

Trabajo de Fin de Grado

LOS CANALES DE CALCIO P/Q Y L
PROMUEVEN LA ELIMINACIÓN
SINÁPTICA EN LAS UNIONES
NEUROMUSCULARES. PAPEL DE
LAS PROTEÍNAS PKC ϵ Y MUNC18-1

Pablo Hernández Luis

Tutor académico: Dra. Maria Montserrat Poblet Icart

Tutor de prácticas: Dra. Maria de les Neus García Sancho

Tarragona, Junio 2019

Grado de Biotecnología

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Sinapsis neuromuscular	4
Estructura de la SNM	5
Función de la SNM	8
Desarrollo de la SNM	9
Proceso de eliminación sináptica	10
Canales de calcio (VDCCs)	12
Tipos de VDCCs	12
Modulación de los VDCCs	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
METODOLOGÍA.....	17
Animales.....	17
Anticuerpos	18
Inhibidores de los VDCCs.....	19
Reactivos	19
Inmunohistoquímica	20
Western - blot	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Localización de los canales de calcio L, P/Q y N.....	26
Efecto del bloqueo de los canales de calcio L, P/Q y N en la inervación durante el proceso de eliminación sináptica.....	27
Efecto del bloqueo de los canales de calcio en la maduración de los AChR.....	29
Expresión de los diferentes canales de calcio durante su desarrollo postnatal	31
Canal L.....	33
Canal P/Q	33
Canal N	34
Expresión de las proteínas PKC ϵ y Munc18-1 durante el proceso de eliminación sináptica ..	34
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
AUTOEVALUACIÓN.....	42

DATOS DEL CENTRO

Este Trabajo de Fin de Grado fue realizado en la Unidad de Histología y Neurobiología del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad Rovira y Virgili bajo la supervisión y tutorización de la Dra. Maria de les Neus Garcia Sancho y los doctorantes Laia Just Borràs y Víctor Cilleros Mañé.

La Unidad de Histología y Neurobiología es un grupo de investigación consolidado de la Generalitat de Catalunya y URV (UHNEUROB). Cuenta con más de 11 Proyectos financiados. El último de ellos fue: Actividad muscular y control retrógrado de la neurotransmisión (SAF2015-67143).

La línea de investigación que siguen es la neurobiología celular, molecular y funcional de la sinapsis neuromuscular. En concreto la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica, la neurotransmisión y las patologías asociadas. El objetivo científico es estudiar la formación y estabilización de conexiones neurales en el desarrollo neonatal, en el adulto, el envejecimiento y en trastornos degenerativos experimentales. Para ello, utilizan la sinapsis neuromuscular como modelo.

Las técnicas experimentales principales utilizadas por la Unidad de Histología y Neurobiología son el Western-blot, la inmunohistoquímica, microscopía confocal y la electrofisiología.

RESUMEN

En el inicio del desarrollo del sistema nervioso existe una sobreproducción de sinapsis, lo que provoca que cada fibra muscular se encuentre asociada a más de un terminal nervioso. El preciso cableado de las conexiones sinápticas depende de la actividad y requiere de la eliminación de los numerosos axones terminales que compiten por una misma célula, produciéndose la denominada eliminación sináptica. Esta eliminación tiene lugar en los primeros días de vida del individuo y finaliza en el momento en que cada fibra muscular se encuentra asociada a un único axón. En este trabajo se han estudiado mediante técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot el papel de los canales de calcio L, P/Q y N en el proceso de eliminación sináptica de las uniones neuromusculares de roedores. Los resultados han confirmado la localización de estos canales en la sinapsis neuromuscular, concretamente en el componente presináptico. Además, se ha visto como los canales L y P/Q están involucrados en el proceso de eliminación sináptica a P9 ya que su inhibición con sustancias específicas aumenta la inervación. Estos resultados han sido complementados con el estudio de la expresión de los diferentes canales. Además, se ha estudiado la expresión de las proteínas sinápticas PKC ϵ y Munc18-1, las cuales también parecen tener un rol importante en el proceso de eliminación sináptica.

Palabras clave: eliminación sináptica, sinapsis neuromuscular, canales de calcio, acetilcolina, PKC ϵ , Munc18-1 y multiinervación.

Abreviaciones: **ACh**, acetilcolina; **AChR**, receptores nicotínicos de acetilcolina; **DMSO**, dimetilsulfóxido; **HRP**, peroxidasa de rábano; **LAL**, levator auris longus; **mAChR**, receptores muscarínicos de acetilcolina; **P5**, día postnatal 5; **P7**, día postnatal 7; **P9**, día postnatal 9; **P15**, día postnatal 15; **P30**, día postnatal 30; **PKA**, proteína quinasa A; **PKC**, proteína quinasa C; **SNM** sinapsis neuromuscular; **STX**, syntaxina; **TBE**, tribromoetanol; **VDCC**, canal de calcio dependiente de voltaje;

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso siempre ha despertado el interés y la curiosidad de los científicos a lo largo de los años. Muchas de las funciones de nuestro cuerpo están orquestadas por este sistema mediante la conducción de señales electroquímicas, como es el caso del control de los músculos esqueléticos. El sistema nervioso es capaz de elaborar una respuesta que será conducida a través de los axones de las neuronas hasta llegar a las fibras musculares, las cuales se contraerán para dar lugar al movimiento.

En un individuo adulto cada fibra muscular está asociada a un único terminal nervioso formando una sinapsis neuromuscular. No obstante, al nacer la fibra muscular se encuentra poliinervada, es decir, asociada a múltiples terminales nerviosos. En los primeros días de vida del individuo tiene lugar el proceso de eliminación sináptica, en el cual se van eliminando los diferentes terminales nerviosos hasta que solamente queda un único axón asociado a cada fibra muscular. (Sanes and Lichtman, 1999)

En este trabajo se pretende estudiar la relación que tienen los canales de calcio (VDCC) del terminal nervioso en el proceso de eliminación sináptica. En concreto, se estudian los canales L (Cav1), P/Q (Cav2.1) i N (Cav2.2) mediante técnicas como la inmunohistoquímica o el Western-blot. Además, también se estudia la expresión de las proteínas sinápticas PKC ϵ y Munc18-1.

Sinapsis neuromuscular

La sinapsis mejor estudiada para el entendimiento de los mecanismos de su formación y mantenimiento es la sinapsis neuromuscular debido a su gran tamaño y su ubicación fuera del cerebro. La sinapsis neuromuscular (SNM) es una estructura especializada que se encuentra en el sistema nervioso periférico entre la célula muscular esquelética y el terminal nervioso (Legay and Mei, 2017). Los axones que controlan las células musculares esqueléticas surgen de los cuerpos celulares centrales de las neuronas motoras. Estas se encuentran en el sistema nervioso central y viajan hasta las fibras musculares, también denominadas miocitos.

La SNM está formada por tres tipos de células diferentes (Figura 1): la motoneurona, cuyo axón terminal contiene el neurotransmisor acetilcolina (ACh); la célula de Schwann, que cubren el axón terminal excepto la intersección entre la membrana presináptica y postsináptica; y el miocito, célula que producen la contracción muscular.

Durante el proceso de la transmisión nerviosa neuromuscular, el impulso electroquímico en una motoneurona provoca la liberación en su terminal del neurotransmisor que actúa en la superficie del miocito. Esto provocará la despolarización de su membrana y la activación de la contracción (Slater, 2017).

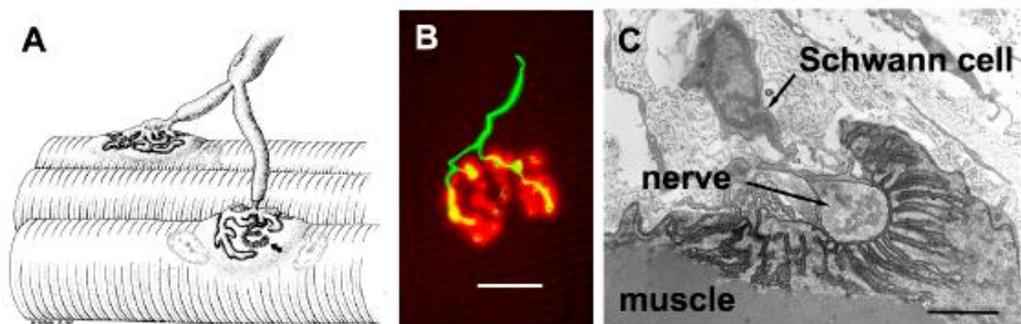


Figura 1: Estructura de la unión neuromuscular. (A) Diagrama que muestra un axón motor que ramifica para inervar dos fibras musculares. La flecha muestra la región donde se ha eliminado la unión con otro axón, lo que revela pliegues postsinápticos. (B) Imagen de fluorescencia de una unión neuromuscular (escala 20 μm). La fluorescencia verde hace referencia al terminal nervioso y la roja a los receptores de acetilcolina. (C) Micrografía electrónica de una corte transversal de una SNM (escala 1 μm). Fuente: Slater, 2017.

Estructura de la SNM

La SNM está compuesta por tres componentes distintos que contienen moléculas y orgánulos específicos (Punga and Ruegg, 2012): el componente presináptico, responsable de la síntesis, almacenaje y liberación del neurotransmisor ACh; el componente postsináptico, membrana muscular que contiene una alta densidad de receptores de acetilcolina (AChR); y la célula de Schwann. Entre el componente presináptico y postsináptico existe una hendidura sináptica que facilita la comunicación entre las dos membranas.

El componente presináptico comprende el terminal nervioso de la motoneurona y está rodeado de la célula de Schwann. La célula de Schwann presenta dos actividades cruciales: separa los terminales nerviosos entre si y de la fibra muscular y contacta con la

placa de receptores AChR limitando el área donde se produce la transmisión sináptica. En cuanto a la motoneurona, esta está formada por un cuerpo celular situado en la médula espinal o en los núcleos del nervio craneal del tronco cerebral. La motoneurona envía sus axones a los músculos. Estos axones ramifican en axones colaterales, cada uno de los cuales acaba formando el nervio terminal que contactará con una única fibra muscular. El contacto de la motoneurona con un grupo de fibras es denominado unidad motora. Para conseguir inervar un músculo trabajan conjuntamente diversas unidades motoras (Slater, 2017)

El nervio terminal contiene vesículas sinápticas (SVs), cada una de las cuales contiene 5000-10000 moléculas del neurotransmisor ACh. Estas vesículas se sitúan en un marco de actina muy cerca de las zonas de liberación. El contenido de una vesícula se denomina *quantum*. La llegada del estímulo nervioso resulta en una obertura de los VDCCs lo que provoca una movilización de las SVs, produciéndose la exocitosis de las mismas y la liberación de las moléculas de ACh (Hirsch, 2007). Cada terminal nervioso contiene un alto número de SVs, no obstante, solo una pequeña fracción están preparadas para una liberación inmediata. El tamaño de estas vesículas y su probabilidad de liberación determinan la fuerza sináptica. Cuando se agotan se reponen a través de un grupo de vesículas de reserva (Kaesler and Regehr, 2017).

Las SV son liberadas en zonas de la membrana presináptica altamente especializadas, denominadas zonas activas. Se ha comprobado mediante ensayos inmunohistoquímicos la localización de numerosos VDCC en las zonas activas. La probabilidad de secreción de una SV disminuye tres veces al duplicar la distancia entre los VDCC y SVs. Es por ello que en la zona activa de la mayoría de sinapsis el espacio entre los VDCC y las SVs es relativamente pequeño, menor de 50 nm (Zhai and Bellen, 2004).

El neurotransmisor ACh es sintetizado en el citosol de las neuronas y almacenado en vesículas gracias a la actividad del transportador VAcHT. Este transportador es una proteína transmembranal que utiliza el gradiente electroquímico generado por una ATPasa de protones dependiente de energía para intercambiar dos protones por una molécula de ACh (Prado et al., 2002). Es por ello que los terminales nerviosos contienen un gran número de mitocondrias situadas en las regiones superiores del terminal. La síntesis de ACh se lleva a cabo por la acción de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), utilizando como sustratos colina y acetil CoA.

El componente postsináptico de la SNM hace referencia a la superficie de la célula muscular que se encuentra en contacto con el terminal nervioso. Esta superficie contiene un gran número de AChR, aproximadamente en una densidad de 10,000 AChRs/ μm^2 (Slater, 2017). Esto es posible debido a las invaginaciones presentes en la región postsináptica que provocan que aumente considerablemente su superficie. Estas regiones se encuentran situadas debajo de las zonas activas del terminal nervioso presináptico.

