

Universitat Rovira i Virgili
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Unitat d'Histologia i Neurobiologia

***Participació dels receptors muscarínics presinàptics
(mAChRs) en l'eliminació de les connexions
sinàptiques redundants durant el desenvolupament
neuromuscular.***

Maria Isabel Saló Cabré

Tesi Doctoral

Novembre 2003

***Participació dels receptors muscarínics presinàptics
(mAChRs) en l'eliminació de les connexions
sinàptiques redundants durant el desenvolupament
neuromuscular.***

Maria Isabel Saló Cabré

Dr. Manel Santafé Martínez
Professor Titular d'Universitat
Dpt. Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat d'Histologia i Neurobiologia

Dr. Josep M. Tomàs Ferré
Catedràtic d'Universitat
Dpt. Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat d'Histologia i Neurobiologia

FAN CONSTAR:

Que la Tesi Doctoral titulada *“Participació dels receptors muscarínics presinàptics (mAChRs) en l’eliminació de les connexions sinàptiques redundants durant el desenvolupament neuromuscular”*, presentada per Maria Isabel Saló Cabré ha estat realitzada sota la nostra direcció a la Unitat d'Histologia i Neurobiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili i reuneix tots els requeriments necessaris per a la seva tramitació, presentació i posterior defensa davant del tribunal corresponent amb la finalitat d'optar al grau de DOCTOR.

Reus, 18 de Novembre de 2003.

Dr. Manel Santafé Martínez

Dr. Josep M. Tomàs Ferré



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Departament Medicina i Cirurgia
C. Sant Llorenç, 21
43201 Reus, Tarragona
Tel. (977) 759305
Fax.(977) 759322

Dra. Josepa Canals Sans, professora titular de Psicopatologia Infantil de la Facultat de Ciències de l'Educació i Psicologia, tutora d'aquesta tesi doctoral

FAIG CONSTAR:

Que la doctoranda M. Isabel Saló Cabré, ha treballat sota la direcció del Dr **Manel Santafé Martínez** i del Dr. **Josep M. Tomàs Ferré** la tesi doctoral titulada: "**Participació dels receptors muscarínics presinàptics (mAChRs) en l'eliminació de les connexions sinàptiques redundants durant el desenvolupament neuromuscular**", i que pot ser presentada davant el tribunal corresponent per a l'obtenció del grau de Doctor.

Dra. Josepa Canals Sans

Reus, Novembre de 2003.

Aquesta tesi ha estat realitzada a la Unitat d'Histologia i Neurobiologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili, sota la codirecció del Dr. Manel Santafé Martínez i del Dr. Josep M. Tomàs Ferré.

AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta tesi ha estat possible gràcies a la dedicació, l'ajut i el suport de moltes persones que han estat convivint amb mi des de que va començar aquest repte. A totes elles vull agrair el fet de que aquest hagi estat possible.

Al Prof. Josep M. Tomàs, director d'aquesta tesi, per haver-me donat la possibilitat d'aprendre i formar-me a la Unitat d'Histologia, i per haver confiat en mi des d'un inici.

Al Dr. Manel Santafé per dirigir aquesta tesi, per haver-me ensenyat tot el que sé sobre les tècniques de registre electrofisiològic, i en definitiva per haver-me guiat fins aquí.

A la Dra. M. Angel Lanuza per cedir-me els seus coneixements de neurobiologia, per ser part implicada en la realització d'aquest treball i per descomptat, pel gran suport mostrat.

A la Dra. Neus Garcia per totes les ensenyances referents a la tècnica d'immunohistoquímica, per tots els bons consells donats desinteressadament i també pels bons moments.

A les meves companyes Carmen M. González i M. Mar Sabaté per tot aquest temps compartit, per escoltar, aconsellar, i per fer que la feina hagi estat també divertida.

Al Dr. Nicolau Ortiz, per oferir els seus coneixements sobre l'interessant món de les malalties neuromusculars.

A tota la Unitat d' Histologia i Neurobiologia per haver-me acollit durant tot aquest temps.

Al suport tècnic obtingut per part d'Amparo Aguilar, Esperanza Chernichero i Juan Valencia.

A tots aquells companys i amics que en algun moment o altre m'han fet sentir bé, Carme, Mar, Renata, Carme Sanmartí, Marga, Griselda, Maria, Marta, Miquel, Montse, Xavi, Lara, Ana, Vicky,...

A la meva família i en especial al Josep, per ser seguidors incondicionals d'aquesta història.

A la beca de recerca URV concedida per la Universitat Rovira i Virgili.

A tots aquells que de manera directa o indirecta han contribuït en la realització d'aquesta tesi.

ÍNDEX

Llistat d'abreviatures	v
Índex de figures i taula	vii
I. INTRODUCCIÓ	1
I.1.- Estructura de la sinapsi neuromuscular	2
I.1.1.- L'element presinàptic	3
I.1.2.- L'element postsinàptic	5
I.1.3.- L'espai sinàptic o fenedura sinàptica	9
I.2.- Funció de la sinapsi neuromuscular	10
I.2.1.- Desplaçament del potencial d'acció	10
I.2.2.- Neurotransmissió: alliberació de l'ACh	12
I.2.3.- Neurotransmissió: participació postsinàptica	15
I.3.- Eliminació de sinapsis redundants (o supernumeràries) en el desenvolupament postnatal	16
I.3.1.- Participació axonal en l'eliminació de connexions sinàptiques	17
I.3.2.- Participació postsinàptica en l'eliminació de connexions sinàptiques	19
I.3.3.- Canals de calci implicats en el desenvolupament sinàptic postnatal i en el procés d'eliminació	22
I.4.- Receptors muscarínics presinàptics (mAChRs).....	27
II. HIPOTESIS I OBJECTIUS	31
II.1.- Hipòtesis	32
II.2.- Objectius	32
II.2.1.- Objectiu general	32
II.2.2.- Objectius específics	32

III. MATERIAL I MÈTODES	34
III.1.- Característiques de l'animal	35
III.2.- Model muscular	36
III.3.- Generalitats sobre l'obtenció de la mostra	38
III.4.- Tècnica electrofisiològica	39
III.4.1. Equip d'electrofisiologia bàsic	39
III.4.2. Registre de l'activitat sinàptica	41
III.4.2.1. Registre de l'activitat sinàptica evocada.....	41
III.4.2.1.a. Unions neuromusculars adultes	41
III.4.2.1.b. Unions neuromusculars nounats.....	44
III.4.2.2. Registre de l'activitat sinàptica espontània.....	49
III.4.2.2.a. Unions neuromusculars adultes	51
III.4.2.2.b. Unions neuromusculars nounats.....	51
III.5.- Solucions utilitzades	53
III.6.- Anàlisi estadístic	57
IV. RESULTATS	58
IV.1- Unions neuromusculars adultes.....	59
IV.1.1- Estudi de l'efecte dels agents muscarínics en l'alliberació evocada d'ACh en les unions neuromusculars adultes.....	59
IV.1.2- Rol dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh de les unions neuromusculars de rates adultes.....	65
IV.2- Unions neuromusculars nounats.....	70
IV.2.1- Sinapsis monoïnnervades.....	70
IV.2.1.1- Estudi de l'efecte dels agents muscarínics antagonistes en l'alliberació evocada d'ACh en les unions neuromusculars monoïnnervades.....	70
IV.2.1.2- Rol dels canals de calci depenents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació	

d'ACh de unions neuromusculars monoinnervades de rates nounats.....	76
IV.2.2-Sinapsis dobles.....	80
VI.2.2.a.L'EPP gran de les unions duals.....	81
V.2.2.a.1- Efecte dels agents muscarínics antagonistes en l'alliberació d'ACh en l'EPP gran de les unions duals.....	81
IV.2.2.a.2- Rol dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh en l'EPP gran de les unions duals.....	85
VI.2.2.b. L'EPP petit de les unions duals.....	88
IV.2.2.b.1- Efecte dels agents muscarínics antagonistes en l'alliberació d'ACh en l'EPP petit de les unions duals.....	88
IV.2.2.b.2- Rol dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh en l'EPP petit de les unions duals.....	92
V. DISCUSSIÓ.....	97
V.1- mAChRs en la unió neuromuscular de la rata adulta.....	98
V.1.1- Implicació dels canals de calci dependents de voltatge en la funció dels mAChRs en l'adult.....	103
V.2- mAChRs en la unió neuromuscular del nadó de rata.....	106
V.2.1- Sinapsis monoinnervades.....	106
V.2.1.1- Implicació dels canals de calci dependents de voltatge en la funció dels mAChRs.....	108
V.2.2- Sinapsis doblement innervades.....	110
V.2.2.1- Implicació dels canals de calci dependents de voltatge en la funció dels mAChRs.....	117

VI. CONCLUSIONS	126
VI.1. Unions neuromusculars adultes.....	127
VI.2. Unions neuromusculars nounats.....	128
VI.2.1. Unions neuromusculars monoinnervades.....	128
VI.2.2. Unions neuromusculars doblement innervades.....	129
VI.2.2.a. EPP gran.....	129
VI.2.2.b. EPP petit.....	130
VII. BIBLIOGRAFIA	131
VIII. ANNEX	146

ABREVIATURES

4- DAMP:	1,1- dimethyl - 4 -diphenylacetoxy - piperidinium iodide
ACh:	acetilcolina
AChR:	receptor de l'acetilcolina
AChE:	acetilcolinesterasa
CAT:	colina acetil transferasa
DMSO:	dimetilsulfòxid
EPP:	potencial de placa postsinàptic evocat
PLC:	fosfolipasa C
LAL:	Levator Auris Longus
M1:	receptor muscarínic tipus 1
M2:	receptor muscarínic tipus 2
M3:	receptor muscarínic tipus 3
M4:	receptor muscarínic tipus 4
M5:	receptor muscarínic tipus 5
mAChRs:	receptors muscarínics de l'acetilcolina
MEPP:	potencial de placa en miniatura
MT-3:	Toxina muscarínica 3
MT-7:	Toxina muscarínica 7
nAChRs:	receptors nicotínics de l'acetilcolina
PLC:	Fosfolipasa C
PG:	proteïna G
S.E.M:	error estàndard mig

VDCC:	canals de calci dependents de voltatge
Vc:	amplada mitjana per fibra
Vm:	potencial de membrana
ω -Aga -IVA:	ω -Agatoxina IVA
ω -CgTx -GVIA:	ω -Conotoxina GVIA

INDEX DE FIGURES I TAULA

Figura 1. Sinapsi Neuromuscular	6
Figura 2. Levator auris longus	37
Figura 3. Equip d'electrofisiologia intracel·lular	40
Figura 4. Exemple del reclutament de diferents EPPs per increment de l'estímul elèctric en sinapsis multiinnervades	46
Figura 5. Valoració de l'amplada dels EPPs	46
Figura 6. Relació dosi-resposta dels antagonistes muscarínics amb l'alliberació espontània del neurotransmissor	50
Figura 7. Efecte dels antagonistes muscarínics selectius en l'alliberament del neurotransmissor en nadons	52
Figura 8. Relació dosi-resposta del DMSO en la neurotransmissió espontània	56
Figura 9. Efecte dels agents muscarínics en l'alliberament del neurotransmissor en animals adults	60
Figura 10. Curs temporal de l'efecte dels agents muscarínics en l'amplada dels EPPs d'animals adults	63
Figura 11. Efecte dels antagonistes M1 i M2 en EPPs adults quan el canal de calci tipus P és blocat	66
Figura 12. Efectes dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada de l'EPP en unions monoinnervades	72

Figura 13. Efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina en els EPPs de unions monoinnervades quan un VDCC és blocat	77
Figura 14. Imatge representativa de les unions neuromusculars doblement innervades en múscul LAL de nadó de rata (P6).....	80
Figura 15. Efecte dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPPs, en els EPP gran de les unions doblement innervades	81
Figura 16. Efectes dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPP en l'EPP gran i l'EPP petit de les sinapsis doblement innervades	82
Figura 17. Exemples de l'acció dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPP en l'EPP gran i l'EPP petit de les sinapsis doblement innervades	83
Figura 18. Efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina en la amplada de l' EPP gran de les unions doblement innervades quan un VDCC és blocat	86
Figura 19. Efecte dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPPs, en els EPP petit de les unions doblement innervades	88
Figura 20. Acció dels antagonistes selectius pel receptor M4, Tropicamida i MT-3, en EPPs d' unions neuromusculars mono i doblement innervades.....	90

Figura 21. Efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina en la amplada de l'EPP petit d'unions doblement innervades quan un VDCC és blocat	93
Figura 22. Efecte de la Tropicamida en l'EPP petit en unions doblement innervades quan un VDCC és blocat	95
Figura 23. Model proposat per la modulació de l'alliberament del neurotransmissor a través dels mAChRs i les seves connexions amb els VDCCs en unions neuromusculars de nadons i adults	122
Taula 1. Plaques mono i doblement innervades: dades electrofisiològiques	48

I. INTRODUCCIÓ

I.1. ESTRUCTURA DE LA SINAPSI NEUROMUSCULAR

Gran part de l'evidència que ha contribuït al coneixement actual de la transmissió en les sinapsis químiques ha estat obtinguda d'experiments realitzats sobre les unions neuromusculars, és a dir, sinapsis entre les neurones motores espinals i les cèl·lules del múscul esquelètic.

