

Receptors a la lectina de Dolichus biflorus a la làmina basal de la sinapsi mioneural. Estudi histoquímic durant el desenvolupament i polimorfisme filogenètic.

Joan Ribera, Josep E. Esquerda, Joan Comella i Antònia Poca.

Departament d'Histologia i Biologia Cel·lular. Facultat de Medicina. Estudi General de Lleida.

Abstract

Receptors to Dolichus biflorus lectin in the synaptic basal lamina of the neuromuscular junction. The binding of Dolichus biflorus agglutinin (DBA) to synaptic portion of muscle basal lamina, was studied with histochemical methods. In the rat muscle, lectin binding is specifically detected in neuromuscular junctions. Long term denervated endplates, failed to bind DBA, and DBA reactivity appear in ectopic endplates formes in surgically reinnervated soleus muscle. DBA receptor appear late than AChR and AChE, during development of neuromuscular junctions; it is first visualized in 3-day old newborn rats. We have detected polymorphic differences in DBA-binding among different species; synaptic binding occurs well in mammals and reptilians but not in birds and fishes. The fact that DBA-receptors appear late during development and their phylogenetic polymorphism, suggest-us that their functional significance is not related to synaptic transmission and it could be implicated in post-natal stabilization of neuromuscular synapses.

Introducció

Tot un seguit d'experimentació recent demostra que la porció sinàptica de la làmina basal que recobreix la cèl·lula muscular, és un àrea especialitzada que intervé de forma molt important en el desenvolupament i funció d'aquesta sinapsi. Per exemple, (1) durant la neoformació d'unions neuromusculars en el múscul en regeneració, els nervis contacten amb el múscul i es diferencien selectivament damunt la làmina basal sinàptica (LBS), inclús en absència de cèl·lules musculars (SANES i cols, 1978); (2) els receptors a l'acetilcolina (AChR) dels miotubs, s'agreguen als llocs sinàptics originals de la LBS, inclús en absència de nervi (BADER, 1981); (3) l'acetilcolinesterasa, (AChE), està lligada a la matriu extracel·lular de la LBS (McMAHAN, 1978).



Aquestes propietats funcionals de la LBS, justifiquen la seva anàlisi mol.lecular per establir característiques distintives entre aquesta i les porcions extrasinàptiques de la làmina basal (LBEx). La recerca en aquest sentit és difícil, donades les dificultats d'aïllament de fraccions prou enriquides en aquest material que, en el millor dels casos, ocupa solament un 0.1% de la superfície total de la làmina basal.

Fins avui dia, la metodologia bioquímica no ha estat adequada per resoldre les diferències entre la LBS i la LBEx. En canvi, les tècniques immunocitoquímiques han permès descobrir antigens específics de LBS, encara que el substrate mol.lecular definit d'aquests marcadors, roman per conèixer.

SANES i HALL (1979), troben determinants antigènics específics de LBS; SANES i CHENEY (1982), descriuen determinants de LBEx que estan exclosos a la LBS; més recentment, CHIU i SANES (1984) poden identificar les porcions sinàptiques i extrasinàptiques de la làmina basal muscular utilitzant anticossos monoclonals.

A l'any 1982, SANES i CHENEY, descriuen per primera vegada, l'existència d'una lectina -la lectina de Dolichus biflorus (DBA)-, que reconeix d'una manera específica la làmina basal del múscul a nivell de la sinapsi mioneural, en la rata.

Nosaltres, ens hem interessat per aquest fet ja que la utilització d'una lectina que marque específicament la LBS, pot oferir una eina de gran potencialitat experimental per coneixer millor les propietats estructurals i funcionals de la LBS. L'objectiu del nostre treball, ha estat caracteritzar amb tècniques citoquímiques la reactivitat de la DBA amb les estructures de la sinapsi mioneural i el seu comportament en situacions de denervació, reinnervació i desenvolupament embrionari. Inicialment, creiem que l'existència de receptors a la DBA, era una propietat universal de la sinapsi mioneural i l'estudi del seu desenvolupament embrionari es va plantejar sota el model del embrió de pollet. La nostra sorpresa i disgust va ésser el comprovar que ni els embrions ni els pollastres adults, presentaven reactivitat a la DBA, a nivell de la sinapsi mioneural, mentre que la DBA es fixava sobre estructures vasculares intramusculars. Aquesta observació, -a més d'obligar-nos a realitzar l'estudi del desenvolupament en la rata-,



ens estimulà a realitzar un estudi de la reactivitat de la sinapsi mioneural a la DBA, en distintes espècies, comprovant l'existència d'un polimorfisme filogenètic d'aquest receptor a la lectina. Fet que ens ha incrementat el nostre actual interès per el receptor a DBA i el seu significat funcional.