En cuanto a la hendidura sináptica, esta hace referencia al espacio entre el terminal nervioso y la membrana postsináptica de la fibra muscular. Las fibras musculares se encuentran rodeadas por una capa de tejido conectivo denominado membrana basal, formada por dos capas, la lámina basal y la lámina reticular. La membrana basal rodea toda la fibra muscular incluyendo la hendidura sináptica y contribuye a preservar la integridad y estabilidad de la sinapsis. Sin embargo la lámina reticular queda excluida en la hendidura sináptica de las SNM. Entre los componentes mayoritarios de la lámina basal encontramos colágeno de tipo IV, lamininas y otras proteínas como la fibronectina. Las cadenas de laminina $\alpha 4$, $\alpha 5$ y β juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la SNM y la organización de las zonas activas (Rogers and Nishimune, 2017). La membrana basal contiene una enzima imprescindible, la AChE, una carboxilesterasa tipo B necesaria para la rápida descomposición e inactivación de la ACh liberada (Rotundo, 2003). La enzima es secretada por el músculo, pero permanece unido a él por los tallos delgados de colágeno fijados a la membrana basal.

Los AChR están considerados como receptores colinérgicos ya que responden a la ACh. Pueden estar compuestos de diferentes subunidades y formar compuestos homoméricos o heteroméricos. Los receptores homoméricos permiten la unión de cinco moléculas de ACh y los heteroméricos contienen al menos dos sitios de unión para ACh. Esta unión activa el receptor, lo que permite el paso intracelular de iones de Na^+ y Ca^{2+} y el flujo extracelular de iones de K^+ , provocando la despolarización de la membrana postsináptica que acabará conduciendo a la contracción muscular (Zoli et al., 2018)

Función de la SNM

El papel fundamental de la SNM es convertir un potencial electroquímico proveniente de una motoneurona en una contracción muscular. El proceso en la transmisión neuromuscular es muy similar en la mayoría de animales. Encontramos ejemplificado el proceso en la Figura 2. Todo comienza con la llegada de un potencial al terminal nervioso (A), lo que provoca la obertura de los VDCCs y el consecuente aumento del calcio intracelular (B). Esto desencadena una cascada de señales intracelulares que desembocan en la liberación de ACh al espacio intrasináptico por parte de las SVs (C). Las moléculas de ACh atraviesan el espacio intrasináptico y se unen a los AChR de la membrana postsináptica (D), lo que provoca su activación y la consecuente entrada de iones Na^+ al interior celular. Al mismo tiempo, los canales de K^+ impulsan iones de K^+ al exterior celular para contrarrestar la despolarización de la membrana (E). El resultado es un potencial modificado en la placa terminal que acaba produciendo la contracción muscular (F) (Martyn et al., 2009).

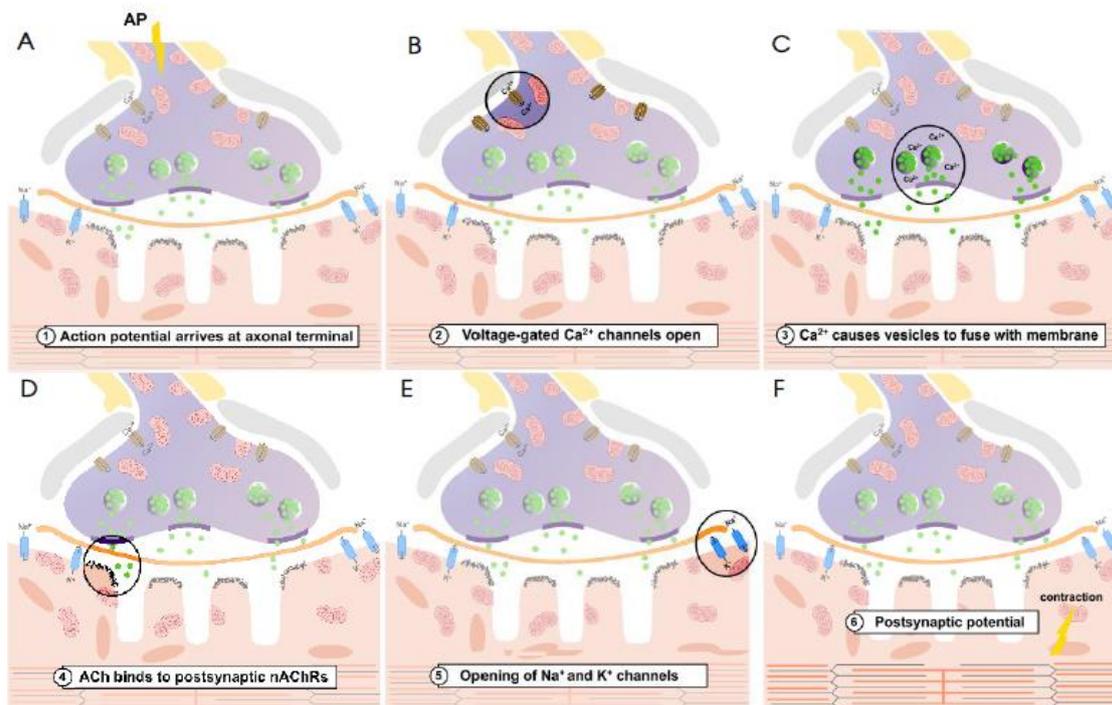


Figura 2: Transmisión sináptica en la SNM. (A) Un potencial de acción es conducido a través de la motoneurona hacia el terminal presináptico. (B) El cambio en la polaridad eléctrica del terminal presináptico causa una obertura de los VDCCs. (C) La entrada de Ca^{2+} al terminal presináptico provoca la exocitosis del neurotransmisor ACh. (D) La ACh se difunde a través del espacio intrasináptico y se une a los AChR de la membrana del músculo. (E) La activación de AChR causa la obertura de los canales de Na^{2+} y K^+ . (F) A medida que el Na^+ entra al interior de la célula muscular se despolariza la membrana, lo que provoca un potencial de acción que finaliza con la contracción muscular.

Desarrollo de la SNM

Existen dos estadios principales en el desarrollo de la SNM: el estadio embrionario y el estadio postnatal, donde tiene lugar el proceso de eliminación postsináptica.

Durante el desarrollo embrionario, los tres tipos celulares que conforman la SNM deben de migrar grandes distancias para encontrarse y formar una sinapsis funcional. Antes de la llegada de los axones a las fibras musculares, se forman agrupaciones primitivas de AChR en el centro de los miotubos (miofibras inmaduras). Este proceso se denomina *prepatternning* e indica que el músculo juega un papel fundamental en el inicio de formación de la SNM. Algunos de los axones de las motoneuronas alcanzan algunos de los grupos de AChR, pero no a todos. Los AChR alcanzados se inervan por dos o más axones, mientras que los sitios no inervados se dispersan. Antes del nacimiento, tanto la morfología como la funcionalidad de la SNM es inmadura, por lo que se requiere de una maduración postnatal para asegurar una correcta neurotransmisión (Liu and Chakkalakal, 2018)

En el estadio postnatal, a medida que la SNM va madurando se va produciendo la invaginación de la membrana postsináptica y los receptores AChR se van concentrando en la cresta de estas invaginaciones, produciéndose el aumento de su densidad. Además, es en esta etapa cuando tiene lugar el proceso de eliminación sináptica. El resultado de la maduración de la SNM es la formación de una eficiente comunicación donde cada miofibra es inervada por un solo axón y los receptores postsinápticos están perfectamente alineados con las zonas activas presinápticas (Liu and Chakkalakal, 2018).

Proceso de eliminación sináptica

En el nacimiento, nuestras fibras musculares se encuentran asociadas a más de un terminal nervioso; mientras que en individuos adultos, cada fibra muscular está conectada a un único terminal. El preciso cableado de las conexiones sinápticas requiere de la eliminación de los numerosos axones terminales que compiten por una misma célula diana, produciéndose la fortificación de las sinapsis más fuertes y la eliminación de las sinapsis más débiles (Darabid et al., 2018). Este proceso se denomina eliminación sináptica y tiene lugar después del nacimiento del individuo y finaliza en el momento en el que cada célula diana presenta una única sinapsis. Dependiendo de la sinapsis, hay fibras musculares en las que la pérdida de la inervación puede durar dos semanas y en otras pocos días.

La eliminación sináptica se lleva a cabo tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. No obstante, la mejor estudiada es la SNM. El mecanismo molecular gracias al cual tiene lugar la eliminación sináptica todavía no se conoce completamente. Muchos autores apuntan a que existe una competición natural entre los diferentes axones que pretenden conectar a la misma fibra muscular. De hecho, se ha observado como al eliminar mediante un láser uno de los axones, otro axón que hubiera sido eliminado no lo es. Este axón no solo sobrevive, sino que también crece y ocupa el sitio sináptico vacante que deja el axón eliminado (Turney and Lichtman, 2012).

Por otra parte, también se ha visto como la actividad sincrónica neural primeramente favorece la inervación, mientras que una actividad asincrónica neural promueve la eliminación sináptica (Buffelli et al., 2002). Por lo que el mecanismo de eliminación sináptica parece depender menos de la presencia de actividad y más en el tipo de actividad.

Otro componente que juega un gran papel en el proceso de eliminación sináptica son las células de Schwann. Tal y como se ha comprobado, las células de Schwann participan en la plasticidad sináptica a través de los receptores purinérgicos, influyendo en la eficacia de los competidores terminales (Darabid et al., 2018). Además, en las SNM encontramos células de Schwann no mielinizadas, las denominadas células de Schwann terminales. Estas células participan en la destrucción de los axones que no pasarán a formar parte de

la sinapsis. Una vez los axones han sido desasociados de la superficie muscular, son fagocitados por las células de Schwann terminales (Smith et al., 2013).

Por otra parte, en el proceso de eliminación sináptica y desarrollo de las SNM entran en juego una serie de moléculas capaces de modificar la función de las tres células de la SNM. La Unidad de Histología y Neurobiología de la URV ha relacionado el proceso de eliminación sináptica con los receptores muscarínicos (M1, M2, M3 y M4), los receptores purinérgicos (A1 y A2B) y el TrkB (Nadal et al., 2016; Tomàs et al., 2017b)

Otra molécula que cabe destacar es la proteína quinasa C (PKC). Esta familia de proteínas es capaz de fosforilar residuos de serina y treonina. Su actividad es un importante mecanismo para la regulación de la liberación del neurotransmisor y por tanto para el mantenimiento de la sinapsis (Obis et al., 2015). Existen tres familias diferentes de PKC clasificadas según su mecanismo de activación: las PKC clásicas son activadas mediante calcio y diacilglicerol (DAG), las PKC novel que requieren DAG y las PKC atípicas son insensibles a los ligandos anteriores (Huang, 1990; Newton, 2010)

Una de las proteínas moduladas por PKC es la Munc18-1. La proteína Munc18-1 también es una proteína esencial para la neurotransmisión (Wu et al., 1998). De hecho, su función es unir a la syntaxina (STX) para inhibir la formación del complejo SNARE, el cual es imprescindible para la fusión de las SVs y la liberación del neurotransmisor (Südhof, 1995).

Al mismo tiempo que se produce una pérdida en el número de axones, también existe un cambio en el componente postsináptico, en concreto en la composición y organización de los receptores AChR. La subunidad fetal ($\alpha 2\beta\delta\gamma$) es sustituida progresivamente por la subunidad adulta ($\alpha 2\beta\delta\epsilon$) lo que deriva en una menor duración de la obertura y en un aumento de la conductancia de Na^+ , K^+ y Ca^+ . Al mismo tiempo también ocurre una reorganización de estos receptores, los cuales se agrupan en las crestas de las invaginaciones y aumentarán considerablemente su densidad. (Yampolsky et al., 2010)

Ya se han observado en otro tipos de sinapsis, como la producida en las fibras trepadoras y las células Purkinje del cerebelo, en donde los VDCCs pueden jugar un papel fundamental (Kano et al., 2013). En este trabajo se pretende dar una nueva visión del proceso de la eliminación sináptica en la SNM desde la perspectiva de los VDCCs y las proteínas PKC ϵ y Munc18-1.