La sinapsi neuromuscular és una sinapsi nicotínica colinèrgica ideal per l'estudi d'alguns aspectes de l'estructura i funció sinàptica. Té una mida relativament gran i és de fàcil accessibilitat a causa de la seva localització perifèrica, el que ha facilitat la realització d'estudis electrofisiològics i altres manipulacions experimentals, i ha servit de sinapsi prototip en investigacions neurobiològiques durant molts anys proveint encara avui d'un model general per l'organització sinàptica amb el qual poden ser comparades altres sinapsis.

En una sinapsi neuromuscular un impuls elèctric que circula per l'axó es converteix en contracció mecànica per part del múscul. Totes les estructures que veurem van dirigides a que aquest fenomen sigui possible. Tenim 3 elements bàsics:

- La terminació nerviosa, que és depenent de la motoneurona, forma *l'element presinàptic*.
- La membrana receptora, que depèn del múscul, forma *l'element postsinàptic*.
- L'espai intercel·lular, entre la terminació nerviosa i la membrana receptora, forma la *fenestra sinàptica*.

I.1.1. L'element presinàptic

La terminació nerviosa sinàptica, com el seu nom indica és el darrer extrem de l'axó. La terminació sinàptica té els mateixos components de l'axó, això li permet un cert grau d'autonomia el qual necessita a causa de la llunyania del seu proveïdor. La porció terminal dels axons mostra una estructura típica on a més de cisternes de reticle endoplasmàtic llis, microtúbuls, neurofilaments i mitocòndries coexisteixen nombroses vesícules sinàptiques, petites esferes amb centre clar i coberta membranosa que medeixen aproximadament de 40 a 60 nm de diàmetre, i que contenen el neurotransmissor Acetilcolina (ACh), que és un agent químic que actua com a missatger i és el responsable de la transmissió de l'impuls nerviós a través de les sinapsis. A més d'aquestes vesícules sinàptiques també n'existeixen altres tipus com les vesícules cobertes o amb coberta, semblants a les vesícules sinàptiques però recobertes d'una membrana electró-densa i encaixades dins de partícules poligonals petites de la proteïna clatrina (Schmid i cols., 1984), són les responsables del reciclament de membrana de l'axó. També existeixen les vesícules de centre electró-dens, de 70 nm de diàmetre que són les més minoritàries i han estat relacionades amb la inducció a la membrana postsinàptica de la síntesi de proteïnes relacionades amb la neurotransmissió (Pécot-Dechavassine i Brouard, 1993).

Les vesícules sinàptiques es disposen en doble filera al llarg d'unes especialitzacions transversals i electró-denses de la membrana axonal, oposadament a la fenedura sinàptica secundària, anomenades zones actives

que són els punts d'alliberació del neurotransmissor (Couteaux i Pécot-Dechavassine, 1970; Pepper i cols., 1974). Són riques en canals iònics, principalment en canals de Ca^{2+} dependents de voltage (VDCC) del tipus P/Q. Les vesícules estan adherides a uns filaments del tipus actomiosínic i aquests filaments estan subjectats a nivell de la zona activa; quan entra Ca^{2+} al terminal s'activen els filaments actomiosínics facilitant l'alliberació de l' ACh a través de la zona activa. Amb tècniques de criofractura es poden veure les protrusions que fan les vesícules sobre la membrana a nivell d'aquestes zones actives, depressions que correspondrien a la fusió de les vesícules amb la membrana presinàptica per a l' alliberació de l' ACh (Heuser i cols., 1974). Els diferents tipus de vesícules contenen proteïnes especials en les seves parets que col·laboren en l'adhesió de la membrana de les vesícules sinàptiques amb la membrana de les zones actives i que també faciliten l'exocitosi, descàrrega dels seus continguts a la fenedura sinàptica mitjançant sinaptoporus (Heuser i Resse, 1973; Heuser, 1989a; Heuser, 1989b). Amb experiments electrofisiològics es va veure que el neurotransmissor era alliberat del terminal nerviós en petits paquets, o quantes: cada vesícula conté un quanta (nombre determinat i exacte de molècules d' ACh) . S'ha calculat que un quanta conté aproximadament de 10.000 a 100.000 molècules d' ACh segons el model experimental emprat (Kuffler i Yoshikami, 1975; Kandel i Siegelbaum, 1991).

A nivell del terminal nerviós, la beina de mielina deixa d'envoltar l'axó per tornar-se una làmina plana que cobreix la terminació, tancant-la (Robertson, 1960; figura 1).

I.1.2. L'element postsinàptic

La fibra muscular esquelètica té forma gairebé cilíndrica, però per a rebre els seus nervis es fa més aplanada. La regió de la fibra muscular sota aquests nervis s'anomena placa motora, pot ocupar un terç de la circumferència de la fibra i normalment està situada centralment, és on l'axó presinàptic elabora les seves terminacions. La membrana citoplasmàtica de la fibra muscular fa una invaginació, el plec sinàptic primari, que ressegueix tota l'arborització de l'axó. Aquestes arboritzacions axonals són diferents segons l'espècie, en els mamífers són curtes i poc nombroses al contrari que en els amfibis i peixos on són espectacularment llargues i ramificades, i poden variar la seva morfologia segons l'edat, activitat muscular i factors ambientals (figura 1).

Recobrint rigorosament tota la superfície muscular hi ha una substància glicoproteica i amorfa anomenada làmina basal. Aquesta làmina basal té un paper important en la redistribució del receptor per l'acetilcolina (AChR; Anderson i Fambrough, 1983).

Del plec sinàptic primari surten altres invaginacions, els plecs sinàptics secundaris, radial i perpendicularment, paral·lels entre ells que penetren dins el miòcit aproximadament 1 micròmetre. En el seu interior també es pot observar la làmina basal.

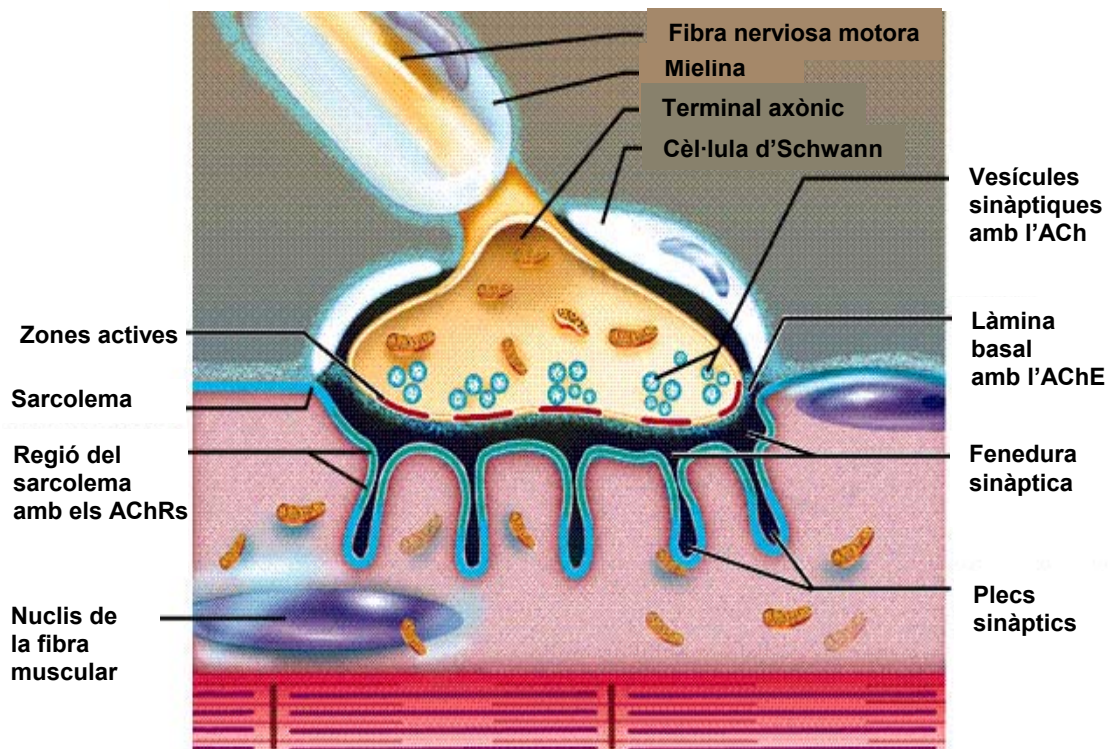


Figura 1. Sinapsi Neuromuscular.

Esquema de la ultraestructura d'una sinapsi neuromuscular. Font: Kenneth S. Saladin. 1998.

Els plecs sinàptics secundaris coincideixen o tenen el seu equivalent a les zones actives de la membrana presinàptica. Amb aquestes invaginacions secundàries s'aconsegueix més superfície activa i en conseqüència major efectivitat i rapidesa (Salpeter, 1987).

Per sota de la placa, en el citoplasma subsinàptic no trobem les miofibrilles i miofilaments que caracteritzen al miòcit però sí que observem mitocondris, abundants polirribosomes lliures, cisternes de reticle endoplasmàtic rugós i alguns nuclis disposats arbitràriament, però relativament concentrats en aquesta àrea, els nuclis sinàptics.

Fent criofractura de la membrana postsinàptica es veuran unes

partícules, a nivell sobretot dels plecs sinàptics secundaris, que són els receptors nicotínics de l'acetilcolina (AChR; Heuser i cols., 1974; Porter i Bernard, 1975). Són complexes proteics grans consistents en 5 subunitats disposades al voltant d'un porus central (2α , β , ϵ , δ) amb un domini extracel·lular que s'uneix a l'ACh i un domini d'expansió intracel·lular que forma el canal iònic. Aquestes proteïnes donen origen a senyals elèctriques mitjançant l'obertura o tancament de canals iònics en la membrana postsinàptica, la fixació del neurotransmissor ACh als receptors obre canals iònics a la membrana de la fibra muscular, és a dir, són canals iònics activables pel neurotransmissor ACh, n'hi ha aproximadament 10.000 per μm^2 en la membrana (Heuser i Salpeter, 1979). Cada receptor té dos llocs d'unió per l'ACh, la densitat dels llocs d'unió és d'aproximadament 20.000 per μm^2 . La concentració màxima de receptors (10.000 per micròmetre quadrat) es troba a nivell de la porció superficial dels plecs sinàptics secundaris, és a dir, a les crestes; al fons de la fenedura la concentració és més petita (5 per micròmetre quadrat; Fambrough, 1974; Barnard i cols, 1975). Els receptors tenen una forma circular i en el seu centre és on es fixa l'ACh, s'obren en profunditat, tenen forma d'embut, i es continuen amb un canal iònic (de 0.7 nm de diàmetre) per l'entrada de sodi i calci i sortida de potassi el que desencadena la despolarització de la membrana postsinàptica.

A més d'aquests receptors en trobem un altre tipus, els receptors muscarínics d'ACh (mAChR) que no tenen canals iònics en la seva estructura però afecten els canals per mitjà de l'activació de molècules intermèdies anomenades proteïnes G. Els mAChRs són proteïnes monomèriques amb un

domini extracel·lular que conté un lloc de fixació del neurotransmissor i un domini intracel·lular que s'uneix a les proteïnes G. Aquests receptors muscarínics són d'activació lenta el que fa que necessitin la fixació de múltiples proteïnes seqüencialment entre si per produir la resposta fisiològica final. Proteïnes efectores a les que s'acoblen aquests receptors són l'adenililciclasa i la fosfolipasa C les quals generen segons missatgers intracel·lulars que fan cascades complexes de senyalament bioquímic. De mAChRs en trobem a nivell de la membrana postsinàptica i també a la membrana presinàptica del terminal axònic on realitzen funcions d'autoreceptors.

A la làmina basal que va a través dels plecs primaris i secundaris hi ha l'enzim que hidrolitza l' ACh i finalitza la neurotransmissió, l'acetilcolinesterasa (AChE), el que evita la persistència indefinida de l'acció de l' ACh. Aquest enzim té un origen neuronal, és transportat des del soma de la motoneurona fins al terminal nerviós per flux axoplàsmic, i és alliberat des de la terminació per ser fixat a la làmina basal (Oh i Markelonis, 1978). En el moment que l' AChE s'incorpora a la làmina basal passa a dependre del control de la cèl·lula postsinàptica (Linkhart i Wilson, 1975; Rubin i cols., 1980). Barnard i col·laboradors (1975) han trobat que hi ha aproximadament 3.000 molècules d' AChE per μm^2 en les membranes basals de plaques motores de ratolí.

La fibra muscular és doncs el suport de la placa motora. En general trobem una sinapsi per fibra, però també es poden trobar fibres poliinnervades (on hi ha més d'una sinapsi per fibra) en determinades situacions, com en el desenvolupament i la regeneració neuromuscular.

El nombre de fibres musculars que innerva una motoneurona formen una unitat motora.

I.1.3. L'espai sinàptic o fenedura sinàptica

És l'espai intercel·lular entre la terminació nerviosa i la fibra muscular. Aquest espai es considera que té unes dimensions de 45-50 nm de mitjana en les sinapsis químiques com la neuromuscular. Aquest espai està limitat per la membrana presinàptica per sobre, els plecs primaris i secundaris com a base i precintat per les cèl·lules de Schwann per la perifèria.