Si realment es tracta d'una mol.lècula no ubiqüita, però específica de la sinapsi mioneural, sembla poc probable que la seva funció estigui al servei de la neurotransmissió colinèrgica i ens reforça l'idea de la seva relació amb mecanismes de reconeixement i trofisme neuromuscular.

Finalment, aquesta lectina, ens ofereix també la possibilitat d'empendre l'aïllament del seu "receptor" natural, cosa que pensem abordar en el proper desenvolupament d'aquest projecte.

#### Material i Mètodes

Tractament dels teixits.- La localització citoquímica dels receptors a la DBA, i d'altres lectines, s'ha realitzat per tècniques de fluorescència, d'immunoperoxidasa i de microscopia electrònica (or col.loidal).

Per les tècniques de microscopia òptica, els teixits han estat seccionats a  $7\ \mu\text{m}$  en el criostat, prèvia congelació ràpida amb barreiga de  $\text{CO}_2$  sòlid/acetona, i sense cap fixació química. Quant l'estudi ho ha requerit, s'han realitzat tractaments amb fixadors químics o agent de digestió sobre les seccions. Les seccions, muntades en portaobjectes, han estat incubades amb DBA conjugada amb isotiocianat de fluoresceïna (DBA-FITC), a una concentració de  $200\ \mu\text{g/ml}$  en tampó fosfat-salí (PBS). durant 30 min. Una vegada rentades amb PBS, les preparacions han estat muntades amb FLUOPREP (Biomerieux R). S'ha realitzat, en alguns casos la tècnica de doble marcatge dels receptors a la DBA i dels receptors a l'acetilcolina (AChR), pel qual s'ha afegit al medi d'incubació de DBA-FITC,  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada amb isotiocianat de tetrametilrodamina ( $\alpha$ -Bgtx-TRITC), a una concebtració  $5-10\ \mu\text{g/ml}$ . L'observació i fotografia, s'ha realitzat en un microscopi LEITZ-Dialux-20 equipat amb fluorescència de llum incident i de filtres selectius per la fluoresceïna i la rodamina (L2 i N2).

La tècnica d'immunoperoxidasa, s'ha realitzat incubant les seccions durant 30 min amb DBA no marcada (VECTOR), a una concentració de  $10-15\ \text{g/ml}$  en PBS, seguit d'incubacions amb IgG de conill anti DBA (1/100),



IgG de porc anti-IgG de conill (1/40) i complex peroxi-  
dasa-antiperoxidasa (PAP) de conill (1/100). Per baixar  
la reacció inespecífica, s'han realitzat preincubacions  
amb sèrum no immune de porc. El revelat de l'activitat  
peroxidàsica, s'ha realitzat amb diaminobenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Obtenció de conjugats.- La conjugació de la DBA amb  
FITC, l'hem realitzat utilitzant 5 mg de DBA (VECTOR o  
E-Y) disolta en 2 ml de tampó carbonat sòdic-bicarbonat  
0.05 M, pH 9.5 que conté NaCl a 0.15 M, que s'ha dialit-  
zat durant 24 h a 4°C, enfront del mateix solvent (100 ml),  
que conté 10 mg de FITC, isòmer I (SIGMA), El contingut  
del sac de diàlisi, ha estat cromatografiat en una colum-  
na (200 X 10 mm) de Sephadex-G-25 (PHARMACIA), prèviament  
equilibrada amb PBS. El material eluït amb el volum d'ex-  
clusió conté la fracció conjugada de DBA que es conserva  
a 4°C, amb 0.02% d'azida sòdica.