Canales de calcio (VDCCs)

Los VDCCs del componente presináptico juegan un papel fundamental dentro de la SNM. Median la entrada de iones de calcio a la célula en respuesta a una despolarización de la membrana provocada por el impulso nervioso. La entrada de calcio desencadena la liberación del neurotransmisor desde la zona activa. La habilidad de los VDCCs para abrirse, cerrarse o inactivarse en respuesta a los cambios provocados por la despolarización de la membrana hace que tengan un gran protagonismo en la regulación de la fuerza de la SNM (Mochida, 2018).

Tipos de VDCCs

Los VDCCs neuronales son complejos proteicos formados por 4 o 5 subunidades. La subunidad más grande y la que forma el poro transmembranal es la subunidad $\alpha 1$. También es la encargada de incorporar el sensor de voltaje y la mayoría de secuencias relacionadas con la regulación del canal. La subunidad $\alpha 1$ está organizada en cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales consiste en seis α hélices transmembranales (S1-S6) y un bucle P entre las hélices S5 y S6. Los segmentos que van del S1 al S4 forman el módulo sensor, mientras que los segmentos S5, S6 y el bucle entre ellos forman el poro (Mochida, 2018). La subunidad $\alpha 1$ está asociada a diferentes subunidades auxiliares, como son la subunidad β , la subunidad $\alpha 2$, la subunidad δ y la subunidad γ .

Los diferentes VDCCs han sido subdivididos en base a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en canales de calcio de bajo voltaje o canales de alto voltaje. Los canales de alto voltaje incluyen los tipos L, N, P/Q y R; mientras que los canales de bajo voltaje hacen referencia al tipo T (Urbano et al., 2002). Además, como podemos observar en la Tabla 1, existen otras clases de nomenclaturas en función de la subunidad $\alpha 1$ que constituye el canal o en función de su secuencia proteica (CaV). Cabe destacar que a cada VDCC le corresponde una toxina específica capaz de bloquear su acción.

Tabla 1: Nomenclatura de los VDCC e inhibidores. *Fuente:* Urbano, Pagani, & Uchitel, 2008

Currents/ Channel	α_1 subunits	Ca _v	Blockers
L	$\alpha_{1S}, \alpha_{1C}, \alpha_{1D}$ and α_{1F}	1.1, 1.2, 1.3 and 1.4	DHP
P/Q	α_{1A}	2.1	ω -Cono-MVIIC ω -Aga-IVA
N	α_{1B}	2.2	ω -Cono-GVIA ω -Cono-MVIIC
R	α_{1E}	2.3	SNX-488
T	α_{1G}, α_{1H} & α_{1I}	3.1, 3.2. & 3.3	Kurtoxin

Este trabajo se ha centrado en el estudio de los VDCC de alto voltaje tipo L (CaV1), P/Q (CaV2.1) y N (CaV2.2).

El canal de calcio P/Q (CaV2.1) es el más importante del componente presináptico en cuanto a la liberación del neurotransmisor ACh durante todas las etapas del desarrollo. De hecho, se ha observado que bloqueando el canal P/Q en un individuo adulto con la toxina ω -Aga-IVA se inhibe completamente la liberación del neurotransmisor (Urbano et al., 2008).

En cuanto al canal de calcio tipo N, se ha visto como está involucrado en la etapa fetal y en las primeras etapas del desarrollo neonatal (de 0 a 4 días en ratas) (Urbano et al., 2002, 2008). No obstante, sigue teniendo un mayor protagonismo el canal P/Q para la liberación del neurotransmisor. Esto se debe a la localización de los VDCC, ya que el canal P/Q se encuentra más cerca del sensor de calcio que el canal N. El calcio que entra por el canal N deberá recorrer una distancia mayor antes de alcanzar el sensor, aumentando la posibilidad de ser captado por un quelante de calcio como el Bapta. De hecho, si tratamos la SNM de un individuo adulto con Bapta, la liberación mediada por el canal P/Q no se ve afectada. Pero si tratamos la SNM de un individuo neonatal con Bapta, sí que se ve reducida la transmisión sináptica, indicando la importancia del canal N en el desarrollo neonatal (Urbano et al., 2008)

Con lo que respecta al canal L, este se puede subdividir en diferentes tipos dependiendo de la localización y la función (Zamponi et al., 2015). El canal CaV1.1 se expresa en las

uniones neuromusculares, los canales CaV1.2 y CaV1.3 se expresan en el corazón, el cerebro y las células endocrinas y el canal CaV1.4 se asocia únicamente a la retina.

Se ha observado que el canal L (CaV1) puede estar involucrado en el proceso de liberación del neurotransmisor solamente bajo ciertas condiciones biológicas y experimentales como: el tratamiento de las SNM con ácido okadaico (inhibidor de las fosfatasa de serina y treonina), con inmunoglobulinas procedentes de enfermedades de LEMS (enfermedad autoinmune que ataca a los canales tipo P/Q) o de la esclerosis lateral amiotrófica, durante la reinervación o la recuperación funcional después del envenenamiento por la toxina botulínica tipo A (Urbano et al., 2008).

La participación del canal L en la liberación de ACh de un individuo normal es muy reducida. No obstante, sí que se le ha descubierto una función fisiológica dentro de la SNM. Tal y como afirma Perissinotti, Tropper, & Uchitel, 2008, los canales L están involucrados en el reciclaje de las SVs, sugiriendo que estos canales promueven la endocitosis de SVs hacia las zonas activas donde competirán con las vesículas no utilizadas. De esta manera, se postula que la exocitosis de las SVs se desencadena por el corriente de calcio proveniente del canal P/Q, mientras que el canal L regula la endocitosis de SVs.

Modulación de los VDCCs

Los VDCCs se pueden regular gracias a la puesta en marcha diferentes mecanismos celulares. Estos mecanismos permiten a la célula mantener controlados los niveles intracelulares de calcio, lo que resulta imprescindible para poder llevar a cabo una sinapsis neuromuscular funcional.

Uno de estos mecanismos es la interacción con proteínas G. En ausencia de un antagonista, la proteína G heterotrimérica, $G\alpha\beta\gamma$, se une a la molécula GDP y se asocia con uno de los bucles intracelulares del VDCC. La activación de la proteína se produce por un cambio de la molécula GDP por GTP. Esto produce la disociación de $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$. La subunidad $G\beta\gamma$ es capaz de unirse a la subunidad $\alpha 1$ de los canales N y P/Q y provocar su inhibición (Kisilevsky and Zamponi, 2008; Mochida, 2019).

Otro posible mecanismo de regulación son las proteínas RIM. La interacción de estas proteínas con los VDCCs es esencial para su reclutamiento en la zona activa presináptica,

determinando su densidad y siendo crucial en la determinación de la fuerza sináptica (Mochida, 2019).

Además, el complejo de proteínas SNARE también puede jugar un papel muy importante en la regulación de los VDCCs. Este complejo está formado por las familias de proteínas SNAP-25, VAMP y STX, así como proteínas reguladoras como la Munc18-1 o la sinaptotagmina. Por una parte, son cruciales en el proceso de liberación del neurotransmisor, permitiendo la unión de las SVs con la membrana presináptica (Cupertino et al., 2016). Y por otra parte, pueden jugar un papel fundamental en la regulación de los VDCCs. La STX y la SNAP-25 pueden unirse a la secuencia situada los bucles intracelulares de los canales P/Q y N denominada *synprint*. Esto provoca que el potencial de membrana tenga que ser más negativo para que se produzca la activación del canal. Es decir, se necesitará una mayor despolarización de la membrana para abrir el VDCC. Dependiendo de la concentración de calcio intracelular, el *synprint* se unirá a la STX o a la sinaptotagmina. A concentraciones altas se produce la unión de *synprint* con la sinaptotagmina, llevándose a cabo la conformación del complejo SNARE que facilitará la liberación del neurotransmisor; mientras que a concentraciones bajas, se produce la unión de *synprint* con la Sintaxina (Mochida, 2018).

Por otro lado, se ha visto que las proteínas quinasas también tienen un papel en la regulación de la actividad de los canales de calcio. En cuanto a la proteína quinasa C (PKC) se ha observado que estas proteínas pueden fosforilar la secuencia *synprint*, impidiendo de esta manera la unión de la STX y SNAP-25 (Mochida, 2018). Además, la PKC es capaz de aumentar la actividad de los canales N mediante su fosforilación. Se ha visto como una proteína de unión a PKC, la denominada ENH, es capaz de llevar a cabo una aproximación de la PKC ϵ al canal N para que se lleve a cabo la reacción de fosforilación. La PKC también es capaz de regular el canal P/Q, pero de una forma mucho menos significativa (Kisilevsky and Zamponi, 2008).

En cuanto a la proteína kinasa A (PKA) se ha observado que tiene la capacidad de aumentar la actividad del canal P/Q. Actúa mediante una regulación indirecta, interfiriendo con la molécula fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂). Bajo circunstancias normales, PIP₂ es capaz de unirse al canal P/Q y reducir su actividad. No obstante, la activación de la PKA provoca la fosforilación del sitio de unión de PIP₂, impidiendo su unión y por consiguiente la inhibición del canal. Por otra parte cabe resaltar que la PKA

no parece que tenga ninguna acción reguladora sobre el canal N (Kisilevsky and Zamponi, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La interacción entre el componente presináptico y postsináptico está coordinada por diferentes vías de señalización, como los receptores presinápticos. Estos tienen un papel en el proceso de competición axonal que conduce a la eliminación sináptica. Moléculas como los receptores muscarínicos mAChR, las proteínas quinasas C y A (PKC y PKA) actúan en este proceso. De acuerdo con los resultados obtenidos previamente en la Unidad de Histología y Neurobiología de la Facultad de Medicina de Reus, se ha formulado la siguiente hipótesis: los canales de calcio presinápticos P/Q, N y L, así como las proteínas PKC ϵ y Munc18-1, juegan un papel importante en el proceso de eliminación sináptica de la unión neuromuscular durante el desarrollo neonatal de roedores.

Para poder sustentar dicha hipótesis, este trabajo persigue una serie de objetivos.

- Estudiar la localización de los canales de calcio P/Q, N y L en la unión neuromuscular.
- Estudiar si los canales de calcio P/Q, N y L regulan la eliminación sináptica en el músculo *Levator Auris Longus* de roedores P9.
- Estudiar la expresión de los canales de calcio P/Q, N y L durante el desarrollo neonatal y en el adulto.
- Estudiar la expresión de la proteína PKC ϵ y Munc18-1 implicadas en la sinapsis neuromuscular y en la regulación de los canales de calcio P/Q, N y L durante el desarrollo neonatal y en el adulto.

METODOLOGÍA

Animales

Para llevar a cabo los experimentos se han utilizado dos modelos diferentes de animales. El ratón *C57BL* fue utilizado para los estudios morfométricos y de Western-blot; y la rata *Sprague Dawley* para los estudios de Western-blot. El uso y tratamiento de los animales ha sido realizado en acuerdo con la Ley 5/1995 y el Decreto 214/1997 de la Generalitat de Cataluña, con el aprobado del Comité Ético de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira y Virgili.

Para poder obtener diferentes camadas de estos modelos de animales, se llevó a cabo su cruce en el estabulario de la Facultad. Se utilizan animales de los dos sexos y se considera el día postnatal 0 el mismo día en que nacen. Se seleccionaron individuos con 5 días de vida (P5), con 7 días (P7), con 9 días (P9), con 15 días (P15) y con 30 días (P30).

De estos modelos de animales se extrajo el músculo *Levator Auris Longus* (LAL) y el diafragma. El músculo LAL es un músculo muy fino situado en la parte dorsal de la cabeza y el cuello justo debajo de la piel. Esto permite inyectar sustancias directamente sobre su superficie y ver su inervación completa con la técnica inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia o confocal sin la necesidad de tener que cortarlo. Este músculo se ha utilizado para estudiar la morfología de las SNM durante el periodo de eliminación sináptica. Por otra parte, el diafragma se utilizó para llevar a cabo la técnica de Western-blot ya que es un tejido modelo ampliamente utilizado.

Antes de llevarse a cabo la extracción de los músculos, los animales fueron anestesiados con tribromoetanol (TBE) 2 % por vía intraperitoneal (0,15ml / 10g peso). Una vez anestesiado el individuo, se sacrificó mediante desanguinación. Los músculos LAL utilizados para inmunohistoquímica se fijaron rápidamente con paraformaldehído 4 % durante 1 hora. El diafragma y cerebro utilizados en Western-blot fueron almacenados a -80 °C hasta su procesamiento.