Té la peculiaritat de ser un bon difusor de l' ACh alliberada des del terminal nerviós en un temps rècord de 50 microsegons (Katz i Miledi, 1965; Hubbard i cols., 1968; Hubbard, 1970; Baker, 1972).

I.2. FUNCIÓ DE LA SINAPSI NEUROMUSCULAR

Els terminals nerviosos són regions altament especialitzades de la motoneurona. En una neurona motora un potencial d'acció originat en la medulla espinal es propaga cap a la regió terminal on posa en moviment una cadena d'esdeveniments donant com a resultat un increment de l'alliberament del neurotransmissor Acetilcolina (ACh). El total d' ACh alliberada normalment, és suficient per generar un potencial de placa postsinàptic (EPP) i en conseqüència, un potencial d'acció en la fibra muscular, i una contracció muscular.

I.2.1. Desplaçament del potencial d'acció

En un axó en repòs, tenim una concentració intracel·lular predominant de potassi (K^+) i una d'extracel·lular de sodi (Na^+) i clor (Cl^-) que dona un potencial elèctric de repòs (aproximadament -80 mV en els miòcits adults normals de mamífer). El K^+ té tendència a sortir, deixant l'interior negatiu prop del potencial d'equilibri d'aquest ió. El mateix passa amb el Na^+ , que va entrant mentre surt el K^+ per compensar càrregues. Evidentment, això s'acabaria aviat si no fos per una bomba Na^+/K^+ de membrana que fa que surti Na^+ i entri K^+ , retornant cada ió al seu lloc. Així en l'interior de l'axó hi ha predomini de càrregues negatives i en la seva superfície externa de positives, separades per una membrana permeable a aquests ions.

L'impuls generat a nivell de l'inici de l'axó va avançant en direcció

centrífuga invertint el potencial (potencial d'acció) ja que produeix canvis en la permeabilitat de la membrana a favor de l'ió Na^+ primer, que entren fins crear un predomini de càrregues positives intracel·lulars, fenomen anomenat despolarització, i després a favor de K^+ que surt fins a deixar de nou un interior negatiu, fenomen anomenat repolarització. La superfície de l'axó torna a estar en repòs però els ions no estan al seu lloc. En aquest moment si arribés un nou impuls aquesta àrea no estaria preparada per a conduir-lo, és el període refractari. Aquesta situació es manté fins que les bombes de Na^+ / K^+ retornen al seu lloc originari aquests ions. Aquest impuls despolaritzant recorre successivament àrea rere àrea de la membrana axònica fins arribar a la terminació.

En total s'ha produït un important trasbals d'ions, es calcula que per un axó d'1 μm d'amplada la relació del nombre d'ions K^+ intercanviats per Na^+ és de 1/3.000 (Kuffler i Nicholls, 1982). Per tornar tots els ions al seu lloc hi haurà un important consum d'energia. Un nervi de conducció ràpida (100 m/s) no podria mantenir gaires impulsos seguits ja que s'esgotaria ràpidament. Per suplir això tenim les beines de mielina (de gran resistència elèctrica i per tant aïllants, les quals acceleren molt la conducció del potencial d'acció podent conduir a una velocitat de 150 m/s) amb els seus nòduls de Ranvier que permeten l'intercanvi iònic reduït a aquestes àrees, de manera que la conducció és saltatòria de nòdul a nòdul (Huxley i Stampfli, 1949; Tasaki, 1959) fent-la més ràpida i "econòmica" ja que s'hauran de treure menys ions de Na^+ a l'exterior.

I.2.2. Neurotransmissió: alliberació de l' ACh

El rol de l' ACh és actuar com a intermediari químic en la transferència de l'excitació o impuls nerviós del nervi al múscul. La necessitat d'aquest intermediari és clara, serveix per amplificar el petit impuls en la terminació motora nerviosa i convertir-lo en suficientment gran per disparar un impuls o potencial d'acció en la fibra muscular.

L' ACh és sintetitzada en el terminal nerviós mitjançant l'acetilació de la colina, per un enzim la colina acetiltransferasa (CAT), localitzat en el terminal axònic on ha viatjat des del soma neuronal (Jablecki i Brimijoin, 1974), i emmagatzemada dins de les vesícules sinàptiques per a la seva posterior alliberació.

L' ACh és alliberada de les vesícules sinàptiques mitjançant la transmissió del potencial d'acció en les branques distals del nervi motor. Mitjançant un microelèctrode extracel·lular posicionat en el terminal axònic, Katz i Miledi (1965) van enregistrar el potencial propagat d'un impuls nerviós viatjant fins a la sinapsi. Quan l'impuls envaeix el terminal, despolaritza la membrana obrint els canals Na^+ . Aquesta despolarització activa canals Ca^{2+} depenents de voltatge (VDCC). El potencial d'acció és idèntic a nivell de la terminació però aquí és significativa l'entrada de Ca^{2+} . Aquest catió gairebé no intervé en el canvi de polaritat elèctrica però és el responsable de l'alliberament de l' ACh; l'entrada de Ca^{2+} al terminal és, doncs, essencial per l'alliberació de l' ACh (Katz i Miledi, 1965; Miledi, 1973). Si ometem el Ca^{2+} de la solució de bany o si augmentem la concentració de Mg^{2+} (que competeix amb el calci per entrar

en la terminació axonal) la neurotransmissió sinàptica quedarà molt pertorbada, quasi serà inexistent.

A l'entrar Ca^{2+} al terminal les vesícules sinàptiques, a nivell de les zones actives, fusionen les seves membranes amb la membrana axoplàsmica o axolema, deixant l' ACh lliure al líquid de la fenedura. Aquest procés és reafirmat pel fet que, després d'una estimulació nerviosa queda reduït el nombre de vesícules a la terminació (Heuser i Reese, 1973; Birks, 1974), a més, s'han visualitzat les vesícules al moment de la suposada alliberació amb tècniques de criofractura (Heuser i cols, 1974).

En condicions de repòs, hi ha una alliberació contínua i a l'atzar d' ACh, el que produeix petites despolaritzacions en la membrana de la fibra muscular. Aquestes despolaritzacions són referides com potencials de placa en miniatura (MEPP) per Fatt i Katz (1952). Els MEPPs tenen menys d' 1 mV d'amplitud i cada MEPP correspon a l'alliberació d'una vesícula sinàptica la qual conté un quanta d'ACh. Després d'un impuls nerviós es pot observar un potencial de placa evocat (EPP) que es el resultat del sumatori de molts MEPPs és a dir, moltes vesícules sinàptiques alliberades alhora. En cada unió neuromuscular, són buidades de 20 a 300 vesícules sinàptiques després d'un únic impuls nerviós. Això es pot calcular fent una comparació entre l'amplitud dels MEPPs i els EPPs (Hubbard i cols., 1969). La quantitat de quantes d' ACh alliberats durant un episodi de potencial de placa evocat (EPP) es el que defineix el contingut quàntic.

El temps transcorregut entre l'excitació del nervi i la subseqüent aparició en el múscul d'un EPP es deu a l'alliberació del neurotransmissor mediada pel

Ca^{2+} . En la sinapsi neuromuscular de mamífer aquest temps és d'aproximadament 0.2 ms (Eccles i Liley, 1959; Hubbard i Schmidt, 1963). La descàrrega d' ACh va seguida d'un període de facilitació. Experiments realitzats amb estímuls dobles i triples han demostrat que durant els primers 100 ms que segueixen a un impuls el terminal axònic es troba en un estat d'hiperexcitabilitat. D'aquesta manera, de 30 a 100 vesícules d' ACh seran buidades i el neurotransmissor que resti serà més capaç d'alliberar-se en un segon impuls. Aquesta facilitació és causada principalment pel Ca^{2+} residual que queda en el terminal després del primer impuls, aquest Ca^{2+} és sumat a aquell admès pel segon impuls, per resultar en una concentració intracel·lular més gran de Ca^{2+} i augmentar l'alliberació del neurotransmissor (Katz i Miledi, 1968). El període de facilitació ve seguit d'un període de depressió de la transmissió sinàptica, el qual normalment dura diversos segons (Martin, 1976). Durant aquest temps, un segon estímul fa que s'alliberi menys neurotransmissor que l'habitual a causa del retard del moviment de les vesícules sinàptiques cap a les zones actives des de les parts més llunyanes del terminal axonal.

Una vegada les vesícules han descarregat el seu contingut en la fenedura sinàptica, la membrana de les vesícules es fusiona amb l'axolema, aquest excés de membrana serà eliminat del terminal nerviós per formar noves vesícules sinàptiques. Heuser i Reese (1973) han mostrat que el reciclatge té lloc en la perifèria de la sinapsi on la membrana presinàptica és reformada dins de les vesícules cobertes mitjançant endocitosi.

I.2.3. Neurotransmissió: participació postsinàptica

Quan l' ACh és alliberada, la resposta elèctrica de la fibra muscular pot ser detectada quasi instantàniament. A més, un cop descarregada l'ACh de les vesícules dins a la fenedura sinàptica, es difon molt ràpidament per combinar-se amb els receptors colinèrgics (AChRs) en la membrana de la fibra muscular. Quan dues molècules d' ACh es combinen amb el AChR, el canal que hi ha en el centre del receptor s'obre per deixar entrar ions Na^+ al seu interior i a la vegada, deixar sortir ions K^+ pel mateix canal. Això desplaça el potencial de membrana a valors menys negatius que el potencial de repòs aproximadament cap un valor mig entre els potencials d'equilibri del Na^+ i del K^+ (15 mV negatius en l'interior). Aquesta despolarització és el que s'anomena potencial de placa evocat (EPP). Uns 200.000 AChRs són activats després d'un impuls simple en el terminal nerviós motor, l'obertura d'un canal de AChR despolaritza la membrana sobre 0.3 μV (Fatt i Katz, 1951). Aquest trasbals iònic que suposa l'EPP, pot disparar un potencial d'acció en la fibra muscular que es propagarà en ambdues direccions fins a cada extrem de la fibra muscular.

L'enzim acetilcolinesterasa (AChE) és una de les proteïnes de la làmina basal, situada en la fenedura sinàptica, entre els llocs d'alliberació de l' ACh en l'axolema i els AChRs en la fibra muscular. Després de l'obertura dels porus en els receptors, les molècules d'ACh se separen i difonen cap a la membrana basal on són hidrolitzades per l' AChE. La hidròlisi de l' ACh consisteix en desdoblar-la en colina i àcid acètic. Cap d'aquestes dues molècules pot activar el receptor, i així, aquesta hidròlisi finalitza el procés de transmissió sinàptica.

I.3. ELIMINACIÓ SINÀPTICA EN EL DESENVOLUPAMENT POSTNATAL

Les sinapsis són els determinants del circuit neural i per tant són fonamentals per la funció del sistema nerviós. La mort neuronal implica una disminució sobtada de connectivitat i és un fenomen que caracteritza moltes malalties neurals de diferent etiopatogènia. No obstant, hi ha altres fenòmens com és la inestabilització i progressiva pèrdua de sinapsis que esdevenen més clarament durant l'envelliment i també en determinades alteracions neurals patològiques com és el cas d'algun tipus de demències entre les que destaquen la malaltia d'Alzheimer.

Així doncs, durant l'envelliment del sistema nerviós i també en determinades malalties neurodegeneratives trobem un procés de pèrdua de connexions nervioses. Un procés similar també pot observar-se durant el desenvolupament postnatal, gràcies a un mecanisme d'eliminació de sinapsis redundants. Aquesta reducció axonal és regulada, en temps i magnitud, per l'activitat neural.

És per això molt important conèixer els mecanismes cel·lulars i moleculars que determinen l'adaptació plàstica de les sinapsis i els mecanismes fisiològics que determinen la seva estabilització i inestabilització. Aquests mecanismes tenen una gran importància des del punt de vista neurofisiològic i també com a possibles dianes d'agents terapèutics.

I.3.1. Participació axonal en l'eliminació sinàptica

En els vertebrats nous podem observar a nivell presinàptic, com fibres musculars esquelètiques individuals estan innervades per diferents axons en una mateixa placa motora (Redfern, 1970; Brown i cols., 1976; Ribchester i Barry, 1994). Aquesta situació s'anomena multiinnervació. Durant els primers dies de vida postnatal, la multiinnervació existent comença a disminuir (Benoit i Changeaux, 1975, O'Brien i cols., 1978) fins arribar a les poques setmanes de vida on les plaques motores mantenen contacte amb un únic axó. Aquesta situació rep el nom de monoinnervació i és la normal en l'adult (Redfern, 1970; Brown i cols., 1976; Jansen i Fladby, 1990). Sembla ser que els axons redundants són eliminats per mitjà d'un procés de competició. Quan el procés d'eliminació sinàptica ocorre els axons són molt dinàmics, aquest dinamisme contrasta amb l'estabilitat dels terminals axònics de les unions monoinnervades dels animals adults (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). El fet de que cada un dels axons innervants tingui un grau d'activitat sinàptica diferencial dona una idea de quin terminal serà el guanyador de la competició. Encara que no és un factor completament determinant ja que un axó pot de sobte adquirir més potencia sinàptica i ocupar més territori sinàptic guanyant avantatge sobre l'altre axó competidor (Walsh i Lichtman, 2003).