La conjugació de la  $\alpha$ -Bgtx, amb TRITC, s'ha realit-  
zat segons el mètode de RAVDIN i AXELROD (1977). Hem  
partit de 5 mg de  $\alpha$ -Bgtx (BOHERINGER M), disolta en  
5 ml de tampó bicarbonat 1M, pH 9.0 a la que hem afegit,  
3 mg de TRITC (SIGMA), dissolt en una petita quantitat  
de DMSO, i s'ha deixat reaccionar 30 min a 20 °C. La  
barrega s'ha cromatografiat en una columna de Sephadex  
G-25, en les mateixes condicions abans esmentades, però  
equilibrada amb tampó fosfat 3.3 mM, pH 7.0. La fracció  
obtinguda en el volum d'exclusió s'ha purificat en una  
columna (250 X 20 mm), de CM-SephadexG-50 (PHARMACIA),  
equilibrada amb el mateix tampó. La columna ha estat  
eluïda, primer amb 20 ml de tampó fosfat, seguit d'un  
gradient lineal de 0-80 mM NaCl, en tampó fosfat.-volum  
total, 160 ml-, i finalment, amb 40 ml de NaCl 150 mM  
en el mateix tampó. Hom ha realitzat un assaig histoquí-  
mic de l'activitat de les fraccions obtingudes que es  
correspon, amb major eficàcia, als pics III i IV.

Microscopia electrònica.- S'ha realitzat en múscul in-  
tercostal de rata fixada per perfusió en paraformaldehid  
al 4% en tampó fosfat 0.1 M, pH 7.4 que conté un 0.25%  
de glutaraldehid. Les peces dissecades en petits fragments,  
han estat incluides sense osmificació, a baixa temperatu-  
ra (-20°C) en LOWICRYL K-4M (POLARON). Els talls ultra-  
fins, muntats en reixes de níquel, han estat incubats  
(1-12 h) amb complexes de DBA-partícules d'or col.loidal  
de 10 nm, i finalment, contrastats amb acetat d'unani i  
citrat de plom. L'obtenció de conjugats lectina-or col.loi-  
dal, s'ha realitzat seguint la tècnica de ROTH (1983).



L'estudi histològic dels materials s'ha fet utilitzant tècniques de coloració general (hematoxilina-eosina), impregnació argèntica de les fibres nervioses (Gros-Bielchowsky) i demostració de les sinapsis mioneurals per l'histoquímica de la acetilcolinesterasa (Karnovsky).

### Resultats

(1) Localització dels llocs de fixació de la DBA al múscul de rata adulta.— La observació de seccions a criostat de múscul no fixat, incubades amb DBA-FITC, demostra una moderada fluorescència en les fibres musculars i una intensa fluorescència a nivell de la sinapsi mioneural (Fig 1e). La morfologia de les sinapsis mioneurals revelada per la DBA, es correspon a les descripcions clàssiques de l'aparell subneural de Couteaux, mostrades per l'AChE. La incubació simultànea amb  $\alpha$ -Bgtx-TRITC, posa de manifest una perfecta correspondència, a nivell de microscopia òptica, de la localització dels receptors a la DBA i dels AChR. (Fig 1a i 1b). L'aplicació de la tècnica indirecta (DBA-antiDBA-PAP), dóna els mateixos resultats; però la sensibilitat d'aquesta última, és de l'ordre de 20 vegades més gran.

A nivell ultraestructural, utilitzant conjugats DBA-or col.loidal, es pot demostrar que els receptors a la DBA, es localitzen a nivell de la làmina basal de la sinapsi mioneural (Fig 1c).

La reactivitat de la placa motora a la DBA, es conserva després de l'acció del etanol, acetona i cloroform, però l'acció del formaldehid la baixa sensiblement. També desapareix aquesta reactivitat, pel tractament amb col.la-genasa i trpsina. L'acció del metanol, àcid acètic i del fixador de Carnoy, és paradoxal; després del tractament amb aquests agents, es descobreixen nous llocs reactius a la DBA, en la totalitat de la làmina basal tant sinàptica com extrasinàptica. (Taula I).