Anticuerpos

En este trabajo fue necesario el uso de diferentes tipos de anticuerpos para poder llevar a cabo las técnicas de Western-blot e inmunohistoquímica. Las características y origen de los anticuerpos primarios y secundarios están especificadas en la Tabla 2.

Los anticuerpos primarios utilizados para la técnica del Western-blot son anticuerpos selectivos para los canales de calcio P/Q, L y N y para las proteínas PKC ϵ y Munc18-1. En cuanto a los anticuerpos secundarios, se utilizó un anticuerpo donkey anti-rabbit conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), el cual reconoce la especie del anticuerpo primario.

En el caso del estudio morfométrico en la inmunohistoquímica, se seleccionaron anticuerpos comúnmente utilizados como marcadores en la detección de los diferentes componentes de la unión neuromuscular. Para el marcaje del terminal nervioso se empleó el anticuerpo primario rabbit anti-neurofilamento y el anticuerpo secundario Alexa-488 donkey anti-rabbit. Para la visualización de los AChR, se utilizó la toxina α -bungarotoxina TRITC, una toxina específica para los AChR.

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western-blot e inmunohistoquímica

Anticuerpo primario	Casa comercial	Fuente	Monoclonal o policlonal	Referencia	Dilución WB	Dilución IHQ
Anti-P/Q	Alomone	Rabbit	Policlonal	ACC-001	1/1000	1/300
Anti-L	Alomone	Rabbit	Policlonal	ACC-005	1/500	1/300
Anti-N	Alomone	Rabbit	Policlonal	ACC-002	1/500	1/300
Anti-PKC ϵ	CST	Rabbit	Monoclonal	#2683S	1/1000	
Anti-Munc18-1	CST	Rabbit	Monoclonal	#13414	1/1000	
Anti-neurofilamento	Sigma	Rabbit	Monoclonal	N4142		1/1000
Anti-STX	Sigma	Mouse	Policlonal	m 50664		1/1000

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados para la técnica de Western-blot e inmunohistoquímica

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Fuente	Monoclonal o policlonal	Referencia	Dilución WB	Dilución IHQ
HRP anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	Donkey	Policlonal	711-035-152	1/100000	
Alexa-fluor 488 anti-rabbit	Invitrogen	Donkey	Policlonal	A21206		1/300
Alexa-fluor 647 anti-mouse	Invitrogen	Donkey	Policlonal	A31571		1/300
TRITC- α -BTX	Invitrogen	Veneno <i>Bungarus multicinctus</i>		T1175		1/800

Inhibidores de los VDCCs

Para estudiar el efecto de los VDCCs en el proceso de eliminación sináptica se administraron subcutáneamente diferentes inhibidores de los mismos. Dichas toxinas se encuentran descritas en la Tabla 4.

Tabla 4: Inhibidores de los canales de calcio utilizados en la inmunohistoquímica cuantitativa.

Toxina	Canal Ca^{+2} antagonista	Casa comercial	Referencia	Concentración (μM)
ω -Aga-IVA	P/Q	Alomone	STA-500	0.1
ω -Cono-GVIA	N	Sigma	C9915	1
Nitrendipino	L	Sigma	N144	1

Reactivos

Las diferentes muestras de diafragma obtenidos de los diferentes animales y utilizados para Western-blot fueron incubadas en una solución de Ringer para su preservación simulando las condiciones del tejido *in vivo*. Dicha solución contiene los siguientes componentes: NaCl (137 mM), KCl (5 mM), CaCl_2 (2 mM), MgSO_4 (1 mM), NaH_2PO_4 (1 mM), NaHCO_3 (12 mM) y glucosa (12,1 mM). Además, se añade 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo para facilitar la penetración del tratamiento en el tejido.

La homogeneización de los tejidos extraídos se realizó con un tampón de lisis de composición: NaCl (150 mM), Tris-HCl pH 7,5 (50 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,1%), Igepal CA-630 (1%), PMSF (1mM), NaF (50 mM), ortovanadato de sodio (1 mM) y un cóctel de inhibidores de proteasas (1/100) (Sigma).

Para realizar la inmunohistoquímica son necesarios el paraformaldehído (4%) y el Mowiol (Calbiochem). En cuanto a la técnica del Western-blot, son necesarios el etanol, el tampón de transferencia (75 mL agua destilada, 25 mL etanol y 25 mL Buffer Bio Rad) y el Bio-Rad ECL.

Por otra parte, para llevar a cabo los diferentes lavados en las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot se utilizaron PBS y TBST respectivamente. El PBS es una solución constituida por: NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM) Na₂HPO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (1,8 mM). Mientras que el TBST es una solución constituida por: Tris base (10 mM), NaCl (150 mM) y Tween-20 (0,1%).

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica muy útil para detectar la presencia y localización de proteínas de la unión neuromuscular utilizando anticuerpos específicos y marcadores fluorescentes. En este trabajo, se realizaron dos tipos diferentes de inmunohistoquímica: en una de ellas se analizó la localización de los diferentes canales de calcio L, P/Q y N; y en la otra se llevó a cabo una inmunohistoquímica cuantitativa para poder contabilizar el número de axones asociados a una fibra muscular de diferentes uniones neuromusculares. En los dos casos se utilizó el músculo LAL de ratones *C57BL*, ya que este músculo permite realizar inyecciones subcutáneas (Erzen et al., 2000).

En este trabajo, la inmunohistoquímica cuantitativa se llevó a cabo para estudiar el efecto de diferentes inhibidores de los VDCC en el proceso de eliminación sináptica. Para ello, se tuvo que realizar una serie de inyecciones subcutáneas a nivel del músculo LAL. Se inyectaron cuatro componentes diferentes para obtener cuatro condiciones diferentes de estudio: la toxina ω -Aga-IVA (antagonista del canal P/Q), toxina ω -Cono-GVIA (antagonista del canal N), Nitrendipino (antagonista del canal L) e individuos tratados con PBS (condición de control). Se realizaron 4 inyecciones del día 5 al 8 postnatal. El

volumen del compuesto inyectado fue de 50-100 μ L. A la edad de P9, fueron sacrificados y se extrajo el músculo LAL. Durante estos 5 días se realizó un seguimiento del peso del animal para asegurar su correcto desarrollo. En cambio, para la inmunohistoquímica de la localización de los canales se utilizaron individuos no tratados.



Figura 3: Imagen del músculo LAL obtenida durante la realización de este trabajo. Barra: 2 cm.

El siguiente paso fue la extracción del músculo LAL una vez el animal hubiese sido sacrificado. Para ello se realiza un corte horizontal a la altura del cuello, entre las dos orejas. Seguidamente se realiza un corte circular pasando por fuera de las orejas sin llegar a los ojos y se extrae el “paquete”. El “paquete” que contiene el LAL es fijado rápidamente con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos. Después de la fijación, se realizan 3 lavados del tejido con PBS y se procede a aislar el músculo LAL con la ayuda de una lupa binocular (Figura 3).

Seguidamente, los músculos son permeabilizados con una solución Tritón X-100 (0,5%) en PBS y las uniones no específicas fueron bloqueadas con una solución al 4 % de albumina bovina (BSA). Posteriormente, los músculos fueron incubados durante toda la noche a una temperatura de 4 °C con el anticuerpo primario. Para realizar el recuento axonal, el anticuerpo primario utilizado fue el específico para el neurofilamento, proteína del terminal nervioso. En cambio, para la localización de los VDCC en la SNM se utilizaron anticuerpos específicos para la STX, proteína axonal, y para los diferentes VDCC.

Una vez se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo primario, se realizan 3 lavados con PBS y se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo secundario. En el caso del recuento axonal se utilizó los anticuerpos secundarios Alexa 488- donkey anti rabbit y la toxina TRITC- α -bungarotoxina específica para los AChR. Para la localización de los VDCC se utilizaron los anticuerpos Alexa 488- donkey anti rabbit, la toxina

TRITC- α -bungarotoxina y Alexa 647 – donkey anti mouse. Seguidamente, se vuelven a realizar 3 lavados con PBS y se realiza el montaje de la muestra en un portaobjetos con Mowiol.

El análisis cuantitativo para el estudio del proceso de eliminación sináptica fue realizado en un microscopio de fluorescencia (Nikon TE-2000). Se llevó a cabo el recuento de los axones y la clasificación del desarrollo de los AChR. La visualización de los VDCCs se realizó en el microscopio confocal.

El recuento de los axones se divide dependiendo de si la sinapsis neuromuscular está asociada a un solo axón, a dos axones o a tres o más axones (Figura 4 A, B, C). De esta manera se cuentan el número de casos del total de la muestra en el que la fibra muscular está asociado a un axón, a dos o a tres o más axones. En cuanto a la clasificación del desarrollo de los AChR, estos se clasifican en 4 estadios diferentes (de MS1 a MS4) que van de más inmaduro a más maduro (Figura 5).

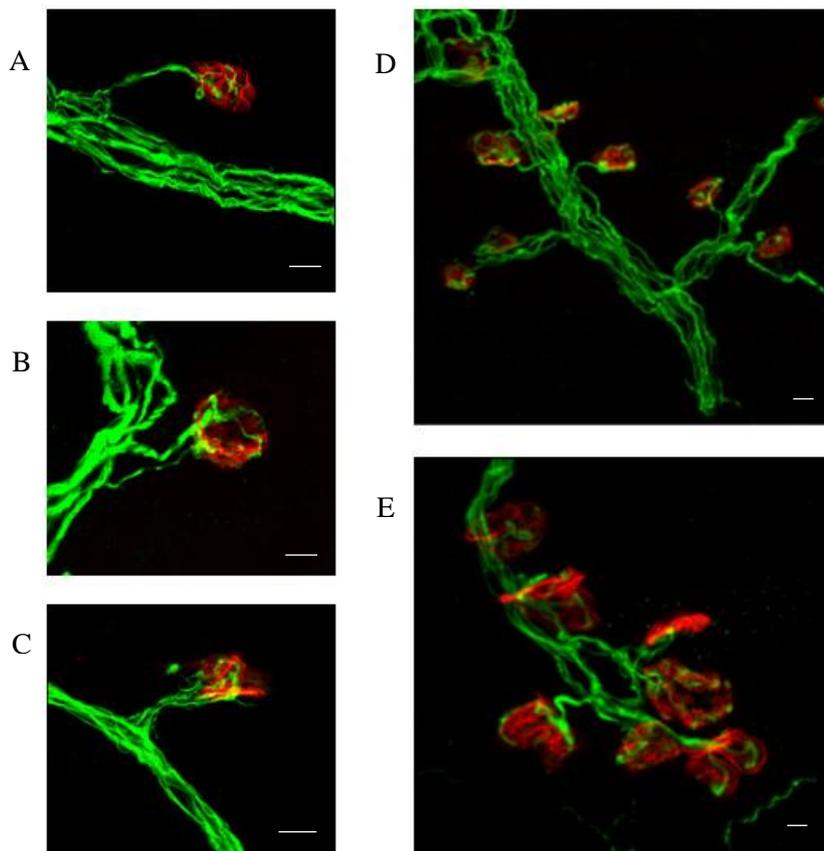


Figura 4: Imágenes de diferentes sinapsis neuromusculares (SNM) de LAL P9 tomadas durante la realización de este trabajo en el microscopio confocal. En verde se muestra el neurofilamento, proteína de los axones (componente presináptico); y en rojo los AChR (componente postsináptico). (A) Detalle SNM asociada a un axón. (B) Detalle SNM asociada a dos axones. (C) Detalle de SNM asociada a tres o más axones. (D) y (E) Agrupación de diversas (SNM). Barra: 10 μ m.