L'activitat neuromuscular juga un paper molt important en el procés d'eliminació dels contactes nerviosos redundants. Per exemple, quan es redueix l'activitat nerviosa mitjançant toxines com la tetrodotoxina (bloca als canals de Na⁺ axonals, Thompson i cols., 1979), la toxina botulínica (impedeix

que les vesícules sinàptiques es fusionin amb l'axolema, Brown i cols., 1982), l' α -Bungarotoxina (bloca els receptors de l'acetilcolina, Duxon, 1982), o també mitjançant altres procediments quirúrgics com l'axotomia, la tenotomia, i la secció de la medulla espinal (Benoit i Changeux, 1975; Thompson, 1985) s'alenteix l'eliminació sinàptica. Mentre que, si augmentem l'activitat neuromuscular mitjançant estimulació elèctrica del nervi motor o estímulant directament la fibra muscular (Thompson, 1983) s'accelera la pèrdua de contactes sinàptics. És per tot això, que s'ha proposat un procés dependent d'activitat durant l'eliminació sinàptica causada per la competició dels diferents axons innervants d'una placa motora (Redfern, 1970; Brown i cols., 1976; Jansen i Fladby, 1990; Ribchester i Barry, 1994). Per tant podem pensar que les sinapsis o terminals més actius es mantindran i influiran en la retirada de les que ho són menys, participant en l'eliminació polineuronal. La desconexió axonal es produirà per retracció i no per degeneració.

Durant el procés d'eliminació axonal hi ha un moment en què coexisteixen dos axons en la mateixa placa motora, és el que anomenem sinapsis doblement innervades o sinapsis dobles. Aquesta situació relativament simple és un bon model per l'estudi experimental d'aquest procés.

En les sinapsis doblement innervades existeix un axó amb un contingut quàntic ("quantes" d'ACh alliberades) més alt, és el que anomenem "EPP gran", mentre que l'altre es caracteritza per tenir un contingut quàntic més baix (Colman i cols., 1997; Culican i cols., 1998) és el que anomenem "EPP petit". S'ha observat que el contingut quàntic de "l'EPP gran" en sinapsis dobles és

igual al contingut quàntic de l'EPP simple en unions monoinnervades en el mateix període de desenvolupament, el què suggereix que "l'EPP gran" és l'axó que sobreviurà. El contingut quàntic més baix de "l'EPP petit" indica que podria ser generat pel darrer terminal redundant el qual serà eliminat en un període de temps pròxim. És a dir, la secreció del neurotransmissor per part de l'axó que sobreviu es caracteritza per un increment en el contingut quàntic, mentre que els axons que seran eliminats disminueixen progressivament la seva eficàcia a l'estar associats a un menor i progressiu contingut quàntic. (Colman i cols., 1997; Santafé i cols, 2001).

Encara que l'amplada i el contingut quàntic dels dos EPPs de les sinapsis dobles sigui diferent, hi ha molts indicis que suggereixen que la distància de difusió del transmissor entre els axons i la cèl·lula muscular és la mateixa (Balice-Gordon i Lichtman, 1993; Santafé i cols., 2001)

1.3.2. Participació postsinàptica en l'eliminació sinàptica

Un dels aspectes claus en l'estudi de l'eliminació sinàptica d'aquest procés, és la identificació dels punts d'enllaç entre l'activitat induïda per la motoneurona amb la modificació de l'expressió i l'activitat de molècules postsinàptiques (proteïnes quinases, receptors) i també l'enllaç d'aquests esdeveniments postsinàptics amb els mecanismes pròpiament presinàptics de desconexió axonal, retracció i eliminació.

Una característica important en la sinapsi química és la presència d'un aparell postsinàptic que conté altes concentracions de receptors de neurotransmissor acuradament associats a nombrosos bastiments extracel·lulars, transmembrana i citoplasmàtics i components senyaladors. El més estudiat al respecte és l'agrupament de AChRs en el component postsinàptic de la unió neuromuscular esquelètica dels vertebrats. Una de les qüestions centrals en la formació de la unió neuromuscular és la contribució del múscul versus el nervi en l'inici i manteniment de la diferenciació postsinàptica. Els nervis motors són en gran mesura responsables de l'organització d'aquest aspecte de la diferenciació postsinàptica per mitjà de dos mecanismes intramusculars. Per una banda, l'agrupament de AChRs, en un inici, difusament distribuït en la membrana muscular i per altra, la transcripció selectiva dels gens dels AChRs per mitjà de mionuclis associats amb les àrees sinàptiques (nuclis sinàptics dels miòcits). Han estat identificades diverses molècules derivades del nervi que activen aquest mecanisme, d'aquestes, fins fa poc temps es pensava que, l'Agrina, la MuSK i la Rapsyn en tenien un paper molt important in vivo (Denzer i cols., 1997; Ruegg i Bixby, 1998; Burgess i cols., 1999). No obstant, estudis actuals (Lin i cols., 2001; Willmann i Fuhrer, 2002) demostren que la diferenciació postsinàptica és independent d'Agrina. El múscul pot organitzar l'inici de la diferenciació postsinàptica en absència del nervi. En canvi, MuSK i Rapsyn són necessàries per l'inici d'aquesta diferenciació.

Durant molt de temps era acceptada la idea que els canvis morfològics postsinàptics ocorrien abans de la retirada de l'axó, (Balice-Gordon i Lichtman,

1993), doncs semblava que la pèrdua de receptors era produïda abans de la completa retracció dels axons que encara alliberaven neurotransmissor. Tanmateix, existeixen evidències recents (Walsh i Lichtman, 2003) que donen un gir sobtat a aquesta hipòtesi sobre el mecanisme d'eliminació sinàptica, observant-se amb marcatge immunofluorescent i al llarg del temps, que els canvis en l'aparell presinàptic (retirada o eliminació del terminal nerviós), poden donar-se sense que s'observi cap efecte obvi en el seu aparell postsinàptic, el qual sembla molt estable en els llocs d'ocupació. Fet que fa pensar que la pèrdua dels AChRs pot ocórrer només quan l'ocupació sinàptica falla, és a dir, en primer lloc marxa un terminal presinàptic, i en segon lloc, el component postsinàptic, ja que no sempre és ocupat per l'altre terminal que queda.

Existeix un gran dinamisme en els terminals en competició, un axó amb molta força competitiva pot canviar dramàticament en el curs de la competició i reduir aquesta força fent que l'altre guanyi la competició, implicant que la quantitat de territori ocupat per un axó no sigui un predictor real de quin axó serà el guanyador. A vegades, axons que ocupen grans quantitats de territori són reemplaçats per axons que ocupen àrees més petites (Walsh i Lichtman, 2003). L'ocupació sinàptica és un mecanisme pel qual un axó pot incrementar ràpidament la seva àrea sinàptica i per tant la seva força sinàptica prenent avantatge en els llocs sinàptics ocupats prèviament.

La retirada axonal i l'ocupació sinàptica semblen ser dues cares de la mateixa moneda, una simple estratègia del desenvolupament per mitjà de la qual un axó pot afeblir els seus veïns mentre que al mateix temps incrementa la seva força sinàptica.

I.3.3. Canals de Ca^{2+} implicats en el desenvolupament axonal postnatal

De la mateixa manera que en els adults, en els nounats la transmissió neuromuscular depèn en gran mesura de l'entrada de Ca^{2+} procedent del medi extracel·lular per mitjà dels canals de calci dependents de voltatge presinàptics (VDCC; Katz i Miledi, 1970). El calci que entra per mitjà d'aquests canals pot estar relacionat amb l'eliminació polineuronal (Zhu i Vrbova, 1992; Santafé i cols., 2001 i 2002). En les terminacions nervioses que competeixen per establir-se o ser eliminades durant la fase de multiinnervació polineuronal aquests canals hi tenen un comportament diferencial (Santafé i cols., 2001).

Aquests canals han estat classificats segons les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques en, “canals de calci activats per baix voltatge” o canals T (Huguenard, 1998) i “canals de calci activats per alt voltatge” (VDCC) on s'inclouen els tipus, L, N i P/Q (Hofman i cols., 1994; Catterall, 1995). I també canals R en la unió neuromuscular de mamífer, els quals substitueixen el canal P/Q quan la subunitat α_{1A} és eliminada (Urbano i cols., 2003).

En motoneurons de mamífers adults, l'alliberació d'acetilcolina evocada pel terminal nerviós motor és mediada casi exclusivament pel Ca^{2+} que entra via els VDCC del tipus P/Q (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995).

Durant el desenvolupament del sistema nerviós central, s'han descrit propietats moleculars i funcionals immadures de varis tipus de canals iònics, com el canal de Na^+ (Diaz i cols., 1998; Safronov i cols., 1999) i els de calci dependents de voltatge (canals P/Q, N, L; Bahls i cols., 1998; Desmadryl i cols., 1998). En la última dècada s'ha estudiat també la relació entre canals de Ca^{2+} i l'alliberació del neurotransmissor durant el desenvolupament d'unions neuromusculars d'aus (Gray i cols., 1992), amfibis (Fu i Huang, 1994) i mamífers (Sugiura i Ko, 1997; Rosato-Siri i Uchitel, 1999; Santafé i cols., 2001). La majoria d'aquests treballs contempnen les plaques motores ja innervades per un únic axó.

D'aquests estudis es desprèn que els canals tipus L (Sugiura i Ko, 1997) i N (Rosato-Siri i Uchitel, 1999) estan implicats en la neurotransmissió del nounat, juntament amb els canals tipus P/Q. Així doncs, en plaques monoinnervades s'observa que l'alliberació del neurotransmissor pot ser inhibida al voltant d'un 80% per una toxina blocadora específica del canal P, la ω -Agatoxina IVA, tant en l'adult com en el nounat, el que indica l'existència dels canals P/Q en el desenvolupament. La ω -Conotoxina GVIA, blocadora específica del canal N, inhibeix l'alliberació de la neurotransmissió només en estadis primerencs del desenvolupament de la unió neuromuscular però aquest efecte no s'observa al llarg de la maduració (Rosato Siri i Uchitel, 1999). Per altra banda, s'observen certs canvis en la neurotransmissió quan s'utilitza un bloquejador específic del canal L com és la Nitrendipina en sinapsis monoinnervades de nadó (Rosato Siri i Uchitel, 1999; Santafé i cols., 2001).

Així doncs, en les sinapsis monoinnervades del nounat el calci que entra pels canals P, N, i L és utilitzat per la neurotransmissió.

Com hem avançat en apartats anteriors en les sinapsis doblement innervades existeix un axó amb un contingut quàntic més alt, i un axó amb un contingut quàntic més baix (Colman i cols., 1997; Culican i cols., 1998) que anomenem "EPP gran" i "EPP petit", respectivament. S'ha observat que el contingut quàntic de "l'EPP gran" en sinapsis dobles és igual al contingut quàntic de l'EPP simple en unions monoinnervades en el mateix període de desenvolupament, el què suggereix que "l'EPP gran" és l'axó que sobreviurà. El contingut quàntic més baix de "l'EPP petit" indica que podria ser generat pel darrer terminal redundant el qual serà eliminat en un període de temps pròxim.

En sinapsis doblement innervades, de músculs de nounats de 3 a 6 dies d'edat s'ha observat que els canals L, N, i P/Q són presents en els dos axons que innerven la fibra muscular i que tenen una participació diferent en la neurotransmissió (Santafé i cols, 2001). Tant la Nitrendipina com la ω -Agatoxina IVA, i la ω -Conotoxina GVIA inhibeixen "l'EPP gran", mentre que "l'EPP petit", és potenciat. La resposta que té "l'EPP gran" per cada una d'aquestes drogues és similar a la que té l'EPP en les unions simples. Aquest fet reflecteix que "l'EPP gran" de les sinapsis duals és el predecessor de l'EPP de les sinapsis simples.

Durant el desenvolupament del terminal nerviós la quantitat de neurotransmissor que s'allibera és poca (Dennis i cols., 1981), s'ha proposat que el calci necessita entrar per més d'un tipus de canal per poder disparar o

activar la secreció (Mintz i cols., 1995). D'aquesta manera, el terminal que té una major activitat sinàptica (l'EPP gran), sembla utilitzar tota l'entrada de calci a través de tots els VDCC disponibles, P, N i L per la neurotransmissió.

Les conseqüències principals de la configuració d'aquests canals en nounats són: en primer lloc, que l'axó que sobreviu sembla garantir la màxima entrada de calci a través de tots els canals de calci practicables, i en segon lloc, que aquests canals de calci estan directament implicats o participen directament en l'alliberació de neurotransmissor. Com suggereixen Sugiura i Ko (1997) quan la competició axonal acaba, el terminal nerviós solitari perd els canals L i N o aquests canals adopten funcions moduladores diferents no directament relacionades amb l'alliberació del neurotransmissor.

Quant a "l'EPP petit", al nostre laboratori (Santafé i cols., 2001) vam observar un increment en la seva amplada (potenciació) quan els músculs eren tractats amb bloquejadors dels VDCCs. Vam proposar l'existència d'una repressió prèvia de la neurotransmissió per algun mecanisme intracel·lular lligat a l'entrada de calci per mitjà dels VDCC. Així doncs, en el terminal que té una menor activitat sinàptica sembla ser que una quantitat de calci és utilitzat per activar aquest sistema inhibidor de la neurotransmissió que fa que aquesta disminueixi, mentre que només una part del calci és utilitzada en la neurotransmissió.

