- Huang JK, Phillips GR, Roth AD, Pedraza L, Shan W, Belkaid W, Mi S, Fex-Svenningsen A, Florens L, Yates JR,3rd,Colman DR (2005) Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 310:1813-1817.
- Iglesias A, Bauer J, Litznerburger T, Schubart A,Linnington C (2001) T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36:220-234.
- Johansson FK, Goransson H,Westermarck B (2005) Expression analysis of genes involved in brain tumor progression driven by retroviral insertional mutagenesis in mice. *Oncogene* 24:3896-3905.
- Johnson JD, Edman JC,Rutter WJ (1993) A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5677-5681.
- Kamholz J, Toffenetti J,Lazzarini RA (1988) Organization and expression of the human myelin basic protein gene. *J Neurosci Res* 21:62-70.
- Kamohara H, Yamashiro S, Galligan C,Yoshimura T (2001) Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1alpha) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices. *FASEB J* 15:2724-2726.
- Kiernan BW, Garcion E, Ferguson J, Frost EE, Torres EM, Dunnett SB, Saga Y, Aizawa S, Faissner A, Kaur R, Franklin RJ, French-Constant C (1999) Myelination and behaviour of tenascin-C null transgenic mice. *Eur J Neurosci* 11:3082-3092.
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S,Beyer C (2009) The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol* 118:723-736.
- Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR,Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.

- Komoly S (2005) Experimental demyelination caused by primary oligodendrocyte dystrophy. Regional distribution of the lesions in the nervous system of mice [corrected. *Ideggyogy Sz* 58:40-43.
- Koo DH, McFadden C, Huang Y, Abdulhusein R, Friese-Hamim M, Vogel WF (2006) Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett* 580:15-22.
- Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, Moharregg-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, Stangel M (2009) Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett* 451:83-88.
- Kramer EM, Schardt A, Nave KA (2001) Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 52:656-671.
- Kumar S, Biancotti JC, Yamaguchi M, de Vellis J (2007) Combination of growth factors enhances remyelination in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *Neurochem Res* 32:783-797.
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA (2003) Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33:366-374.
- Laval S, Butler R, Shelling AN, Hanby AM, Poulsom R, Ganesan TS (1994) Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Differ* 5:1173-1183.
- Lee J, Gravel M, Zhang R, Thibault P, Braun PE (2005) Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol* 170:661-673.
- Lee KK, de Repentigny Y, Saulnier R, Rippstein P, Macklin WB, Kothary R (2006) Dominant-negative beta1 integrin mice have region-specific myelin defects accompanied by alterations in MAPK activity. *Glia* 53:836-844.

- Leitinger B (2003) Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. *J Biol Chem* 278:16761-16769.
- Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, Peterson A, Roder J (1994) Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* 369:747-750.
- Liebetanz D, Merkler D (2006) Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 202:217-224.
- Lin D, Gish GD, Songyang Z, Pawson T (1999) The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J Biol Chem* 274:3726-3733.
- Macklin WB, Weill CL, Deininger PL (1986) Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells. *J Neurosci Res* 16:203-217.
- Mason JL, Jones JJ, Taniike M, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK (2000) Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *J Neurosci Res* 61:251-262.
- Mason JL, Langaman C, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK (2001) Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:50-58.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK (2001) Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21:7046-7052.
- Mason JL, Ye P, Suzuki K, D'Ercole AJ, Matsushima GK (2000) Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* 20:5703-5708.
- Matsushima GK, Morell P (2001) The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11:107-116.

Matsuyama W, Kamohara H, Galligan C, Faure M, Yoshimura T (2003) Interaction of discoidin domain receptor 1 isoform b (DDR1b) with collagen activates p38 mitogen-activated protein kinase and promotes differentiation of macrophages. *FASEB J* 17:1286-1288.

Matsuyama W, Mitsuyama H, Watanabe M, Shirahama Y, Higashimoto I, Osame M, Arimura K (2005) Involvement of discoidin domain receptor 1 in the deterioration of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:565-573.

Matsuyama W, Wang L, Farrar WL, Faure M, Yoshimura T (2004) Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in human macrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B. *J Immunol* 172:2332-2340.

Matsuyama W, Watanabe M, Shirahama Y, Oonakahara K, Higashimoto I, Yoshimura T, Osame M, Arimura K (2005) Activation of discoidin domain receptor 1 on CD14-positive bronchoalveolar lavage fluid cells induces chemokine production in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 174:6490-6498.

McInnes LA, Lauriat TL (2006) RNA metabolism and dysmyelination in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 30:551-561.

McMahon EJ, Cook DN, Suzuki K, Matsushima GK (2001) Absence of macrophage-inflammatory protein-1alpha delays central nervous system demyelination in the presence of an intact blood-brain barrier. *J Immunol* 167:2964-2971.

Metz GA, Schwab ME (2004) Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice. *Neuroscience* 129:563-574.