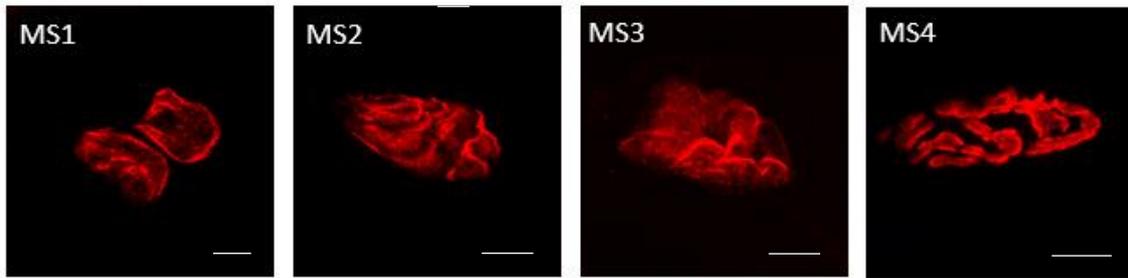


Figura 5: Imágenes de las diferentes etapas de maduración de los AChR tomadas durante la realización de este trabajo. El color rojo hace referencia a la agrupación de los AChR. (MS1) etapa más inmadura formada por una placa ovalada con una distribución uniforme. (MS2) placa ovalada con una leve elongación con pequeñas diferencias en su densidad. (MS3) placa ovalada con uno o más agujeros sin fluorescencia que indican áreas sin enervación. (MS4) la placa ovalada se transforma en un patrón ramificado más maduro con un borde externo y áreas de alta y baja intensidad. Barra: 10 μm

Se clasificaron todas las SNM visibles en su totalidad. Se analizaron un mínimo de 300 SNM por cada músculo analizado. Al menos cinco músculos fueron analizados para cada condición. Para comparar los distintos porcentajes se utilizó el test de Fisher.

Para estudiar la localización de los VDCC en la SNM se visualizaron las preparaciones en el microscopio de láser confocal (Nikon TE2000-E). Se realizó previamente una triple inmunohistoquímica, marcando cada uno de los VDCC y proteínas específicas de las diferentes células que componen la SNM (terminal nervioso con anticuerpo anti-STX y los AChR con α -bungarotoxina-TRITC. De esta manera, se puede visualizar en que parte se encuentran los VDCC. Gracias al microscopio confocal se puede conseguir una imagen 3D de las diferentes secciones ópticas procesadas de una resolución mucho mayor a la obtenida con el microscopio de fluorescencia.

Western - blot

La técnica de Western-blot se utilizó para estudiar la expresión de los VDCC L, P/Q y N y de las proteínas PKC ϵ y Munc18-1 en el periodo postnatal y adulto (de P5 a P30).

El Western-blot es una técnica analítica utilizada en biología celular cuyo objetivo reside en detectar y semi-cuantificar una proteína específica dentro de una mezcla heterogénea de proteínas. Estas proteínas se separan por su peso molecular cuando pasan a través de un gel de acrilamida gracias al impulso proporcionado por un campo eléctrico durante unas dos horas aproximadamente a un voltaje de entre 90 y 120 V.

Las muestras de músculos para procesar a través de la técnica de Western-blot fueron extraídas en una placa de Petri con Silgar en una solución de Ringer para su preservación simulando las condiciones del tejido *in vivo*.

Para llevar a cabo la técnica de Western-blot, primeramente es necesario homogeneizar la muestra, en nuestro caso del diafragma. Para ello se realizó un lisado celular gracias a una solución de lisis de composición: se añaden 2 ml de la solución de lisis por cada 0,3 gramos de tejido y se lleva a cabo la homogeneización mediante fricción mecánica. Posteriormente, para obtener la fase proteica es necesario realizar una centrifugación de 1000 g durante diez minutos a 4°C. Se selecciona la parte del sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación a 15000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de esta segunda centrifugación fue alicuotado y almacenado a una temperatura de -80 °C.

Posteriormente se determinó la concentración proteica de las alícuotas obtenidas mediante el ensayo proteico Bio-Rad DC. Gracias al conocimiento de la concentración proteica se puede hacer una estimación del volumen de muestra que se debe de cargar en los geles de electroforesis para igualar cantidades de proteína (30 µg).

El siguiente paso es la preparación del gel de electroforesis. El gel está compuesto por una proporción variable de acrilamida/bisacrilamida (dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar), tampón Tris, SDS, persulfato de amonio (APS) y TEMED. Un mismo gel está compuesto por dos porcentajes de acrilamida. En la parte de arriba del gel hay una pequeña porción con un porcentaje más bajo y un pH de 6.8, conocido como gel apilador. Debajo de este hay un gel de un porcentaje más alto y un pH de 8.8 llamado gel separador. El gel apilador se encarga de concentrar todas las proteínas en la misma línea con el objetivo de que migren en las mismas condiciones; y el gel separador tiene la función de separar las diferentes proteínas dependiendo de su peso molecular. Para este trabajo, se han utilizado geles apiladores de una proporción de 5 % de acrilamida y geles separadores con una proporción de 7 y 8 % de acrilamida.

Una vez realizada la electroforesis, se lleva a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (HybondTM-P; Amersham, GE Healthcare) aplicando un campo eléctrico mediante un sistema rápido de transferencia semi-seco. Previamente a la transferencia, las membranas deben ser activadas sumergiéndolas en una solución de etanol y posteriormente sumergidas en el tampón de transferencia.

Después de la transferencia se determinó la cantidad de proteína transferida a la membrana. Primeramente, se sumerge la membrana en una mezcla de alcoholes (7% ácido acético y 10 % metanol). Se llevan a cabo 3 lavados de 4 minutos con H₂O destilada y seguidamente se sumerge la membrana durante 15 minutos en el reactivo Bio Rad SYPRO Ruby Protein Gel Stain. Finalmente se visualiza la tinción de la proteína total adherida a la membrana mediante el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA).

Posteriormente, la membrana se bloquea durante una hora con una solución de TBST (Tris-buffered saline-0.1 % Tween-20) que contiene un 5 % de leche en polvo sin grasa, BSA o *phosphoblocker*, dependiendo de las características del anticuerpo primario. El bloqueo sirve para bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia y es necesario para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario.

Una vez bloqueadas las membranas se incuban con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés durante toda la noche a una temperatura de 5 °C. Seguidamente, se realizan 4 lavados de 4 minutos con TBST y se incuban durante una hora con el anticuerpo secundario, el cual está unido a una peroxidasa de rábano (HRP). Después de la segunda incubación se vuelven a realizar 4 lavados de 4 minutos. Finalmente, las membranas fueron reveladas gracias a la máquina ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA) y el kit comercial ECL Select (Amersham), que proporciona el sustrato a la enzima HRP.

Cuando hubo finalizado el Western-blot, es necesario llevar a cabo una determinación semi-cuantitativa del nivel de expresión de las proteínas estudiadas. Esta cuantificación se realiza gracias al software *ImageJ*, programa que permite el procesamiento de imágenes digitales. La densidad óptica integrada de las bandas se normalizó respecto a los valores de fondo y de proteína total transferida a la membrana. De esta manera se pudo obtener un valor relativo que refleja la variación de la concentración proteica de una determinada proteína durante las diferentes edades estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Localización de los canales de calcio L, P/Q y N

Primeramente, en este proyecto se realizó el estudio de la localización de los canales de calcio L, P/Q y N en la SNM. Para llevarlo a cabo, se utilizó la técnica de la inmunohistoquímica en el músculo LAL de individuos C57BL a una edad de P9. Se marcaron mediante anticuerpos específicos la STX y los diferentes VDCCs por separado. Los AChR se marcaron con α -bungarotoxina-TRITC.

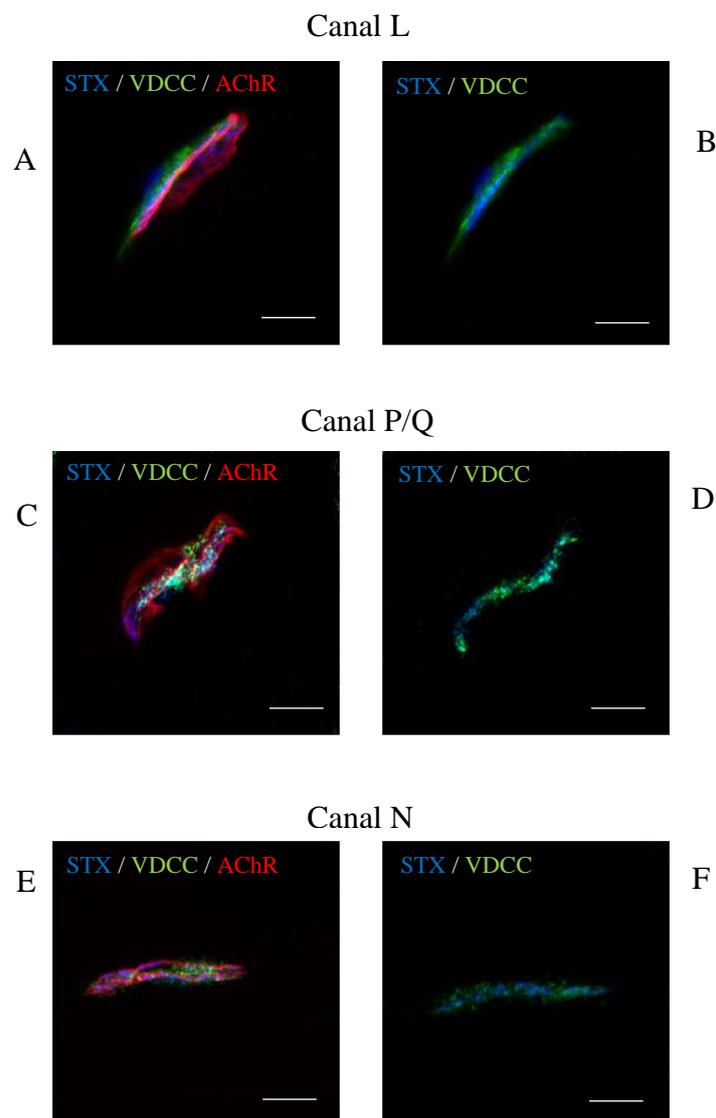


Figura 6: Localización de los VDCC L, P/Q y N en SNM de P9. En rojo se observan los AChR, en azul la STX y en verde los diferentes VDCC. Las imágenes A, C y E son secciones colocalizadas en las cuales aparecen los tres marcadores. Las imágenes B, D y F son secciones ópticas en las cuales aparecen los marcadores para la STX y los VDCC. Barra: 10 μ m.

El examen de los músculos en el microscopio confocal, tal y como podemos observar en la Figura 6, muestra que la fluorescencia proporcionada por los canales L, P/Q y N se encuentra colocalizada conjuntamente con la STX (B, D, F). La STX es una proteína del terminal nervioso, por lo que podemos afirmar que los tres canales de calcio estudiados se encuentran en el axón terminal y por tanto forman parte del componente presináptico.

Efecto del bloqueo de los VDCCS L, P/Q y N en la innervación durante el proceso de eliminación sináptica

En este trabajo se estudió la innervación polineural durante el proceso de eliminación sináptica en individuos tratados con inhibidores de los VDCCs. Se llevó a cabo el bloqueo de los VDCCs P/Q, L y N en ratones C57BL mediante el uso de antagonistas específicos a nivel del músculo LAL. La Figura 7 muestra el porcentaje de las SNM asociadas a un axón, dos axones y tres o más axones. En el caso de los individuos tratados con PBS (condición control), se analizaron un total de 557 SNM de 6 muestras diferentes; para los individuos tratados con ω -Cono-GVIA un total de 375 de 5 muestras diferentes; para los individuos tratados con ω -Aga-IVA un total de 614 de 6 muestras diferentes; y para los individuos tratados con Nitrendipino un total de 479 de 5 muestras diferentes.

En la Figura 7 se observa que el bloqueo de los canales L con Nitrendipino y P/Q con ω -Aga-IVA del músculo LAL disminuye significativamente el porcentaje de sinapsis monoinervadas respecto a la condición control. Por otro lado, no se aprecia una variación significativa en los músculos LAL tratados con ω -Cono-GVIA.