Així doncs, aquest mecanisme repressor de la neurotransmissió dependent de calci activat en un dels terminals nerviosos, el més desfavorit funcionalment, pot estar relacionat amb la pèrdua final dels axons redundants.

Hi ha diferents candidats per explicar aquest mecanisme repressor, com són, proteïnes dependents de calci (CANP) (Swanson i Vrbova, 1987), proteïnes kinases (PKC, PKA) (Jia i cols., 1999), o canals de potassi activats per calci (Protti i Uchitel, 1993) tots ells impliquen al calci intraaxonal.

Per altra banda, l'entrada de calci al citoplasma axonal per mitjà dels VDCC està modulada per autoreceptors de l'acetilcolina, anomenats receptors muscarínics o mAChR (Kerr i Yoshikami, 1984; Caufield, 1993; Allen i Brown, 1993; Allen, 1999; Slutsky i cols., 1999). És a dir, l'alliberació del neurotransmissor és autoregulada per la mateixa acetilcolina que se segrega. La hipòtesi d'aquest estudi és demostrar que durant el període de multinnervació polineuronal transitòria i una vegada establerta la competició axonal dependent d'activitat, les sinapsis que adquireixen una distribució més eficaç de receptors muscarínics es consoliden, mentre que les que són eliminades mantenen una dotació d'aquests receptors més immadura i menys eficaç per la neurotransmissió ràpida, i per altra banda poden estar relacionades amb al mecanisme repressor de la neurotransmissió dependent de calci abans comentat.

1.4. RECEPTORS MUSCARÍNICS PRESINÀPTICS

En les sinapsis colinèrgiques, tant centrals com perifèriques, existeixen diferents mecanismes repressors de la neurotransmissió relacionats amb el calci. Un d'aquests mecanismes es troba associat a un tipus de receptors, els muscarínics presinàptics (mAChR) sensibles a l'Acetilcolina que fan funcions d'autoreceptors.

Els autoreceptors muscarínics presinàptics estan implicats en la modulació de l'alliberament del neurotransmissor i en l'eficàcia sinàptica en les sinapsis colinèrgiques (veure Caulfield, 1993; per una revisió). Aquest receptors han estat relacionats tant en l'augment com en la reducció de l'alliberament del neurotransmissor (Ganguly i Das, 1979; Abbs i Joseph, 1981; Wessler i cols., 1987; Arenson, 1989).

Fins al moment han estat descrits cinc subtipus de receptors muscarínics (M1, M2, M3, M4, M5) dels quals s'han clonat i expressat els seus gens. Tanmateix, no està totalment resolt quins tipus estan relacionats amb la potenciació de la neurotransmissió i quins tipus, amb la inhibició, en els diferents circuits colinèrgics centrals i perifèrics (Slutsky i cols., 1999; Arellano i cols., 1999; Allen, 1999; Minic i cols., 2002).

L'especificitat funcional del mAChRs és freqüentment resumida de la següent manera:

- M1, M3, M5 es defineixen com a receptors mediadors de l'activació de la fosfolipasa C (PLC) via proteïnes G (PG) de la família Gq insensibles a toxina pertussis, però no com a inhibidors de l'adenilil ciclase.

- M2 i M4 es defineixen com a receptors mediadors de la inhibició de l'adenilil ciclasa, utilitzant PG de la família Gi sensibles a toxina pertussis, però sense estimulació de PLC (Wess, 1996; Caulfield i Birdsall, 1998).

Aquesta especificitat no és absoluta, tanmateix, i els receptors M2 i M4 poden acoblar-se feblement a PLC (per mitjà de proteïnes G sensibles a toxina pertussis) quan s'expressen en alts nivells en determinats tipus cel·lulars (Ashkenazi i cols., 1987).

L'existència de 5 subtipus de receptors muscarínics porta a una certa complexitat farmacològica però a la vegada, també proveeix l'oportunitat per a un millor control fisiològic. Això sembla ser bastant necessari considerant el nombre de funcions i / o malalties que són modulades per activitats muscaríniques en el sistema nerviós central i perifèric.

Una llistat parcial d'aquestes funcions i malalties inclou les del múscul cardíac, el múscul llis, i la funció glandular. També s'inclou determinades malalties afectives (Janowsky i cols., 1994), l'aprenentatge i la memòria (Segal i Auerbach, 1997), el son REM (Capece i Lydic, 1997), la termoregulació (Dilsaver i cols., 1991; Mallick i Joseph, 1997), la proliferació cel·lular (Frucht i cols., 1999; Cheng i cols., 2002), l'analgèsia (Eisenach, 1999; Duttaroy i cols., 2002), els trastorns per obstrucció respiratòria (Abad Santos i cols., 2003), l'esquizofrènia (Felder i cols., 2000, 2001; Bymaster i cols., 2002), el trastorn de Parkinson (Mayorga i cols., 1999; Gomeza i cols., 2001), i el trastorn d'Alzheimer (Mulugeta i cols., 2003).

Com podem comprovar són necessaris molts subtipus per la comprensió d'aquests fenòmens. Per altra banda els agonistes i antagonistes disponibles

no són molt selectius i per tant és difícil estar segurs de quin es el subtipus implicat en cada cas.

Com hem dit anteriorment, els autoreceptors muscarínics presinàptics modulen l'alliberament del neurotransmissor en les sinapsis neuromusculars colinèrgiques. Fent una revisió de la literatura observem que l'augment en l'alliberació d'ACh ha estat relacionat amb el receptor M1 en terminals nerviosos perifèrics vagals (Ren i Harty, 1994). Per altra banda, s'observa una implicació del receptor M2 en la inhibició de l'alliberament de l'ACh concretament en neurones basals del prosencèfal (Allen i Brown, 1993; Allen, 1999). També observem que els receptors M3 es troben en el neostriat (Hsu i cols., 1995), i els receptors M1 en el còrtex cerebral i en l'hipocamp (Vanuchi i Pepeu, 1995). Recentment ha estat demostrat que en la unió neuromuscular de granota (Slutsky i cols., 1999) i ratolí (Mínic i cols., 2002) els receptors M1 i M2 presinàptics estan implicats en la modulació del mecanisme de feedback de l'alliberació d'ACh. El tipus M1 augmenta l'alliberació mentre que l'M2 la inhibeix. Normalment la concentració d'ACh endògena en la fenadura sinàptica és suficient per activar ambdós processos i l'efecte conjunt és una inhibició tònica de l'alliberació (Slutsky i cols., 1999).

Com hem vist anteriorment, hi ha alguna evidència sobre les bases fisiològiques relacionades amb la modulació de l'alliberament regulada pels mAChRs. Els receptors M1 i M3 s'enganxen i estimulen a la fosfolipasa C, mentre que l'activació dels receptors M1 i M4 inhibeixen l'adenilil ciclase (Caulfield, 1993). Ambdues vies intracel·lulars poden modular els canals de

calci dependents de voltatge (VDCC). Sembla que l'augment en l'alliberament d'ACh regulada per M1 està associada a un increment en el corrent de Ca^{2+} en la unió neuromuscular de granota (Slutsky i cols., 1999). L'observació de varies sinapsis centrals i perifèriques suggereix que una reducció en l'entrada de Ca^{2+} és la base de la inhibició de l'alliberació regulada per muscarínics (Wessler i cols., 1987; Wanke i cols., 1987; Hamilton i Smith, 1991; Allen, 1999). Tanmateix la inhibició de l'alliberació d' ACh sembla a vegades no dependre de la concentració del Ca^{2+} extern (Muller i cols., 1987; Dolezal i Túcek, 1993) o sembla no estar associat amb una reducció en els corrents de Ca^{2+} presinàptic (Slutsky i cols., 1999).

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

II.1. HIPÒTESI

Diversos tipus de receptors muscarínics presinàptics són presents en les sinapsis neuromusculars dels nadons i modulen la neurotransmissió d'una manera específica i diferent que en l'adult. A més, els receptors muscarínics estan involucrats en l'eliminació sinàptica, en relació a l'axó que ha de ser eliminat o bé, modulant la funció del que ha de sobreviure.

II.2. OBJECTIUS

II.2.1. Objectiu general

Determinar la presència dels diferents subtipus d'autoreceptors muscarínics, el seu distintiu comportament funcional, i la seva possible relació amb els canals de calci dependents de voltatge (VDCC), en els terminals nerviosos motors del múscul *Levator Auris Longus* (LAL) del nadó i de l'adult.

II.2.2. Objectius específics

1-. Identificar els tipus i la proporció relativa d' autoreceptors muscarínics en els axons de les sinapsis mono i doblement innervades en els primers dies postnatsals.

2-. Determinar els períodes d' aparició, maduració i consolidació dels diferents tipus de receptors muscarínics en relació al desenvolupament neuromuscular.

3-. Analitzar la possible relació amb els canals de calci dependents de voltatge (VDCC) implicats en l'acció dels diferents tipus de receptors muscarínics sobre la neurotransmissió en el nounat.

4-. A partir de les dades obtingudes en els objectius 1, 2, i 3, avaluar si els diferents tipus d' autoreceptors muscarínics podrien estar involucrats en l'eliminació sinàptica.

III. MATERIAL I MÈTODES

III.1.- CARACTERÍSTIQUES DE L'ANIMAL

Els animals utilitzats per realitzar aquest estudi van ser rates nounats de l'espècie Sprague Dawley de 3 a 15 dies de vida postnatal i rates adultes de la mateixa espècie, de 30 a 40 dies d'edat .

Les mares van ser subministrades per la firma comercial Charles River i mantingudes a l'estabulari, prèviament a l'inici del treball, per aclimatar-les a les condicions d'estabulació estàndard, de la mateixa manera que els seus nadons que van ser resultat de l'aparellament de mascles i femelles en el mateix estabulari de la Facultat de Medicina fins que es va produir la fecundació, la qual va ser comprovada mitjançant frotis vaginal de les femelles. Les femelles fecundades van ser separades i posades en gàbies isolades durant el període de gestació.

Els procediments experimentals utilitzats amb els animals van ser realitzats seguint la llei 5/1995, del 21 de Juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques, aprovada pel Parlament de Catalunya l'any 1995.

La selecció dels animals va ser aleatòria i les condicions de creixement i vida van ser les mateixes per a tots els animals sotmesos a estudi. Les rates van ser mantingudes a l'estabulari en gàbies estàndard de Makrolon^R (23x46x14 cm³). La temperatura ambiental va ser regulada amb un termòstat electrònic i va ser de 20-22°C, i la humitat relativa va ser del 60-70 %. Els animals van ser sotmesos a cicles de 12 hores de llum artificial, amb neó de llum blanca i 12 hores de foscor. L'alimentació dels animals adults va ser amb

pinso de manteniment per rata i ratolí del tipus VRF- 1 subministrat per la firma comercial Charles River i aigua clorada. Tant el pinso com l'aigua van ser subministrats *ad libitum*.

III.2.- MODEL MUSCULAR

El model muscular escollit va ser el múscul *Levator Auris Longus* (LAL) de rata, un múscul ideal per realitzar estudis amb drogues o neurotoxines, ja que es troba situat immediatament per sota de la pell, és molt pla i està constituït per dos o tres capes de cèl·lules musculars, el que facilita molt la seva manipulació i la localització de terminacions nervioses en estudis funcionals. La seva funció és moure l'orella.

La dissecció del múscul LAL requereix d'una lupa estereoscòpica i manipulació microquirúrgica. Al realitzar la dissecció del múscul, aquest apareix immediatament després de tallar la pell (figura 2). És el múscul més superficial de la zona dorsal del cap i presenta una part posterior i una altra anterior. Tant la regió posterior com l'anterior del múscul es troben innervades per la branca auricular posterior del nervi facial, i existeix una única zona d'innervació ben definida, que es localitza, aproximadament, en el terç mitjà de l'espai que separa les dues insercions de les fibres musculars.

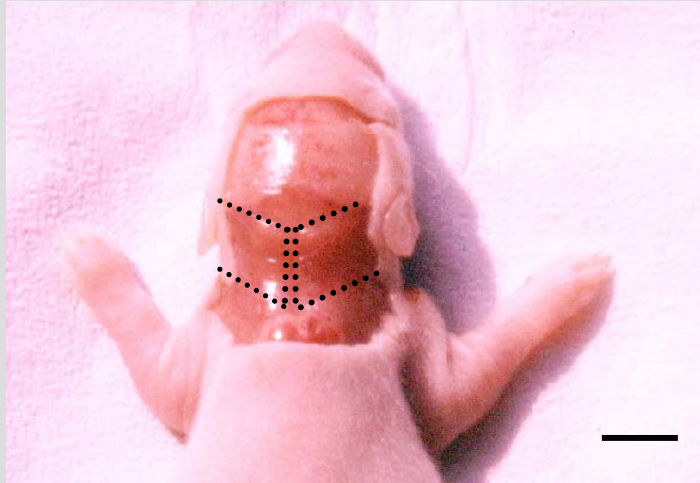
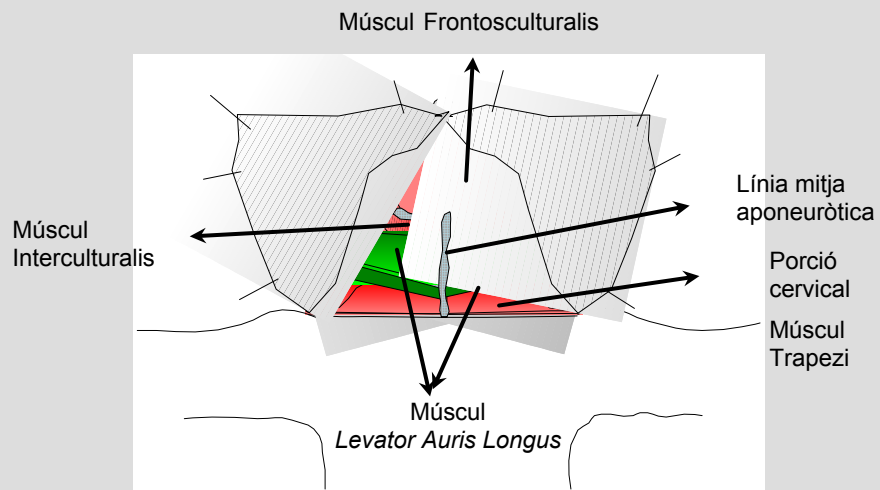


Figura 2. Levator auris longus

A. Fotografia de nadó de rata de 6 dies de vida postnatal (P6) on es ressalta, amb línies discontinues, la localització del múscul Levator Auris Longus (LAL). Barra d'escala = 1 cm.