(2) Localització dels llocs de fixació de la DBA a músculs de diverses espècies.— La reactivitat de la sinapsi mioneural a la DBA, és present en tots els mamífers i reptils estudiats. En algunes espècies (per exemple, el gat), la DBA, a més de revelar les plaques motores, es fixa damunt les estructures vasculars (Fig 1a). Els amfibis estudiats presenten una feble reacció o nula a la DBA a nivell de la sinapsi. Les aus, no presenten receptors a la DBA a nivell de placa motora; i en algunes (pollastre), la DBA es fixa damunt els vasos sanguinis (Fig 1f). En el peix estudiat (Torpedo marmorata), la DBA, es fixa inten-



sament damunt la totalitat de la làmina basal muscular, tant sinàptica com extrasinàptica. És interessant assenyalar que l'organ elèctric de Torpedo, no reacciona amb aquesta lectina. (Taula II).

(3) Comportament dels receptors sinàptics a la DBA durant el desenvolupament, regeneració i denervació de les plaques motores.— La intensitat de la reacció a la DBA, a nivell de la sinapsi mioneural és molt feble després de 80 dies de denervació en la rata adulta. Hom ha provocat ectòpica de plaques motores en el múscul soleus, per implantació distal del nervi tibial: al cap de 40 dies les plaques novament formades mostren reactivitat intensa a la DBA.

Durant el desenvolupament, la detecció histoquímica del receptor a la DBA, està molt retardada respecte a AChR i AChE. Nosaltres, hem detectat, com més aviat, una feble fixació de la DBA a plaques motores, en rates, als 3 dies postnatsals i la reactivitat augmenta progressivament fins als 15 dies postnatsals, on la intensitat és semblant a la de l'animal adult. (Taula III).

(4) Fixació d'altres lectines en el teixit muscular de la rata adulta (Taula IV).— La lectina Concanavalina A (CoA) i la lectina de la llavó de blat (WGA) es fixen en tota la làmina basal muscular sense diferenciar territoris sinàptics, també sobre estructures connectives i vasculars (endomisi) (Fig 1e i 1h). La lectina de Ara-chis hipogea (PNA), es fixa feblement sobre la làmina basal muscular i intensament sobre les fibres nervioses mielinitzades (Fig 1g). La lectina de Bandeirea simplifolia (BSL i GS-I), es fixa intensament sobre les estructures vasculars, especialment capilars.

### Discussió

Els resultats principals que es desprenen del nostre estudi són: (1) la DBA, reconeix un carbohidrat específicament localitzat a la LBS; (2) d'altres lectines, (CoA, WGA), reconeixen la totalitat de la làmina basal muscular; (3) el receptor a la DBA es pot expressar "de novo", damunt la làmina basal, prèviament extrasinàptica, durant la neoformació de sinapsis neuromusculars, en condicions de regeneració; (4) el receptor a la DBA, disminueix sensiblement en el decurs d'una denervació prolongada; (5) el receptor a la DBA, a la rata, es visualitza, per primera vegada, al 3<sup>er</sup> dia postnatal (molt posterior, respecte a l'aparició de l'AChE i AChR).



DENNIS M.J., BISSARD-DORNAIN L., HARRIS A.J. (1981).  
Development of neuromuscular junctions in the rat.  
*Devel. Biol.* 81, 266-279.

No coneixem la naturalesa química ni la funció del receptor a la DBA, però, podem afirmar que ha de contenir N-acetilgalactosamina ja que la lectina reconeix aquest sucre terminal en les cadenes oligosacàrides. En general, les lectines que lliguen N-acetilgalactosamina, reconeixen glicoproteïnes, glicolípids i glicosaminoglicans. Això no fa estranyar la seva localització a una làmina basal donada la composició química de la mateixa (KEFALIDES 1979) i la sensibilitat de la fixació de la DBA a la col.lagenasa i la tripsina, amb resistència als solvents orgànics.

Alguns dels resultats abans esmentats, principalment (1) i (6), ens inclinen a pensar que el receptor a la DBA, no està directament implicat en els mecanismes de neurotransmissió a la sinapsi neuromuscular.