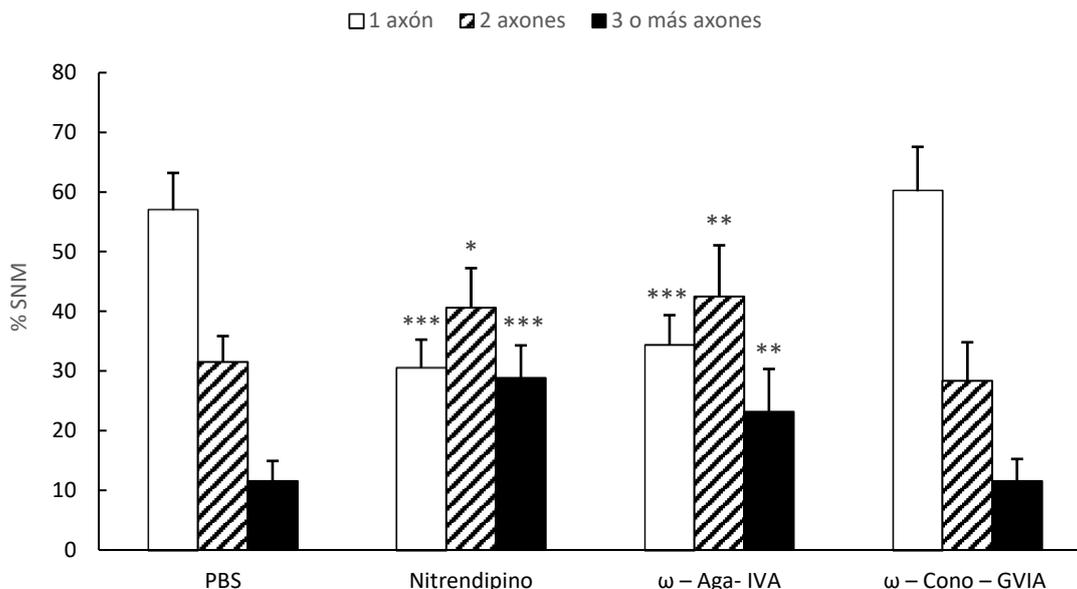


Figura 7 : Cambio en la invasión polineural de las SNM después de la inhibición de los VDCCs. La figura muestra los porcentajes de un axón, dos axones o tres o más axones en SNM en LAL P9 tratados *in vivo* con diferentes compuestos. El tratamiento con PBS representa la condición control; el tratamiento con Nitrendipino inhibe los canales de calcio L; el tratamiento con ω-Ag-IVA inhibe los canales de calcio P/Q; y el tratamiento con ω-Cono-GVIA inhibe los canales de calcio N. Test de Fisher * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto a la condición control.

Con estos resultados podemos afirmar que los VDCCs L y P/Q juegan un papel importante en el proceso de la eliminación sináptica. Ya que, llevando a cabo su inhibición por medio de antagonistas específicos, se observa un aumento de la multiinervación (incremento en el porcentaje de 2 y 3 o más axones) lo que implica un retraso en el proceso de eliminación sináptica. Por otro lado, no se observan cambios significativos cuando se produce la inhibición del canal N. Esto lleva a pensar que este canal no está directamente relacionado con el proceso de eliminación sináptica.

La represión de la liberación del neurotransmisor al producirse la inhibición de los VDCCs puede ser importante en la eliminación axonal durante el desarrollo neonatal. Por ejemplo, se postula que proteasas activadas por calcio están implicadas en la eliminación axonal (Ziemiańska et al., 2012). Como hemos observado, al bloquear los VDCCs P/Q y L, se bloquea la eliminación sináptica, incrementando significativamente sinapsis multiinervadas en P9. Impidiendo la entrada de calcio se podría actuar sobre los terminales nerviosos más pequeños (los cuales en condiciones normales tienden mayoritariamente a ser eliminados) evitando así su eliminación.

Esta afirmación también ha sido corroborada anteriormente por Garcia et al. (2001) mediante técnicas de electrofisiología. En este estudio, se inhibieron los VDCC L, P/Q y N durante 1 hora y se estudió el número total de axones funcionales en cada fibra muscular en animales neonatales y su potencial de placa evocado. Se observó como en las fibras asociadas a dos axones, la inhibición de los canales L y P/Q producía el aumento del índice de poliinervación y del tamaño del potencial de placa de uno de los axones, seguramente del axón pequeño el cual tenderá a desaparecer. En cambio, la inhibición del canal de calcio N no modificó el potencial de placa en ninguno de los dos axones.

No obstante, se debe de tener en cuenta que el proceso de eliminación sináptica no depende únicamente de los VDCC. La señalización dependiente de la actividad a través de receptores presinápticos, el componente postsináptico y la célula Schwann también tienen un papel relevante. Además, receptores muscarínicos, receptores de adenosina, el receptor neurotrófico TrkB cooperan promoviendo la competición axonal durante las primeras dos semanas neonatales (Tomàs et al., 2017a).

Efecto del bloqueo de los canales de calcio en la maduración de los AChR

La eliminación axonal está acompañada por cambios en la morfología de los AChR. En este trabajo también se ha pretendido estudiar el efecto que produce la inhibición de los diferentes VDCC en el proceso de maduración de los AChR. Para ello, se utilizaron las mismas muestras que para el estudio de la inervación polineural y se analizaron las mismas réplicas que en el caso anterior. Los diferentes clústers de AChR fueron clasificados según su etapa de desarrollo en MS1, MS2, MS3 y MS4, de más inmaduro a más maduro (Figura 5). La Figura 8 muestra el porcentaje de AChR analizados correspondientes a cada subtipo.

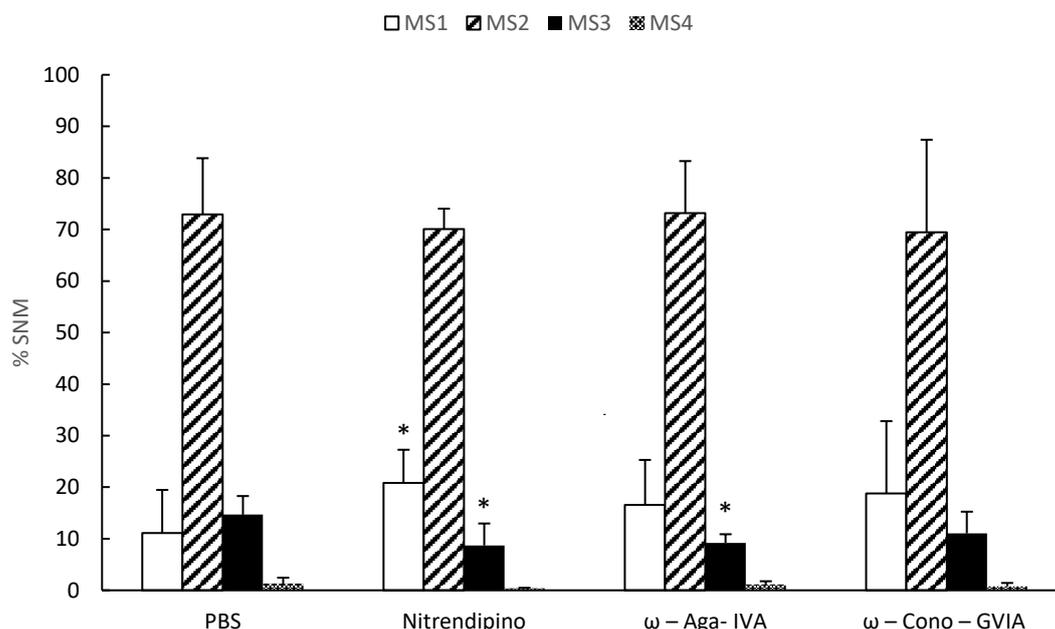


Figura 8: porcentajes de las diferentes etapas de desarrollo de los clústers AChR postsinápticos de músculos LAL P9 tratados *in vivo* con diferentes compuestos. El tratamiento con PBS representa la condición control; el tratamiento con Nitrendipino inhibe los canales de calcio L; el tratamiento con ω -Aga-IVA inhibe los canales de calcio P/Q; y el tratamiento con ω -Cono-GVIA inhibe los canales de calcio N. El criterio para la significancia estadística mediante el test Fisher respecto a la condición control fue * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ y *** para $p < 0.001$.

En la Figura 8 se aprecia un aumento significativo en el porcentaje de AChR en la etapa MS1 en los animales tratados con Nitrendipino (bloqueo del canal L), así como una disminución en el porcentaje de AChR en la etapa MS3 y MS4. Simultáneamente, en los individuos tratados con ω -Aga-IVA (bloqueo del canal P/Q) se observa una disminución significativo de MS3. El bloqueo del canal N no modifica la maduración de los AChR.

Estos resultados indican que existe una correspondencia entre la maduración del componente presináptico y el postsináptico. Podemos afirmar que el bloqueo de los canales L y P/Q incrementa el número de axones por sinapsis, lo que conlleva también a un retraso en la maduración postsináptica.

Además de los AChR, se ha visto que los receptores muscarínicos (mAChR), receptores de adenosina y el receptor TrKB (Nadal et al., 2016) están presentes en la SNM, organizan su estructura y tienen un papel relevante en la maduración del componente postsináptico. Los cambios observados en este experimento sobre el componente postsináptico pueden

ser debidos a los efectos farmacológicos producidos sobre los VDCC presinápticos, debido al efecto que estos ejercen sobre la eliminación axonal.

Por lo tanto, llegamos a la afirmación de que los VDCC presinápticos L y P/Q tienen un papel directo en el desarrollo de los clústers de AChR postsinápticos

Expresión de los diferentes VDCCs durante su desarrollo postnatal

Por otro lado, en este trabajo también se ha realizado el estudio de la expresión de los VDCC P/Q, N y L en adulto y durante el desarrollo neonatal, en el cual tiene lugar el proceso de eliminación sináptica de roedores. Se llevó a cabo gracias a la técnica de Western-blot. Para ello se utilizaron diafragmas de ratón C57BL y de rata *Sprague Dawley* a diferentes edades: en el caso del ratón se utilizaron individuos P5, P7, P9, P15 y P30 y en el caso de la rata individuos P5, P9, P15 y P30.

Por una parte, se ha creído conveniente utilizar dos modelos de animales diferentes para el estudio de la expresión debido a la afirmación realizada por (Nadal et al., 2016) según la cual no es igual el proceso de eliminación sináptica acontecido en la rata *Sprague Dawley* que en el ratón C57BL. El porcentaje de multiinervación disminuye más rápidamente en ratas que en ratones.

Por otra parte, el hecho de que se realice la inmunohistoquímica de los VDCC con el músculo LAL y en cambio se lleve a cabo el estudio de su expresión con el músculo diafragma se debe a que los dos músculos están formados por el mismo tipo de fibras musculares (Erzen et al., 2000), y la pequeña masa del músculo LAL impide la realización de Western-blot.