B. Esquema representatiu de la localització anatòmica del múscul LAL.

III.3.- GENERALITATS SOBRE L'OBTENCIÓ DE LA MOSTRA

Per reproduir "in vitro" la fisiologia neuromuscular, l'extracció del múscul ha de ser incruenta i hem de mantenir-lo "viu". Per aquest motiu, una vegada extret el múscul es submergeix en una solució Ringer oxigenat. Un cop disseccionat, es col·loca el múscul en una camareta de registre electrofisiològic.

Els animals van ser anestesiats amb 2 % de tribromoetanol a una dosi de 0.15 ml per 10 grams de pes de l'animal, via intraperitoneal, i sacrificats per exsanguinació.

El múscul i el seu nervi van ser extrets de l'animal i disseccionats amb l'ajuda d'una lupa estereoscòpica, sobre una placa de Petri amb base de Silgard^R on van ser subjectats i estirats amb agulles entomològiques i submergits en una solució Ringer Normal (composició en mM: NaCl, 137; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1; NaHCO₃, 12; Na₂HPO₄, 1 i glucosa 11), i contínuament oxigenats amb carbogen (95% O₂ / 5% CO₂). A continuació, el múscul i el seu nervi van ser traspassats a una camareta de registre d' 1.5 ml de capacitat per als nadons i de 5 ml de capacitat per als adults, on el múscul també va ser estirat lateralment i subjectat amb agulles entomològiques. Aquesta camareta ens permet mantenir el múscul viu mitjançant un sistema de perfusió contínua que pot servir també per crear diferents situacions experimentals a curt termini (per exemple, modificant l'ambient iònic extracel·lular, perfundir drogues, o rentar la mostra d'una droga prèviament perfundida).

III.4.- TÈCNICA ELECTROFISIOLÒGICA UTILITZADA

III.4.1. Equip d'electrofisiologia bàsic

Es pretén reproduir artificialment la resposta fisiològica de la sinapsi neuromuscular, per aquest motiu precisem d' una unitat estimuladora que provoqui un potencial d'acció nerviós i d'un sistema de registre que reculli la resposta neuromuscular que es genera. Així doncs, el nervi es contínuament estimulat per dos elèctrodes de platí en les rates adultes i un elèctrode de succió en les rates nounats, acoblats a un generador de polsos o estimulador (Cibertec Stimulator CS-20) connectat a una unitat aïlladora d'estímuls.

La unitat estimuladora crea una polsos de diferència de potencial de pocs volts, el voltatge ve determinat pel llindar mínim d'estimulació necessari per què s'observi activitat elèctrica en una fibra muscular, multiplicat per 3. Aquests polsos es generen a una freqüència de 0.5 Hz, (1 estímul cada dos segons) i amb una durada de 0.1 ms.

L'elèctrode de registre el qual s'insereix dins del citoplasma de la fibra muscular és un capil·lar ple de KCl que s'ha estirat fins aconseguir una punta afinada de menys d' 1 μm de diàmetre i una resistència de 20-40 megaohms ($\text{M}\Omega$) per als adults i 40-70 $\text{M}\Omega$ per als nadons.

Els elèctrodes de registre son connectats a un amplificador (Tecktronix, AM 502 Differential Amp.) doncs, les senyals elèctriques que es pretenen registrar són d'uns pocs mil·livolts (0.5-5 mV) per aquest motiu és imprescindible

magnificar-les. L'amplificador permet a més, filtrar les senyals elèctriques alienes al model neuromuscular.

Com a referent s'utilitza un elèctrode Ag-AgCl connectat a la solució de bany mitjançant un pont d'Agar (Agar 3.5% en 137 mM NaCl).

Els senyals enregistrats són digitalitzats (DIGIDATA 1300 A Interface, Axon Instruments Inc.) i emmagatzemats. La senyal que prové de l'amplificador és reproduïda en una escala temporal i mostra una línia que indica les variacions de potencial entre l'elèctrode de registre i el de referència. permetent, a més amplificar, filtrar el senyal i emmagatzemar els registres pel seu anàlisi posterior.

El software Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc.) és l'utilitzat per l'adquisició de les dades i el seu anàlisi (figura 3).

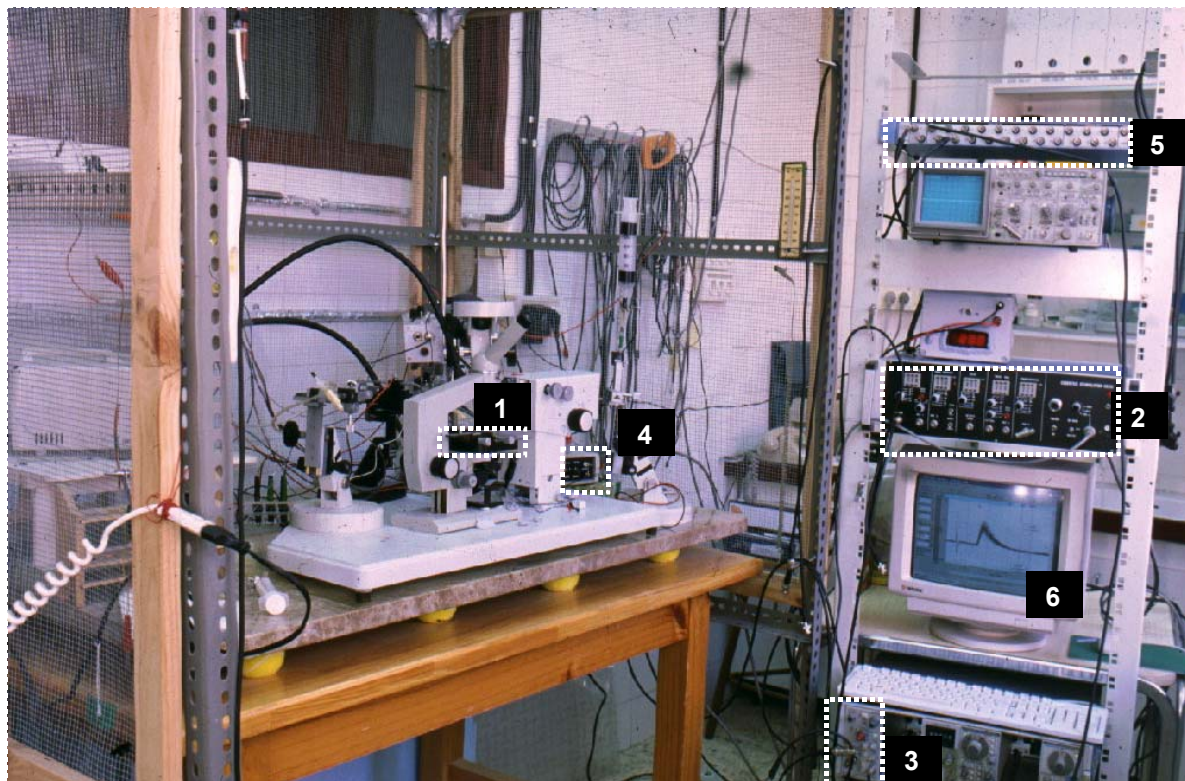


Figura 3. Equip d'electrofisiologia intracel·lular

Elements bàsics d'un equip d'electrofisiologia. 1) Mostra 2) Unitat estimuladora 3) Amplificador 4) Unitat aïlladora 5) Taula digitalitzadora 6) Sistema informàtic (Axoscope 9.0).

III.4.2. Registre de l'activitat sinàptica

III.4.2.1. Registre de l'activitat sinàptica evocada

L'activitat sinàptica evocada és el registre postsinàptic que realitzem després de provocar un potencial d'acció amb la unitat estimuladora.

El registre obtingut de l'activitat sinàptica evocada, observat d'esquerra a dreta, consisteix en una línia de base que presenta primer un pic de poca durada corresponent a l'artefacte de l'estímul elèctric que l'experimentador provoca, passat un curt lapse de temps (1-2 ms, "latència") observem una ona de major durada: és el potencial de placa evocat o EPP (*end plate potential*). L'EPP correspon al procés de tràfec iònic postsinàptic desencadenat per la unió del neurotransmissor, ACh, amb els seus receptors nicotínics. L'EPP per si mateix pot donar informació quantificable en relació a l'efectivitat en l'alliberació del neurotransmissor per mitjà de la seva amplada.

III.4.2.1.a. Unions neuromusculars adultes

Els potencials de placa evocats (EPPs) van ser enregistrats intracel·lularment mitjançant elèctrodes de registre fets amb capil·lars de vidre de borosilicat convencionals (GC150F-10, Harvard Apparatus Ltd. diàmetre intern de 0.86 mm, diàmetre extern de 1.5 mm i amb un filament intern) i amb 20-40 M Ω de resistència de punta (estirador de puntes Narishige Scientific Instrument Lab.).

Els elèctrodes de registre van ser omplerts amb 3M KCl. Els experiments van ser realitzats a una temperatura ambient d'entre 22 i 25°C. La temperatura del bany va ser també monitoritzada durant els experiments (23.4°C ± 1.7) amb un termòmetre digital TMP 812, Letica.

Per evitar ruptures anormals en la membrana postsinàptica per mediació de l'elèctrode de registre és imprescindible prevenir la contracció muscular natural. En el nostre estudi això s'aconsegueix mitjançant el seccionament del miòcit a nivell de les seves insercions. Així doncs, durant el registre dels EPPs la contracció muscular induïda per l'estimulació nerviosa va ser previnguda per secció de les fibres musculars a nivell de les seves insercions, uns 2-3 mm a cada costat de la branca nerviosa intramuscular principal, tal i com van descriure Hubbard i Wilson (1973). Mitjançant aquest mètode de la "fibra tallada" el potencial de placa no arriba al llindar que dispara el potencial d'acció i la consegüent contracció. Cal dir també, que el potencial de repòs en aquestes preparacions no canvia significativament durant llargues exposicions als antagonistes muscarínics.

Després de seccionar les fibres i abans de començar l'experiment es va realitzar una preincubació amb Ringer normal durant 30 minuts, doncs durant aquest període el potencial de membrana decau molt fins que s'estabilitza. El potencial de membrana promig als 30 minuts d'incubació amb Ringer normal en els músculs adults és de -43.53 ± 0.77 mV.

El mètode de "la fibra tallada" permet registrar la grandària completa de l'EPP sense comptar amb l'efecte atenuador de la d-Tubocurarina o del baix

calci extracel·lular. En experiments preliminars es va observar que la d-Tubocurarina modifica l'acció dels agents muscarínics. La fibra muscular tallada esdevé parcialment despolaritzada, el que inactiva els canals de sodi dependents de voltatge. Així, la contracció muscular és eliminada, però la possible dependència dels mecanismes muscarínics presinàptics a l'entrada de calci és preservada.

Després d'impalar cada fibra muscular el nervi va ser contínuament estimulat a 0.5 Hz (70 estímuls) utilitzant dos elèctrodes de platí acoblats a un generador de polsos associat a una unitat aïlladora d'estímuls. La intensitat de l'estímul va ser tres vegades el llindar mínim d'estimulació. Van ser registrats els darrers 50 EPPs.

En els estudis poblacionals, les amplades dels EPPs van ser registrades en un mínim de 15 fibres per múscul, abans (control) i després d'una hora d'incubació amb les diferents drogues o toxines. En els experiments de fibra única, es va estudiar l'efecte de les drogues o toxines en els EPPs d'una mateixa fibra muscular impalada permanentment. La droga o toxina era afegida a la solució de bany i els EPPs eren registrats com hem descrit prèviament, cada 15 minuts durant un període mínim de 60–120 minuts.

Hem utilitzat el càlcul de les amplades dels EPP per mesurar l'alliberació del neurotransmissor. L'amplada mitjana per fibra (V_c) és calculada i corregida per sumació no lineal, ja que normalment els EPPs són de més de 4 mV (McLachlan i Martin, 1981):

$$V_c = V_{m_0} / \{1 - [V_{m_0} / (V_{m_i} - V_{m_r})]\}$$

On $V_{m_0} = V_{epp} / \{V_{m_i} - V_{m_r} / (V_m - V_{m_r})\}$, V_{epp} és l'amplada mitjana de l'EPP enregistrat, V_{m_i} és el potencial de membrana assumit en -80 mV, V_{m_r} és el potencial de reversió de l'acetilcolina assumit en -15 mV i V_m és el potencial de membrana registrat. Els registres van ser desestimats si el potencial de membrana (V_m) era menor de -30 mV o si aquest dequia més de 5 mV durant el període de registre. També van ser desestimats si el temps de pujada era de més d' 1 ms, indicant que estàvem massa lluny dels terminals nerviosos motors.