Les particularitats de la LBS com element inductor de la diferenciació d'una placa motora (SANES, 1983) i també, les propietats generals dels carbohidrats complexos en els processos de diferenciació cel.lular i organogènesi (BARONDES, 1976), ens donen elements de judici, per establir la hipòtesi sobre el significat funcional del receptor a la DBA, en el sentit que podria estar lligat al reconeixement, adhesió o estabilització de contactes neuromusculars, durant els períodes de desenvolupament i regeneració de les plaques motores.

S'ha demostrat l'existència de contactes neuromusculars funcionants, en la rata, a partir del dia 14 de gestació (DENNIS i cols, 1984), i els cúmuls de AChR i d'AChE a les plaques motores, ja es troben diferenciats a partir del dia 18 de gestació. El receptor a la DBA, d'altra banda, no el detectem fins al 3<sup>er</sup> dia postnatal. Això fa poc probable que el receptor a la DBA estigui present en els miotubs abans de l'arribada dels nervis i per tant, no creiem que la seva expressió en la superfície muscular pugui prede-terminar l'àrea sinàptica en l'embrió.

El mateix raonament, el podem aplicar a d'altres marcadors immunològics de la LBS, estudiats per CHIU i SANES (1984), que apareixen un o més dies retardats respecte l'AChE o els cúmuls de AChR.

Una possibilitat que ens sembla atractiva, és relacionar la cronologia d'aparició del receptor a la DBA, amb el període d'estabilització postnatal de la sinapsi mioneural. Els miotubs, durant el desenvolupament reben una innervació polineural transitòria (BENNET, 1983) i, per un mecanisme de competició, els terminals supernumeraris, són eliminats, durant el període postnatal (PURVES i LICHTMAN, 1980). A la rata, aquest fe-



nòmen, es dona entre els 3 i 15 dies (Van ESSEN, 1982).

Els receptors a la DBA, apareixen en les últimes etapes de la maduració sinàptica en una cronologia coincident, amb el període natural de l'eliminació dels contactes supernumeraris, per tant, podrien estar relacionats amb l'estabilització de la sinapsi neuromuscular, ja sigui facilitant l'adhesió nervi-múscul o mitjançant un altre mecanisme. Una altra possibilitat seria que el receptor a la DBA, sigui el receptor natural d'una lectina endògena, similar a les ja detectades en el sistema neuromuscular per MIR-LECHAIRE i BARONDES, 1977).

Per verificar aquesta hipòtesi, caldria realitzar experiments d'acceleració o retard del període de maduració postnatal de la sinapsi neuromuscular i establir la seva correlació amb l'existència de receptors a la DBA. També s'hauria d'establir una correlació entre la intensitat de la reacció a la lectina d'una determinada placa motora i el nombre d'axons que hi arriben. Aquesta es la tasca immediata que ens proposem endagar tot seguit en el nostre laboratori.

Aquest treball, ha estat subvencionat per la CIRIT. Agraïm la col.laboració del Dr. E. Iglesias i la Dra E. Franco, en la realització dels experiments de reinnervació. La correcció d'estil es deu a Maria Puig.

### Bibliografia

- BADER D. Density and distribution of  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites in postsynaptic structures of regenerated rat skeletal muscles. J. Cell Biol. 88, 338-345 1982.
- BARONDES S.H. (1976). Neuronal recognition. Chapman and Hall, London
- BENNET M.R. (1983). Development of neuromuscular junction. Phys. Rev. 63, 915-1048.
- CHIU A.Y. SANES J.R. (1984). Development of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of rat muscle. Develop. Biol. 103 456-467