Meyer zum Gottesberge AM, Gross O, Becker-Lendzian U, Massing T, Vogel WF (2008) Inner ear defects and hearing loss in mice lacking the collagen receptor DDR1. *Lab Invest* 88:27-37.

Meyer-Franke A, Barres B (1994) Axon myelination. Myelination without myelin-associated glycoprotein. *Curr Biol* 4:847-850.

- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE (2001) Discoidin domain receptor (DDR) 1 and 2: collagen-activated tyrosine kinase receptors in the cornea. *Exp Eye Res* 72:87-92.
- Moller JR (1996) Rapid conversion of myelin-associated glycoprotein to a soluble derivative in primates. *Brain Res* 741:27-31.
- Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Bluthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA (1994) Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13:229-246.
- Montague P, Dickinson PJ, McCallion AS, Stewart GJ, Savioz A, Davies RW, Kennedy PG, Griffiths IR (1997) Developmental expression of the murine Mobp gene. *J Neurosci Res* 49:133-143.
- Morello D, Dautigny A, Pham-Dinh D, Jolles P (1986) Myelin proteolipid protein (PLP and DM-20) transcripts are deleted in jimpy mutant mice. *EMBO J* 5:3489-3493.
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145:579-588.
- Moser VC (2000) The functional observational battery in adult and developing rats. *Neurotoxicology* 21:989-996.
- Nemoto T, Ohashi K, Akashi T, Johnson JD, Hirokawa K (1997) Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* 65:195-203.
- O'Neill MJ, Sinclair AH (1997) Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Res* 25:2681-2682.

- Osterhout DJ, Wolven A, Wolf RM, Resh MD, Chao MV (1999) Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 145:1209-1218.
- Owen F, Simpson M (1994) The neurochemistry of schizophrenia. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* 4:133-159.
- Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL (2005) Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol* 195:208-217.
- Perez JL, Jing SQ, Wong TW (1996) Identification of two isoforms of the Cak receptor kinase that are coexpressed in breast tumor cell lines. *Oncogene* 12:1469-1477.
- Perez JL, Shen X, Finkernagel S, Sciorra L, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Wong TW (1994) Identification and chromosomal mapping of a receptor tyrosine kinase with a putative phospholipid binding sequence in its ectodomain. *Oncogene* 9:211-219.
- Petronilli V, Zoratti M (1990) A characterization of cuprizone-induced giant mouse liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 22:663-677.
- Pettegrew JW, Keshavan MS, Panchalingam K, Strychor S, Kaplan DB, Tretta MG, Allen M (1991) Alterations in brain high-energy phosphate and membrane phospholipid metabolism in first-episode, drug-naive schizophrenics. A pilot study of the dorsal prefrontal cortex by in vivo phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 48:563-568.
- Pham-Dinh D, Della Gaspera B, Kerlero de Rosbo N, Dautigny A (1995) Structure of the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene and multiple alternative spliced isoforms. *Genomics* 29:345-352.
- Pribyl TM, Campagnoni CW, Kampf K, Kashima T, Handley VW, McMahon J, Campagnoni AT (1993) The human myelin basic protein gene is included

within a 179-kilobase transcription unit: expression in the immune and central nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10695-10699.

Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N (1979) Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse "shiverer". *Neurosci Lett* 12:107-112.

Qiu J, Cai D, Filbin MT (2000) Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia* 29:166-174.

Ram R, Lorente G, Nikolich K, Urfer R, Foehr E, Nagavarapu U (2006) Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *J Neurooncol* 76:239-248.

Readhead C, Hood L (1990) The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shimld). *Behav Genet* 20:213-234.

Roach A, Takahashi N, Pravtcheva D, Ruddle F, Hood L (1985) Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell* 42:149-155.

Roig B, Virgos C, Franco N, Martorell L, Valero J, Costas J, Carracedo A, Labad A, Vilella E (2007) The discoidin domain receptor 1 as a novel susceptibility gene for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12:833-841.

Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S (1992) Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821-1831.

Sakamoto O, Suga M, Suda T, Ando M (2001) Expression of discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase on the human bronchial epithelium. *Eur Respir J* 17:969-974.

Sanchez MP, Tapley P, Saini SS, He B, Pulido D, Barbacid M (1994) Multiple tyrosine protein kinases in rat hippocampal neurons: isolation of Ptk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1819-1823.



- Saxe DF, Takahashi N, Hood L, Simon MI (1985) Localization of the human myelin basic protein gene (MBP) to region 18q22----qter by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 39:246-249.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15:8281-8294.
- Schlessinger J (1997) Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. *Cell* 91:869-872.
- Sheikh KA, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford TO, Proia RL, Griffin JW, Schnaar RL (1999) Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7532-7537.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
- Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1:25-34.
- Sills RC, Valentine WM, Moser V, Graham DG, Morgan DL (2000) Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol Pathol* 28:142-148.
- Skripuletz T, Bussmann JH, Gudi V, Koutsoudaki PN, Pul R, Moharreggh-Khiabani D, Lindner M, Stangel M (2009) Cerebellar Cortical Demyelination in the Murine Cuprizone Model. *Brain Pathol*
- Smythies JR (1983) The transmethylation and one-carbon cycle hypotheses of schizophrenia. *Psychol Med* 13:711-714.
- Snell RS, (2003) In: *Neuroanatomía clínica*, 5ª Edición edition Editorial Médica Panamericana.

- Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM, Zalc B (1996) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 18:39-48.
- Song SK, Yoshino J, Le TQ, Lin SJ, Sun SW, Cross AH, Armstrong RC (2005) Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 26:132-140.
- Sparkes RS, Mohandas T, Heinzmann C, Roth HJ, Klisak I, Campagnoni AT (1987) Assignment of the myelin basic protein gene to human chromosome 18q22-qter. *Hum Genet* 75:147-150.
- Stidworthy MF, Genoud S, Suter U, Mantei N, Franklin RJ (2003) Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Brain Pathol* 13:329-339.
- Stoffel W, Hillen H, Giersiefen H (1984) Structure and molecular arrangement of proteolipid protein of central nervous system myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:5012-5016.
- Sun Y, Witte DP, Ran H, Zamzow M, Barnes S, Cheng H, Han X, Williams MT, Skelton MR, Vorhees CV, Grabowski GA (2008) Neurological deficits and glycosphingolipid accumulation in saposin B deficient mice. *Hum Mol Genet* 17:2345-2356.
- Tanaka M, Wang DY, Kamo T, Igarashi H, Wang Y, Xiang YY, Tanioka F, Naito Y, Sugimura H (1998) Interaction of EphB2-tyrosine kinase receptor and its ligand conveys dorsalization signal in *Xenopus laevis* development. *Oncogene* 17:1509-1516.
- Tansey FA, Zhang H, Cammer W (1996) Expression of carbonic anhydrase II mRNA and protein in oligodendrocytes during toxic demyelination in the young adult mouse. *Neurochem Res* 21:411-416.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005)

Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-694.

Torkildsen O, Brunborg LA, Milde AM, Mork SJ, Myhr KM, Bo L (2009) A salmon based diet protects mice from behavioural changes in the cuprizone model for demyelination. *Clin Nutr* 28:83-87.

Torrente M, Colomina MT, Domingo JL (2005) Behavioral effects of adult rats concurrently exposed to high doses of oral manganese and restraint stress. *Toxicology* 211:59-69.

Torrey EF, Peterson MR (1976) The viral hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 2:136-146.

Trapp BD, Andrews SB, Cootauco C, Quarles R (1989) The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *J Cell Biol* 109:2417-2426.

Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M (1992) Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro. *J Neurochem* 59:55-61.

Uschkureit T, Sporkel O, Stracke J, Bussow H, Stoffel W (2000) Early onset of axonal degeneration in double (plp-/-mag-/-) and hypomyelination in triple (plp-/-mbp-/-mag-/-) mutant mice. *J Neurosci* 20:5225-5233.

Vogel US, Thompson RJ (1988) Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J Neurochem* 50:1667-1677.

Vogel W (1999) Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 13 Suppl:S77-82.

Vogel W, Brakebusch C, Fassler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T (2000) Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* 275:5779-5784.

- Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997) The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1:13-23.
- Vogel WF (2002) Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett* 514:175-180.
- Vogel WF, Aszodi A, Alves F, Pawson T (2001) Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Mol Cell Biol* 21:2906-2917.
- Walterfang M, Wood SJ, Velakoulis D, Pantelis C (2006) Neuropathological, neurogenetic and neuroimaging evidence for white matter pathology in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 30:918-948.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.
- Weinberger DR (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44:660-669.
- Weiner HL, Huang H, Zagzag D, Boyce H, Lichtenbaum R, Ziff EB (2000) Consistent and selective expression of the discoidin domain receptor-1 tyrosine kinase in human brain tumors. *Neurosurgery* 47:1400-1409.
- Weiss MD, Luciano CA, Quarles RH (2001) Nerve conduction abnormalities in aging mice deficient for myelin-associated glycoprotein. *Muscle Nerve* 24:1380-1387.
- Willard HF, Riordan JR (1985) Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* 230:940-942.
- Xiao L, Xu H, Zhang Y, Wei Z, He J, Jiang W, Li X, Dyck LE, Devon RM, Deng Y, Li XM (2008) Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes. *Mol Psychiatry* 13:697-708.

- Xu H, Yang HJ, Zhang Y, Clough R, Browning R, Li XM (2009) Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. *Behav Neurosci* 123:418-429.
- Yang HJ, Wang H, Zhang Y, Xiao L, Clough RW, Browning R, Li XM, Xu H (2009) Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: Implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res* 1270:121-130.
- Yoshimura T, Matsuyama W, Kamohara H (2005) Discoidin domain receptor 1: a new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction. *Immunol Res* 31:219-230.
- Zerlin M, Julius MA, Goldfarb M (1993) NEP: a novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferating neuroepithelia. *Oncogene* 8:2731-2739.