III.4.2.1.b. Unions neuromusculars nounats

De la mateixa manera que en els músculs adults en els nadons també vam registrar els potencials de placa evocats (EPPs) intracel·lularment mitjançant elèctrodes de registre fets amb capil·lars de vidre de borosilicat convencionals aquest cop amb una resistència de punta més alta, $40-70$ M Ω de resistència de punta per als nadons. Els elèctrodes de registre van ser omplerts amb $3M$ KCl. Els experiments van ser realitzats a temperatura ambient. La temperatura del bany va ser també monitoritzada durant els experiments.

Per evitar ruptures de la membrana postsinàptica, a causa de la contracció muscular, també vam utilitzar el mètode de la "fibra tallada". Vam realitzar un incubació prèvia amb Ringer normal per estabilitzar els potencials de membrana després del seccionament del miòcit. El potencial de membrana

promig als 30 minuts d'incubació amb Ringer normal en els nadons és de -35.72 ± 1.77 mV. D'aquesta manera pot ser registrada la grandària completa de l'EPP sense comptar amb l'efecte atenuador de la d-Tubocurarina o del baix calci extracel·lular. A més, amb aquest procediment poden ser observats tots els EPPs, fins i tot els més petits i determinar el nombre d'axons que innerven una determinada fibra muscular. Tot i que també poden ser observats els potencials de placa en miniatura (MEPPs) aquests no interfereixen en la determinació del nombre d' axons que innerven la fibra muscular ja que en els nadons apareixen a una freqüència molt baixa (1 episodi per minut).

Per determinar el nombre d'axons que innerven una fibra muscular en els animals nounats (monoinnervada o doblement innervada) es va realitzar el següent procediment. Després d'impalar cada fibra muscular el nervi va ser estimulat mitjançant un elèctrode de succió acoblat a un generador de polsos associat a una unitat aïlladora d'estímuls, i la intensitat de l'estímul va ser augmentada gradualment des de zero fins que l'EPP era observat. Si l'amplada i la latència (temps transcorregut entre l'artefacte d'estimulació i la base de l'EPP), romanien constants, llavors es conclouïa que aquella placa es trobava monoinnervada. Si això no ocorria, és a dir, si a l'augmentar la intensitat de l'estímul causàvem un reclutament addicional d' un o més axons, produint un increment en l'EPP, llavors conclouïem que la placa es trobava poliinnervada, com descriuen Ribchester i Barry (1994; veure un exemple a la figura 4). En aquest treball no es van estudiar les unions neuromusculars innervades per més de dos axons.



Figura 4. Exemple del reclutament de diferents EPPs per increment de l'estímul elèctric en sinapsis multiinnervades.

A dalt: Després d'impalar una fibra muscular incrementem el llindar d'estimulació elèctrica i així podem obtenir diferents tipus d'EPP indicant que estan innervades per diferents axons. **A baix:** Els traços anteriors superposats ofereixen una major claredat per a comptabilitzar el nombre d'axons que multiinnerven (5 en aquest exemple). Barra escala horitzontal: 5 ms. vertical: 0.4 mV.

En les fibres doblement innervades pot aparèixer un segon EPP quan s'augmenta la intensitat de l'estimulació elèctrica. Aquest EPP és el resultat del reclutament de dos axons. L'amplada de l'EPP de la resposta del segon axó ha estat calculada per sostracció de l'amplada del primer. Les amplades més baixes i més altes són designades com a "EPP petit" i "EPP gran", respectivament (veure figura 5 i taula 1).

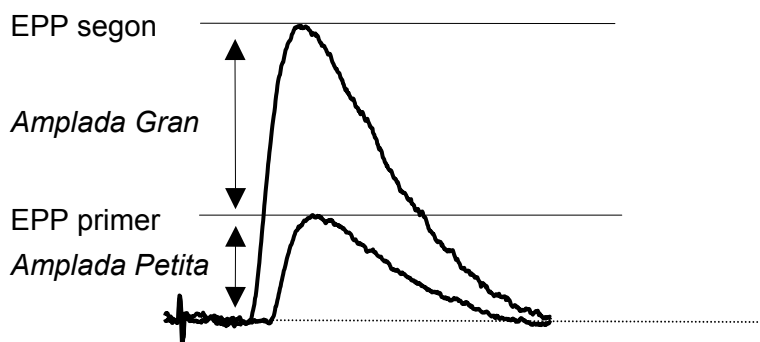


Figura 5. Valoració de l'amplada dels EPPs.

L'amplada de l'EPP de la resposta del segon axó és calculada per sostracció de l'amplada del primer. Les amplades més baixes i més altes són designades com a "EPP petit" i "EPP gran", respectivament.

Una vegada coneguts el nombre d'axons que innervaven una determinada fibra muscular, va ser aplicat un tren de 20 estímuls a 0.5 Hz i es van registrar únicament els darrers 10 EPPs. En les unions duals va ser aplicat el mateix procediment per ambdós axons però canviant l'amplada de l'estímul elèctric. La neurotransmissió en el múscul LAL de rates de 3 a 6 dies d'edat acostuma a tenir fallides o falles (nombre mitjà de falles per 100 episodis: 34.44 ± 7.56 , $n = 4$ músculs) que denota un baix contingut quàntic (veure taula 1) és per això que l'alliberació del neurotransmissor pot ser temporalment deprimida per una freqüència elevada d'estimulació. Per prevenir aquest fet, el nervi va ser contínuament estimulat durant no més de 40 segons a 0.5 Hz cada vegada. Per altra banda, sempre es va esperar 3 minuts abans de començar un nou tren d'estímuls.

De la mateixa manera que en els animals adults en els estudis poblacionals de nounats, les amplades dels EPPs van ser registrades abans (control) i després d'una hora d'incubació amb les diferents drogues o toxines. Van ser estudiades un mínim de 15 fibres per múscul.

La penetració successiva en la profunditat de les fibres pot crear ocasionalment, uns ponts de baixa resistència elèctrica que poden comunicar dues fibres veïnes. D'aquesta manera, un EPP provinent d'una fibra podia ser reflectit com un EPP de més en una fibra veïna, és a dir, que podem trobar falses fibres multiinnervades (Soha i cols., 1987). Per prevenir aquesta situació el múscul va ser lateralment estirat i subjectat amb agulles entomològiques de manera que la majoria de fibres van quedar clarament exposades podent així,

ser acuradament identificades i impalades.

Taula 1. Plaques mono i doblement innervades: dades electrofisiològiques.

	Doblement innervades		Monoinnervades	Adult
	EPP petit	EPP gran		
m	1.14 ± 0.19◆	2.11 ± 0.30▲	2.22 ± 0.40●	30.3 ± 1.15
X (mv)	1.41 ± 0.20◆	2.94 ± 0.28▲	2.59 ± 0.32●	4.35 ± 0.31

El contingut quàntic mig (m) és estimat mitjançant el mètode de les falles (veure Martin, 1966 i Hubbard i cols., 1969). X: amplada mitja de l'EPP. L'EPP petit i l'EPP gran en les unions doblement innervades són definits d'acord amb les seves amplades (veure material i mètodes). (▲) indica $p < 0.05$ quan l'EPP gran és comparat amb l'EPP petit. (◆) indica $p < 0.05$ quan l'EPP petit de les unions doblement innervades és comparat amb l'EPP d'una placa monoinnervada. (●) indica $p < 0.05$ quan l'EPP d'una placa simple en rates nounats és comparat amb l'EPP adult. N = 8 músculs nounats i 3 músculs adults (rates de 2 mesos d'edat). Les falles en els músculs adults són obtingudes en una solució amb alt Mg^{2+} . Els valors són expressats com mitja ± SEM.

Per mesurar l'alliberació del neurotransmissor en animals nounats també vam utilitzar el càlcul de les amplades dels EPP. Es va calcular l'amplada mitjana (mV) per fibra i va ser corregida assumint un potencial de membrana de -35 mV (el potencial de membrana promig del LAL de 3-6 dies d'edat després de 30 minuts de tallar la fibra muscular és de -35.72 mV ± 1.77).

Vam registrar l'EPP on tenia el menor temps de pujada possible, normalment de 5 ms, per assegurar que els registres eren realitzats prop del terminals nerviosos o plaques motores.

III.4.2.2 Registre de l'activitat sinàptica espontània

De una manera espontània i habitual apareixen EPPs en miniatura (MEPPs) a una freqüència mitjana de 60 episodis per minut. L'estudi de l'activitat espontània no necessita cap bloqueig de la contracció ni l'activació del potencial d'acció axonal per part de la unitat estimuladora.

A la bibliografia referent a les drogues i toxines amb acció muscarínica vam trobar una gran variabilitat de concentracions de treball. A més, en estudis preliminars vam comprovar que molts d'aquests agents podien interaccionar amb els receptors nicotínics postsinàptics a més dels autoreceptors muscarínics axonals, depenent de la concentració utilitzada. Per aquests motius vam realitzar un seguit d'experiments per mesurar l'activitat espontània fent un registre dels potencials de placa en miniatura (MEPPs) en músculs adults i nounats.

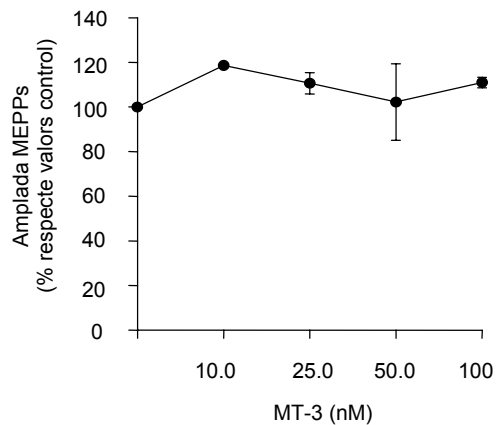
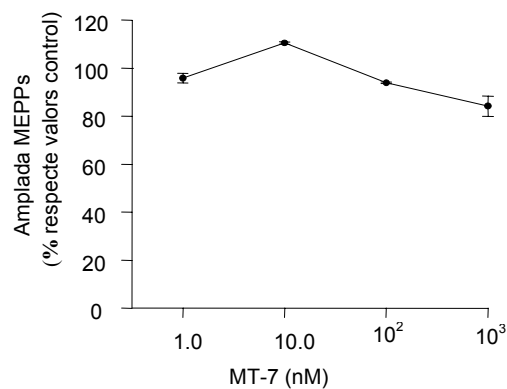
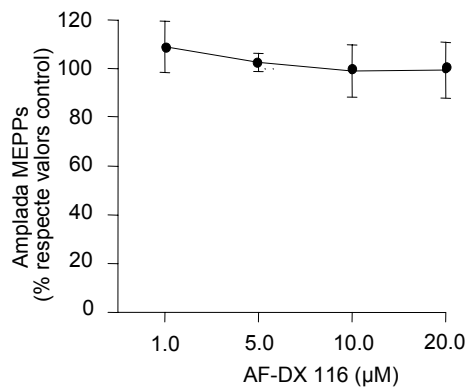
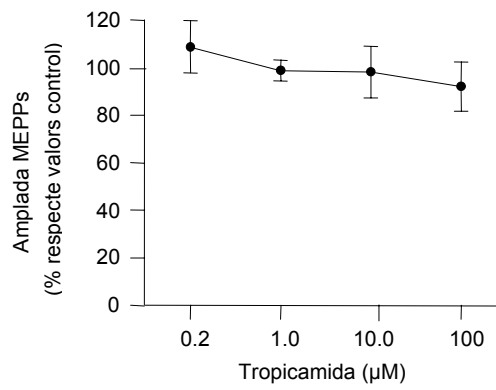
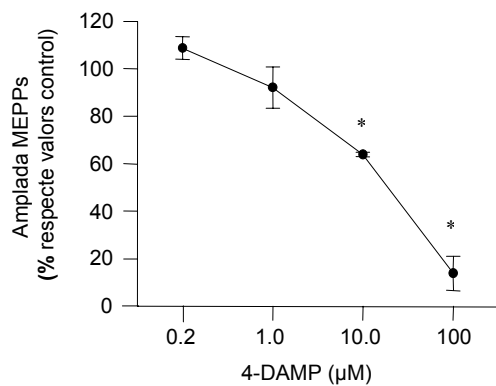
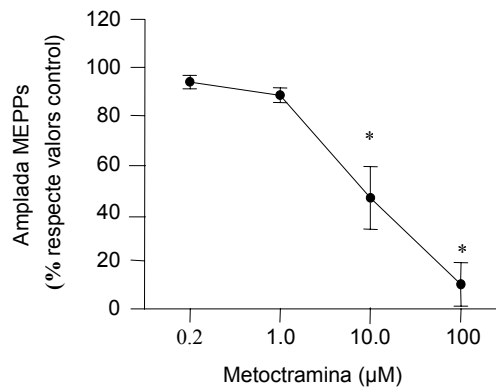
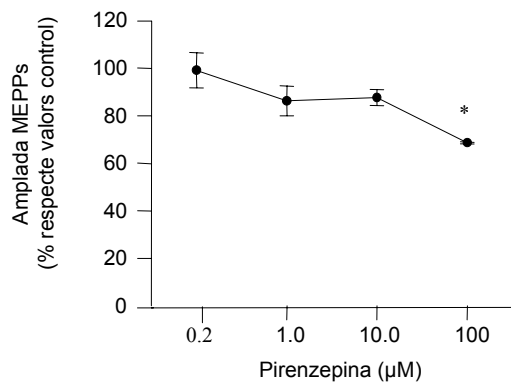


Figura 6. Relació dosi-resposta dels antagonistes muscarínics amb l'alliberació espontània del neurotransmissor.