- DENNIS M.J., ZISKIND-CONHAIM L., HARRIS A.J. (1981). Development of neuromuscular junctions in the rat. Develop. Biol. 81, 266-279.
- KEFALIDES N.A., ALPER R., CLARK C.C. (1979). Biochemistry and metabolism of basement membranes. Int. Rev. Cytol. 61, 167-228.
- McMAHAN U.J., SANES J.R., MARSHALL L.M. (1978). Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. Nature (Lond) 271, 172-174.
- PURVES D., LICHTMAN J.W. (1980). Elimination of synapses in the developing nervous system. Science 210, 153-157.
- RAVDIN P., AXELROD D. (1977). Fluorescent tetramethylrhodamine derivatives of  $\alpha$ -bungarotoxin: preparation, separation and characterization. Anal. Biochem. 80, 585-592.
- ROTH J. (1983). Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. J. Histochem. Cytochem. 31, 987-999.
- SANES J.R. (1983). Roles of extracellular matrix in neural development. Ann. Rev. Physiol. 45, 581-600.
- SANES J.R., CHENEY J.M. (1982). Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membranes. J. Cell. Biol. 93, 442-451.
- SANES J.R., CHENEY J.M. (1982) Lectin-binding reveals a synapse-specific carbohydrate in skeletal muscle. Nature (Lond), 300, 646-647.
- SANES J.R., HALL Z.W. (1979). Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. J. Cell. Biol. 83, 357-370.
- SANES J.R., MARSHALL L.M., McMAHAN U.J. (1978). Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. J. Cell Biol. 78, 176-198.



Taula I

## CITOQUÍMICA DBA-FITC

Múscul de rata adult (Fixació, digestió)

	L.B.S	L.B.Ex.
CONTROL	+	-
CLOROFORMO	+	-
ACETONA	+	-
FORMOL 4%	-	-
METANOL	+ -	+ -
CARNOY	+	+
CARNOY+		
Desmetilació	+	+
ETANOL/ACETIC	+	+
COL.LAGENASA	-	-
(0,1 % 30)		
COL.LAGENASA	-	-
(+CoA FITC)		
TRIPSINA	-	-
(0,1 % 30')		
KARNOVSKY	+	-

Taula II

## CITOQUÍMICA DBA-FITC EN MOSCUL

Polimorfisme filogenètic

	L.B.S	L.B.Ex	Vasos
<b>Mamífers</b>			
Rata (Sprague Dawley)	+	-	-
Gat ( <i>Felis catus</i> )	+	-	+
Conill (New Zeland)	+	-	-
<b>Reptils</b>			
Galàpag ( <i>Clemmys caspica</i> )	+	+ -	-
Serp ( <i>Elaphe longuissima</i> )	+	+ -	-
Drago ( <i>Tarentola maurita-</i> <i>nica</i> )	+	+ -	+
Sargantana ( <i>Podarcis his-</i> <i>panica</i> )	+	+ -	-
<b>Amfibis</b>			
Gripau ( <i>Bufo calamita</i> )	-	-	-
Granota ( <i>Rana redibunda</i> )			
<b>Aus</b>			
Pollastre (Arbor acres)	-	-	+
Carderola ( <i>Carduelis chloris</i> )	-	+ -	-
<b>Peixos</b>			
Torpedo ( <i>Torpedo marmorata</i> )	+	+	-
Organ elèctric Torpedo	-	-	-

Taula III

## RECEPTORS A DBA SINAPSI MIOHEURAL

Desenvolupament postnatal

Dia	Bgtx TRITC	AChE	DBA FITC	DBA PAP
1	+	+	-	-
3	+	+	+ -	+ -
7	+	+	+	+
10	+	+	+	++
11	+	+	++	+++
13	+	+	+++	+++
15	+	+	+++	+++
Adt.	+	+	+++	+++

Taula IV

## CITOQUÍMICA LECTINES-FITC

Múscul rata adulta sense fixar

	L.B.S	L.B.Ex	Vasos	Fbr.Ner.	Fbr. Musc.	End.	Prn.
DBA	+	-	-	-	+ -	-	-
Co-A	+	+	+	-	-	+	+
Gs-1	+ -	+ -	+	-	-	-	-
BSL	+	+	+	-	-	-	+
WGS	+	+	+	-	-	+	+
PNA	+ -	+ -	+ -	+	-	-	+