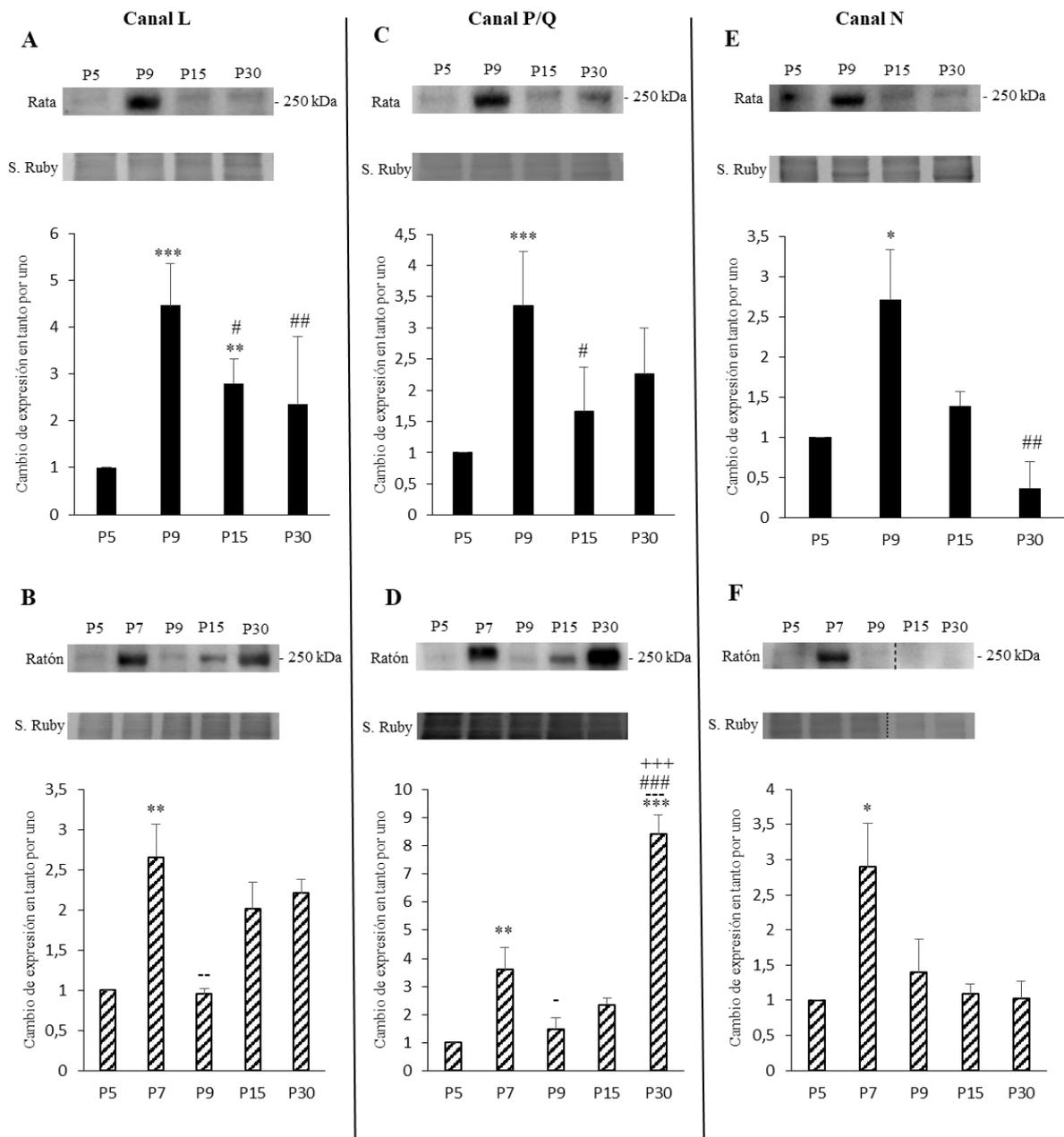


Figura 9: expresión de los canales de calcio L, P/Q y N en diafragma de individuos C57BL y *Sprague Dawley* a diferentes edades. Se realizaron tres réplicas para cada caso. Se muestran las bandas representativas del Western-blot y su cuantificación. Además, se muestra la banda Sypro Ruby, la cual hace referencia a la proteína total cargada en el carril. El criterio para la significancia estadística se realizó mediante el test de Fisher (* para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$). * diferencia significativa con respecto a P5; - diferencia significativa respecto a P7; # diferencia significativa respecto a P9; + diferencia significativa respecto a P15.

Durante la maduración postnatal diferentes VDCC coexisten en el terminal axonal. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos de los tres VDCC. Se realizó una cuantificación, tomando como referencia la marca proporcionada por la primera muestra P5 (tanto en ratones como en ratas), la cual se le asignó el valor 1.

Como podemos ver en la Figura 9, existen diferencias en el nivel de expresión de los diferentes VDCC durante el desarrollo neonatal y en el adulto:

Canal L

Tal y como se ha demostrado anteriormente gracias a la inmunohistoquímica cuantitativa, el canal L está involucrado en el proceso de eliminación sináptica. Tanto en ratón como en rata encontramos picos de expresión en edades tempranas del desarrollo neonatal (P7 y P9 respectivamente). Estos picos de expresión coinciden con una reducción considerable de la multiinervación en condiciones control. De hecho, entre P5 y P15 tiene lugar la pérdida del 50 % de las multiinervaciones aproximadamente. (Nadal et al. 2016). Por lo tanto, esta gran expresión del canal L en edades tempranas del desarrollo refuerza la afirmación de que este canal tiene un papel relevante en el proceso de desarrollo neonatal y de eliminación sináptica. Su expresión en adulto puede ser debido a su función en el reciclaje de las SVs promoviendo su endocitosis hacia las zonas activas (Perissinotti et al., 2008)

Canal P/Q

El canal P/Q es otro de los canales que ha demostrado mediante inmunohistoquímica cuantitativa estar involucrado en el proceso de eliminación sináptica. Tal y como ocurre con el canal L encontramos picos de expresión tanto en ratón como en rata en edades tempranas del desarrollo neonatal (P7 y P9 respectivamente). Además, en este caso encontramos un aumento de la expresión a P30. Esto podría deberse a que el canal de calcio P/Q juega un papel único en la liberación de ACh en individuos adultos, mientras que en la etapa fetal y en la etapa neonatal comparte esta función conjuntamente con el canal N (Urbano et al., 2008). Esto explicaría el aumento de la expresión del canal P/Q en etapas más maduras del desarrollo de la SNM.

Además, en la modulación de la neurotransmisión en la SNM está implicada la PKC presináptica. La liberación de ACh incrementa cuando la PKC está activa. Este efecto de la PKC depende de la entrada de calcio por el canal P/Q (Santafé et al., 2005). Podemos pues afirmar que la expresión del canal P/Q en edades tempranas del desarrollo refuerza la hipótesis de que este canal puede tener un papel relevante en el proceso de desarrollo neonatal y de eliminación sináptica, así como ser crucial en la neurotransmisión en etapas más maduras.

Canal N

Como se ha demostrado con anterioridad en la inmunohitoquímica cuantitativa, el canal de calcio N parece no estar involucrado en el proceso de la eliminación sináptica, ya que cuando se produce su inhibición el índice de inervación no varía. No obstante, en los resultados de Western-blot se observa un pico de expresión en edades tempranas del desarrollo neonatal (P7 en ratón y P9 en rata), disminuyendo significativamente en etapas más maduras del desarrollo. Esto podría deberse a que el canal N juega un papel en la liberación de ACh en etapas fetales y en la etapa neonatal temprana. Sin embargo, en el adulto esta función la realiza exclusivamente el canal P/Q (Urbano et al., 2008).

Expresión de las proteínas PKC ϵ y Munc18-1 durante el proceso de eliminación sináptica

PKC ϵ está localizada exclusivamente en el componente presináptico, lo que hace que esta proteína sea una candidata a regular el proceso de eliminación sináptica (Obis et al., 2015). Munc18-1 participa en la regulación de liberación de ACh al unirse estrechamente a la STX y evitar el ensamblaje del complejo SNARE (Cupertino et al., 2016). Su funcionalidad está determinada por su fosforilación a través de PKC ϵ (Simó et al., 2018). Por todo ello en este trabajo también se consideró necesario el estudio de la expresión mediante la técnica de Western-blot de la proteína PKC ϵ y la Munc18-1 durante el desarrollo neonatal y en adulto.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos de la expresión de PKC ϵ y Munc18-1. Del mismo modo que con los canales de calcio, se realizó una cuantificación, tomando como referencia la marca proporcionada por la primera muestra P5 (tanto en ratones como en ratas), la cual se le asignó el valor 1. Para este caso también se utilizaron muestras de diafragma de ratón C57BL y rata *Sprague Dawley* de diferentes edades.

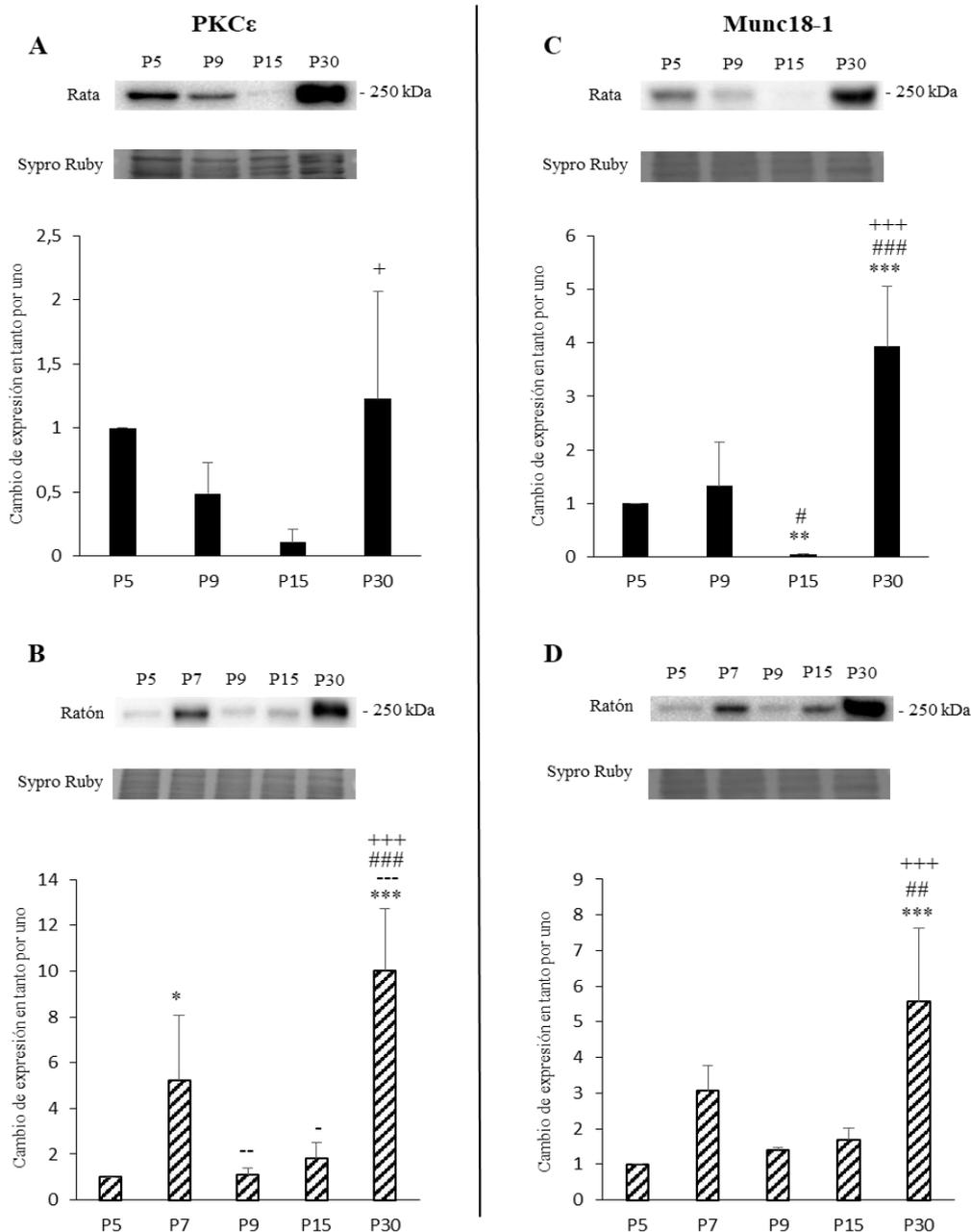


Figura 10: expresión de las proteínas PKC ϵ y Munc18-1 en diafragma de individuos C57BL y *Sprague Dawley* a diferentes edades. Se realizaron 6 réplicas para la PKC ϵ y 3 réplicas para la Munc18. Se muestran las bandas representativas del Western-blot y su cuantificación. Además, se muestra la banda Sypro Ruby, la cual hace referencia a la proteína total cargada en el carril. El criterio para la significancia estadística se realizó mediante el test de Fisher (* para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$). * diferencia significativa con respecto a P5; - diferencia significativa respecto a P7; # diferencia significativa respecto a P9; + diferencia significativa respecto a P15.

Como podemos observar en la Figura 10, la expresión de PKC ϵ y Munc18-1 es similar. Esto puede ser debido a que la PKC ϵ es capaz de promover la síntesis de Munc18-1 (Simó et al., 2018). Los picos máximos de expresión tanto de la proteína PKC ϵ como de la Munc18-1 tienen lugar en individuos P30. Esto se debe a que ambas proteínas juegan un papel clave en la neurotransmisión durante la etapa adulta (Obis et al., 2015).

Durante el periodo de desarrollo neonatal entre P5 y P15 de ratón, tanto la PKC ϵ como el Munc18-1 tienen una subida de expresión en P7. En el caso de la rata se observan niveles de expresión elevados tanto de PKC ϵ como en Munc18-1 en P5 y P9. Estos aumentos observados tanto en rata como en ratón de los niveles de expresión de PKC ϵ y Munc18-1 coinciden con el proseo de eliminación sináptica. Estos hechos llevan a pensar que las dos proteínas estudiadas serán claves en el proceso de desarrollo de la SNM y en el proceso de eliminación sináptica.