L.B.S=Làmina basal sinàptica

End.=Endomisi

L.B.Ex=Làmina basal Extrasinàptica

Prn.=Perineure



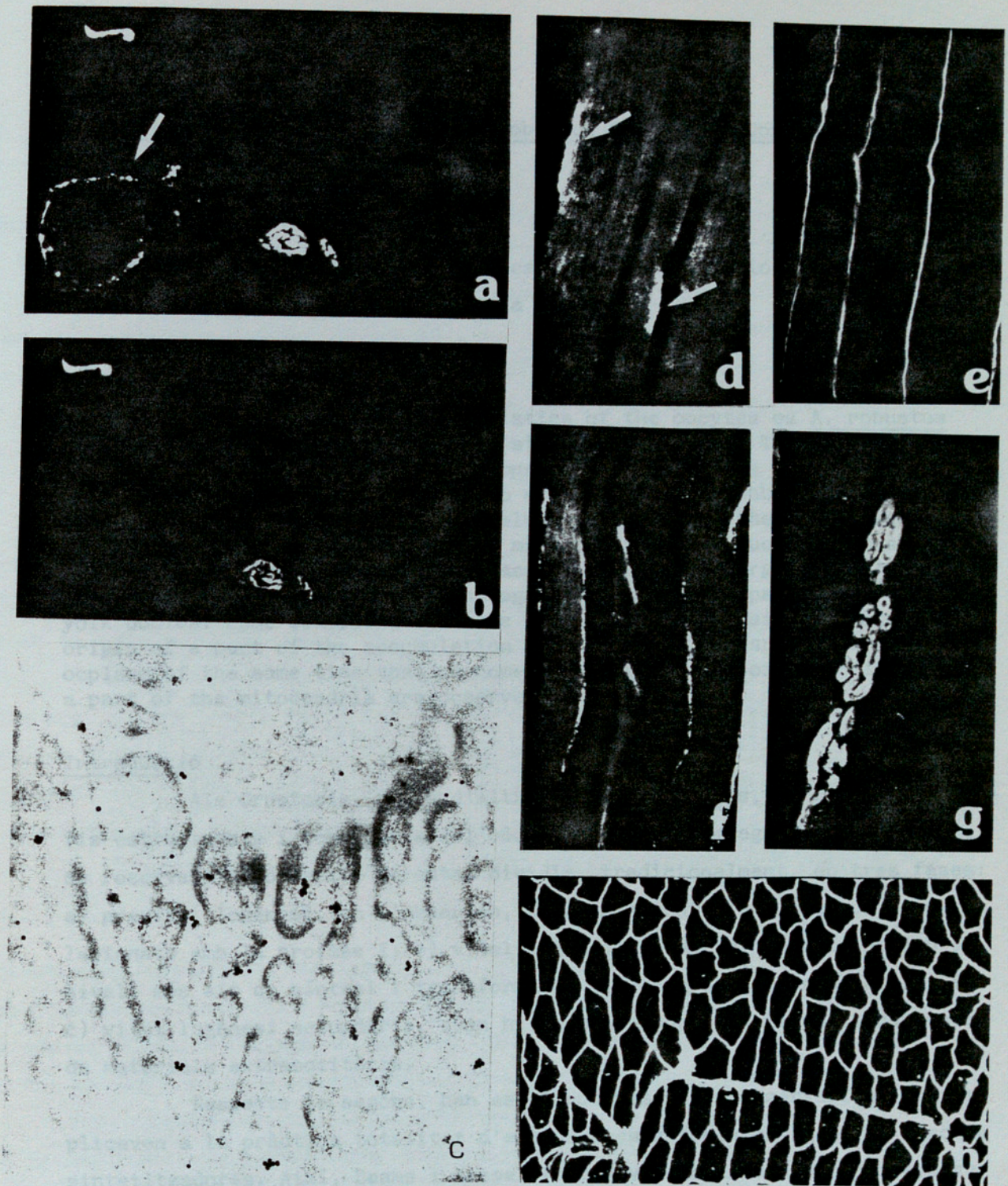


Fig 1. (a i b) Intercostal de gat, mateix camp, marcat amb DBA-FITC/ $\alpha$ -Bgtx-TRITC, visualitzat amb òptica rodamina (b) i fluoresceïna (a), la flecha indica els vasos. (c) Placa motora en la rata marcada amb DBA-or col.loidal. (d) Múscul rata marcat amb DBA-FITC, les fleches indiquen les plàques motores. (e) Múscul marcat amb CoA. (f) Múscul de pollastre marcat amb DBA-FITC. (g) Múscul de rata marcat amb PNA. (h) Múscul marcat amb WGA.