Santafe et al. 2009 mostró cómo un exceso de la entrada de calcio a través de los VDCC en el axón más débil produce la disminución de la liberación de ACh, lo que acaba incrementando la eliminación sináptica. En estudios posteriores se ha relacionado este hecho con un mecanismo de inhibición de la liberación de ACh basado en la cascada intracelular mAChR – PKC – VDCC (Tomàs et al., 2017). Se postula que la estimulación de los mAChR M1 y M4 produce la activación de la PKC mediante el aumento de DAG. Al mismo tiempo, la activación de PKC conlleva a la activación de los VDCC, produciéndose de esta manera el aumento del calcio intracelular del axón más débil y la consiguiente reducción de la liberación de ACh. Adicionalmente, estudios aún no publicados de la Unidad de Histología y Neurobiología han demostrado que el bloqueo de la isoforma PKC ϵ retrasa la eliminación axonal en animales P9. Así pues, con los experimentos aquí presentados junto con las evidencias anteriores podemos afirmar que el aumento de la expresión de PKC ϵ observado entre el periodo P5 y P9 es crucial para que se produzca el proceso de eliminación sináptica.

Por otra parte, la unión de la Munc18-1 a la STX del complejo SNARE impide la exocitosis de las SVs y, por consiguiente, la liberación del neurotransmisor ACh (Cupertino et al., 2016). Esto explicaría las variaciones de expresión observadas en las etapas más inmaduras del desarrollo, lo que producirían cambios en la fuerza sináptica entre los diferentes axones que compiten entre ellos y favorecería el proceso de eliminación sináptica. No obstante, este hecho no explica el pico máximo de expresión

acontecido en P30. Para poder entender mejor el papel de Munc18-1 en el desarrollo neonatal sería conveniente realizar un estudio complementario en el cual se analizara la expresión de pMunc18-1. La proteína Munc18-1 puede ser fosforilada por la PKC ϵ (Simó et al., 2018). Esto provoca su imposibilidad para unirse al complejo SNARE y por tanto se favorece la liberación de ACh. En el nuevo estudio se esperarían observar valores de expresión bajos de pMunc18-1 en edades tempranas del desarrollo neonatal, (lo que sería sinónimo de inhibición de la neurotransmisión); así como valores altos en la expresión en P30 (lo que compensaría el pico de expresión de Munc18-1 observado en este trabajo en individuos P30). Estudios preliminares de la Unidad de Histología y Neurobiología están confirmando expresiones más elevadas de pMunc18-1 en animales P30 que en edades tempranas (resultados no mostrados).

CONCLUSIONES

En este trabajo se han estudiado diversos aspectos del proceso de eliminación sináptica de roedores acontecido en los primeros días de vida. Por una parte, se ha estudiado la localización de los VDCC L, P/Q y N dentro de la SNM. Por otro lado, se ha comprobado la influencia directa de los VDCC en la eliminación sináptica mediante su inhibición con toxinas específicas. Además, se ha estudiado la expresión de los VDCC, así como de otras moléculas de la SNM como la PKC ϵ y la Munc18-1, durante el desarrollo neonatal.

Las conclusiones que se obtienen de los experimentos realizados son las siguientes:

- Los VDCC L, P/Q i L son presentes en la SNM en ratones P9. Se encuentran situados en el terminal axonal, es decir, en el componente presináptico.
- VDCC L y P/Q modulan el proceso de eliminación sináptica y promueven la desconexión axonal en ratones P9.
- VDCC N parece no estar involucrado en el proceso de eliminación sináptica en ratones P9. Su inhibición con ω -Cono-GVIA no modifica el número de axones.
- Los VDCC L, P/Q y N se expresan en el periodo neonatal y en el adulto tanto en rata como en ratón.
 - El canal L y el P/Q se expresan en edades claves del desarrollo de la SNM coincidiendo con el periodo de eliminación sináptica, por lo que parece que jueguen un papel importante durante esta etapa.
 - El canal N se expresa en edades tempranas del desarrollo neonatal por lo que estaría implicado en la liberación de ACh en la etapa neonatal temprana, pero no en la eliminación sináptica.
- PKC ϵ y Munc18-1 se expresan en el periodo neonatal y en el adulto tanto en rata como en ratón, expresándose en edades claves del desarrollo de la SNM y coincidiendo con el periodo de eliminación sináptica.
 - PKC ϵ activaría los VDCC lo que conllevaría a una aceleración de la eliminación sináptica.
 - Munc18-1 impediría la liberación de Ach y favorecería la eliminación de los axones más débiles actuando en el equilibrio de la fuerza sináptica.

BIBLIOGRAFÍA

- Buffelli, M., Busetto, G., Cangiano, L., and Cangiano, A. (2002). Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: Link with synapse elimination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 13200–13205.
- Cupertino, R. B., Kappel, D. B., Bandeira, C. E., Schuch, J. B., da Silva, B. S., Müller, D., Bau, C. H. D., and Mota, N. R. (2016). SNARE complex in developmental psychiatry: neurotransmitter exocytosis and beyond. *J. Neural Transm.* 123, 867–883.
- Darabid, H., St-Pierre-See, A., and Robitaille, R. (2018). Purinergic-Dependent Glial Regulation of Synaptic Plasticity of Competing Terminals and Synapse Elimination at the Neuromuscular Junction. *Cell Rep.* 25, 2070-2082.e6.
- Erzen, I., Cvetko, E., Obreza, S., and Angaut-Petit, D. (2000). Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: A convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J. Neurosci. Res.* 59, 692–697.
- Hirsch, N. P. (2007). Neuromuscular junction in health and disease. *Br. J. Anaesth.* 99, 132–138.
- Huang, K. P. (1990). Role of protein kinase C in cellular regulation. *BioFactors* 2, 171–178.
- Kaesler, P. S., and Regehr, W. G. (2017). The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr. Opin. Neurobiol.* 43, 63–70.
- Kano, M., Nakayama, H., Hashimoto, K., Kitamura, K., Sakimura, K., and Watanabe, M. (2013). Calcium-dependent regulation of climbing fibre synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Physiol.* 591, 3151–3158.
- Kisilevsky, A. E., and Zamponi, G. W. (2008). “Presynaptic Calcium Channels: Structure, Regulators, and Blockers,” in, 45–75.
- Legay, C., and Mei, L. (2017). Moving forward with the neuromuscular junction. *J. Neurochem.* 142, 59–63.
- Liu, W., and Chakkalakal, J. V (2018). “The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions,” in *Myogenesis in Development and Disease* (Elsevier Inc.), 99–124.
- Martyn, J. A. J., Fagerlund, M. J., and Eriksson, L. I. (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* 64, 1–9.
- Mochida, S. (2018). Presynaptic calcium channels. *Neurosci. Res.* 127, 33–44.
- Mochida, S. (2019). Presynaptic Calcium Channels. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2217.
- Nadal, L., Garcia, N., Hurtado, E., Simó, A., Tomàs, M., Lanuza, M. A., Santafé, M., and Tomàs, J. (2016). Presynaptic muscarinic acetylcholine autoreceptors (M1, M2 and M4 subtypes), adenosine receptors (A1 and A2A) and tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) modulate the developmental synapse elimination process at the

- neuromuscular junction. *Mol. Brain* 9, 67.
- Newton, A. C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, 395–402.
- Obis, T., Hurtado, E., Nadal, L., Tomàs, M., Priego, M., Simon, A., Garcia, N., Santafe, M. M., Lanuza, M. A., and Tomàs, J. (2015). The novel protein kinase C epsilon isoform modulates acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. *Mol. Brain* 8, 80.
- Perissinotti, P. P., Tropper, B. G., and Uchitel, O. D. (2008). L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1333–1344.
- Prado, M. A. M., Reis, R. A. M., Prado, V. F., de Mello, M. C., Gomez, M. V., and de Mello, F. G. (2002). Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem. Int.* 41, 291–299.
- Punga, A. R., and Ruegg, M. A. (2012). Signaling and aging at the neuromuscular synapse: lessons learnt from neuromuscular diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 340–346.
- Rogers, R. S., and Nishimune, H. (2017). The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biol.* 57–58, 86–105.
- Rotundo, R. L. (2003). Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* 32, 743–766.
- Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 389–442.
- Santafe, M. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Tomàs, M., Besalduch, N., and Tomàs, J. (2009). Presynaptic muscarinic receptors, calcium channels, and protein kinase C modulate the functional disconnection of weak inputs at polyinnervated neonatal neuromuscular synapses. *J. Neurosci. Res.* 87, 1195–1206.
- Santafé, M. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Uchitel, O. D., and Tomás, J. (2001). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience* 102, 697–708.
- Santafé, M. M., Lanuza, M. A., Garcia, N., and Tomàs, J. (2005). Calcium inflow-dependent protein kinase C activity is involved in the modulation of transmitter release in the neuromuscular junction of the adult rat. *Synapse* 57, 76–84.
- Simó, A., Just-Borràs, L., Cilleros-Mañé, V., Hurtado, E., Nadal, L., Tomàs, M., Garcia, N., Lanuza, M. A., and Tomàs, J. (2018). BDNF-TrkB Signaling Coupled to nPKC ϵ and cPKC β I Modulate the Phosphorylation of the Exocytotic Protein Munc18-1 During Synaptic Activity at the Neuromuscular Junction. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–21.
- Slater, C. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2183.
- Smith, I. W., Mikesch, M., Lee, Y. i., and Thompson, W. J. (2013). Terminal Schwann Cells Participate in the Competition Underlying Neuromuscular Synapse

- Elimination. *J. Neurosci.* 33, 17724–17736.
- Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645–653.
- Tomàs, J., Garcia, N., Lanuza, M. A., Santafé, M. M., Tomàs, M., Nadal, L., Hurtado, E., Simó, A., and Cilleros, V. (2017a). Presynaptic Membrane Receptors Modulate ACh Release, Axonal Competition and Synapse Elimination during Neuromuscular Junction Development. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–12.
- Tomàs, J. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Nadal, L., Tomàs, M., Hurtado, E., Simó, A., and Cilleros, V. (2017b). Membrane Receptor-Induced Changes of the Protein Kinases A and C Activity May Play a Leading Role in Promoting Developmental Synapse Elimination at the Neuromuscular Junction. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 255.
- Turney, S. G., and Lichtman, J. W. (2012). Reversing the Outcome of Synapse Elimination at Developing Neuromuscular Junctions In Vivo: Evidence for Synaptic Competition and Its Mechanism. *PLoS Biol.* 10, e1001352.
- Urbano, F. J., Pagani, M. R., and Uchitel, O. D. (2008). Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 201–202, 136–144.
- Urbano, F. J., Rosato-Siri, M. D., and Uchitel, O. D. (2002). Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions (Review). *Mol. Membr. Biol.* 19, 293–300.
- Wu, M. N., Littleton, J. T., Bhat, M. A., Prokop, A., and Bellen, H. J. (1998). ROP, the *Drosophila* Sec1 homolog, interacts with syntaxin and regulates neurotransmitter release in a dosage-dependent manner. *EMBO J.* 17, 127–139.
- Yampolsky, P., Pacifici, P. G., Lomb, L., Giese, G., Rudolf, R., Röder, I. V., and Witzemann, V. (2010). Time Lapse in Vivo Visualization of Developmental Stabilization of Synaptic Receptors at Neuromuscular Junctions. *J. Biol. Chem.* 285, 34589–34596.
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* 67, 821–870.
- Zhai, R. G., and Bellen, H. J. (2004). The Architecture of the Active Zone in the Presynaptic Nerve Terminal. *Physiology* 19, 262–270.
- Ziemiańska, K., Konopka, A., and Wilczyński, G. M. (2012). The role of extracellular proteolysis in synaptic plasticity of the central nervous system. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 66, 959–975.
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., and Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 338–349.

AUTOEVALUACIÓN

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Histología y Neurobiología de la Universidad Rovira i Virgili. Mi estancia en este laboratorio ha supuesto un paso muy importante hacia mi carrera profesional y me ha permitido poder conocer de cerca el mundo de la investigación. Ahora puedo llegar a comprender el esfuerzo impagable que realiza toda la gente dedicada a la investigación científica. Asimismo, este proyecto me ha abierto las puertas del increíble mundo de la neurociencia.

Por otra parte, este trabajo me ha permitido conocer profundamente técnicas de gran relevancia como son la inmunohistoquímica, el Western-blot y el microscopio confocal. Además, he aprendido a analizar los diferentes resultados obtenidos en el laboratorio, así como a discutirlos de una forma científica.

En conclusión, mi paso por la Unidad de Histología y Neurobiología y la realización de este trabajo me han brindado la oportunidad de poder evolucionar y mejorar como futuro biotecnólogo.