Només altes concentracions de Pirenzepina, Metoctramina i 4-DAMP afecten els receptors nicotínics postsinàptics i en conseqüència l'amplada dels MEPPs en animals adults .
* $p < 0.05$.

III.4.2.2.a. Unions neuromusculars adultes

Vam registrar els MEPPs intracel·lularment abans (control) i després d'una hora d'incubació amb les diferents drogues o toxines, i vam calcular i corregir l'amplada mitjana per fibra assumint un potencial de membrana de -80 mV.

Vam concloure que només concentracions elevades de Pirenzepina, 4-DAMP, i Metoctramina podien afectar els receptors nicotínics postsinàptics i reduir la mida dels MEPPs (% de reducció de l'amplada: 31.40 ± 0.42 i 36.90 ± 0.96 , 47.82 ± 13 per Pirenzepina $100 \mu\text{M}$, 4-DAMP $10 \mu\text{M}$ i Metoctramina $10 \mu\text{M}$ respectivament; en tots els casos: $p < 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figura 6).

III.4.2.2.b. Unions neuromusculars nounats

En els músculs nounats també vam realitzar un seguit d'experiments per veure si els antagonistes muscarínics afectaven l'alliberació espontània del neurotransmissor és a dir, l'amplada del potencials de placa en miniatura (MEPPs). Vam realitzar registres intracel·lulars abans i després d'una hora d'incubar el múscul amb la substància experimental. I vam observar que, a les concentracions de treball utilitzades, cap dels antagonistes muscarínics modificaven l'amplada del quanta (MEPP), (% de canvi: 13.77 ± 5.01 (Pirenzepina $10 \mu\text{M}$), 6.11 ± 0.36 (MT-7 100 nM), 12.65 ± 3.79 (Metoctramina $1 \mu\text{M}$), 0.99 ± 10.77 (AF-DX 116 $10 \mu\text{M}$), 6.48 ± 3.37 (Tropicamida $1 \mu\text{M}$), $10.98 \pm$

2.36 (MT-3 100 nM), 10.83 ± 7.09 (4-DAMP 1 μ M), $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, mínim 15 fibres per múscul) indicant que no hi havia afectació dels receptors nicotínics postsinàptics d'ACh (figura 7).

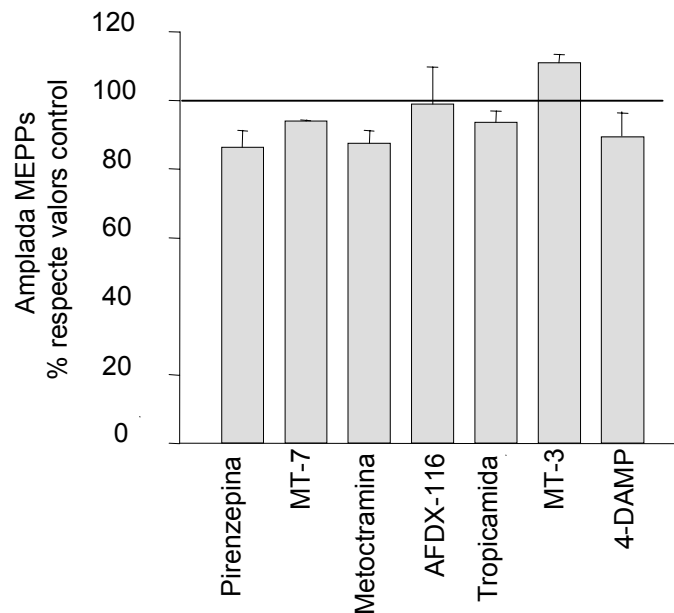


Figura 7. Efecte dels antagonistes muscarínics selectius en l'alliberament espontani del neurotransmissor en nadons.

Amplada dels MEPPs. Els valors són expressats com percentatge respecte els valors control (mitjana \pm SEM). Solucions de treball:

Pirenzepina 10 μ M, MT-7 100 nM, Metoctramina 1 μ M, AF-DX 116 10 μ M, Tropicamida 1 μ M, MT-3 100 nM, 4-DAMP 1 μ M. Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

III.5.- SOLUCIONS UTILITZADES

Les solucions de treball de les diferents substàncies utilitzades van ser les següents:

Pirenzepina dihidrocloride, antagonista muscarínic amb alta afinitat pel receptor muscarínic (mAChR) M1 subministrada per TOCRIS, va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 10 mM en aigua bidestil.lada. La solució de treball va ser de 10 µM.

Metoctramina tetrahydrocloride, antagonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M2 subministrada per Sigma, va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 1 mM en aigua bidestil.lada. La solució de treball va ser de 1 µM.

Tropicamida (N-ethyl-3-hidroxi-2-fenil-N-(pyridinylmethyl) propanamide), antagonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M4 subministrada per TOCRIS, va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 10 mM en dimetil sulfòxid (DMSO). La solució de treball va ser de 1 µM.

4-DAMP (1,1-dymethyl-4-diphenylacetoxy-piperinidium iodide), antagonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M3 subministrada per TOCRIS, va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 100 mM en en dimetil sulfòxid (DMSO). La solució de treball va ser de 1 µM.

Oxotremorina M, agonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M2 subministrada per Sigma/RBI, va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 10 mM en aigua bidestil·lada. La solució de treball va ser de 1 µM.

Muscarina, agonista muscarínic inespecífic va ser subministrada per Sigma/RBI, va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 5 mM en aigua bidestil·lada. La solució de treball va ser de 10 µM.

Toxina muscarínica 7 (MT-7), antagonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M1 subministrada per Peptides International, va ser emmagatzemada a -20°C a una concentració 50 µM en aigua bidestil·lada. La solució de treball va ser de 100 nM.

Toxina muscarínica 3 (MT-3), antagonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M4 subministrada per Alomone Laboratories, va ser emmagatzemada a -20°C a una concentració 1 µM en aigua bidestil·lada. La solució de treball va ser de 100 nM.

AF-DX 116, antagonista muscarínic amb alta afinitat pel mAChR M2 subministrada per TOCRIS , va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 100 mM en dimetil sulfòxid (DMSO). La solució de treball va ser de 10 µM.

Totes les solucions de treball van ser emmagatzemades a 4°C durant no més de 4 setmanes.

ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA), blocador del canal de calci dependent de voltatge (VDCC) tipus P/Q subministrada per Alomone Labs. i Research Biochemicals Inc., va ser emmagatzemada a -20°C a una concentració 10 μ M en aigua bidestil.lada. La solució de treball va ser de 100 nM.

ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTx-GVIA), blocador del VDCC tipus N subministrada per Research Biochemical Inc., va ser emmagatzemada a -20°C a una concentració 100 μ M en aigua bidestil.lada. La solució de treball va ser de 1 μ M.

Nitrendipina, blocador del VDCC tipus L subministrada per Research Biochemicals Inc., va ser emmagatzemada a 4°C a una concentració 50 mM en dimetil sulfòxid (DMSO) i protegida de la llum. La solució de treball va ser de 1 μ M. Els experiments duts a terme en presència de la Nitrendipina van ser realitzats en absència d'il·luminació directa. La concentració final de DMSO tant en els controls com en les preparacions tractades amb la droga va ser de 0.1% (v/v). En els experiments controls, aquesta concentració de DMSO no va afectar cap dels paràmetres estudiats.

Per fer comparacions adequades, el DMSO es suma a les preparacions control dels experiments amb preparacions tractades amb drogues, com són la Nitrendipina, la Tropicamida, l'AF-DX 116 i la 4- DAMP, les quals requereixen DMSO per la seva dissolució.

En experiments control addicionals, la concentració 0.1 % v/v de DMSO no afecta cap dels paràmetres estudiats. Per exemple, una relació dosi-resposta entre el DMSO i la freqüència i l'amplada dels MEPPs mostra un canvi significatiu en l'amplada del quanta en concentracions de DMSO per sobre de 0.1 % (figura 8).

Diversos autors i també nosaltres hem utilitzat solucions que contenien 0.1 % v/v de DMSO en diferents estudis relacionats amb els canals de calci dependents de voltatge de la unió neuromuscular, i no s'han trobat canvis en els paràmetres estudiats atribuïbles al DMSO (Katz i cols., 1996; Rosato-Siri i Uchitel, 1999; Santafé i cols., 2000; 2001). No obstant caldria ressaltar que en altres models com els invertebrats (Plummer i cols., 1983) concentracions relativament més baixes de DMSO (per sobre de 1.4 mM que és la concentració final dels nostres experiments) poden inhibir l'acetilcolinesterasa.

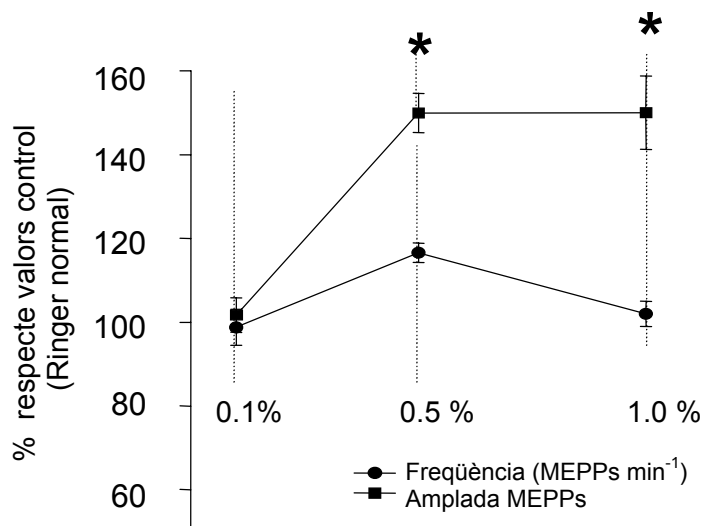


Figura 8. Relació dosi-resposta del DMSO en la neurotransmissió espontània.

La utilització de solucions que contenen 0.1 % v/v de DMSO no provoca canvis en els paràmetres estudiats atribuïbles a aquest dissolvent. (Katz i cols., 1996; Rosato-Siri i Uchitel, 1999; Santafé i cols., 2000; 2001).

* $p < 0.05$.

Dimetil Sulfòxid (DMSO) subministrat per Sigma, va ser emmagatzemat a temperatura ambient. La concentració de treball va ser al 0.1%.

d-Tubocurarina subministrada per Sigma, va ser emmagatzemada a 4°C en aigua bidestil·lada a una concentració 1 mM. La solució de treball va ser de 30 µM.

La resta de sals van ser subministrades per Sigma.

Les diferents solucions de treball van ser afegides directament al bany.

III.6.- ANÀLISI ESTADÍSTIC

Per avaluar les diferències entre els grups va ser utilitzat l'anàlisi de la variança (ANOVA), i per fer comparacions múltiples, el postest de Bonferroni. Quan vam haver d'avaluar les diferències només entre dos grups va ser utilitzat el test T de Welch, a dues cues, per valors no aparellats i no assumint variàncies iguals. Les diferències van ser considerades significatives quan $p < 0.05$.

Els valors són expressats com mitjana \pm error estàndard mig (S.E.M).

IV. RESULTATS

IV.1- UNIONS NEUROMUSCULARS ADULTES

IV.1.1- Estudi de l'efecte dels agents muscarínics en l'alliberació evocada d'ACh en les unions neuromusculars adultes

Caulfield al 1993 i Caulfield i Birdsall al 1998 van descriure 5 tipus de receptors muscarínics (M1 – M5), del quals, potser només els subtipus M1 i M2 semblen estar implicats en la fisiologia de la unió neuromuscular.

Per determinar el perfil farmacològic dels autoreceptors muscarínics acoblats al procés d'alliberació del neurotransmissor acetilcolina (ACh) en les unions neuromuscular de la rata adulta, vam estudiar com agents muscarínics afectaven l'alliberació evocada del neurotransmissor.

La figura 9 mostra l'amplada mitjana dels EPPs, registrada abans (control) i després (1 hora) de la incubació amb els diferents agents muscarínics, expressada com a percentatge de variació. L'efecte d'aquests agents muscarínics en l'amplada de l'EPP en fibres adultes va ser monitoritzat contínuament i durant almenys els primers 60 minuts després de l'aplicació de les drogues al bany.

Vam observar que la Metoctramina ja potenciava als 15 minuts d'afegir-la al bany i als 60 minuts teníem aproximadament un 60% de potenciació. La Pirenzepina bloquejava als 15 minuts de ser aplicada al bany i als 60 minuts el seu bloqueig era d'aproximadament d'un 80%. La 4-DAMP i la Tropicamida no tenien cap acció en la neurotransmissió.

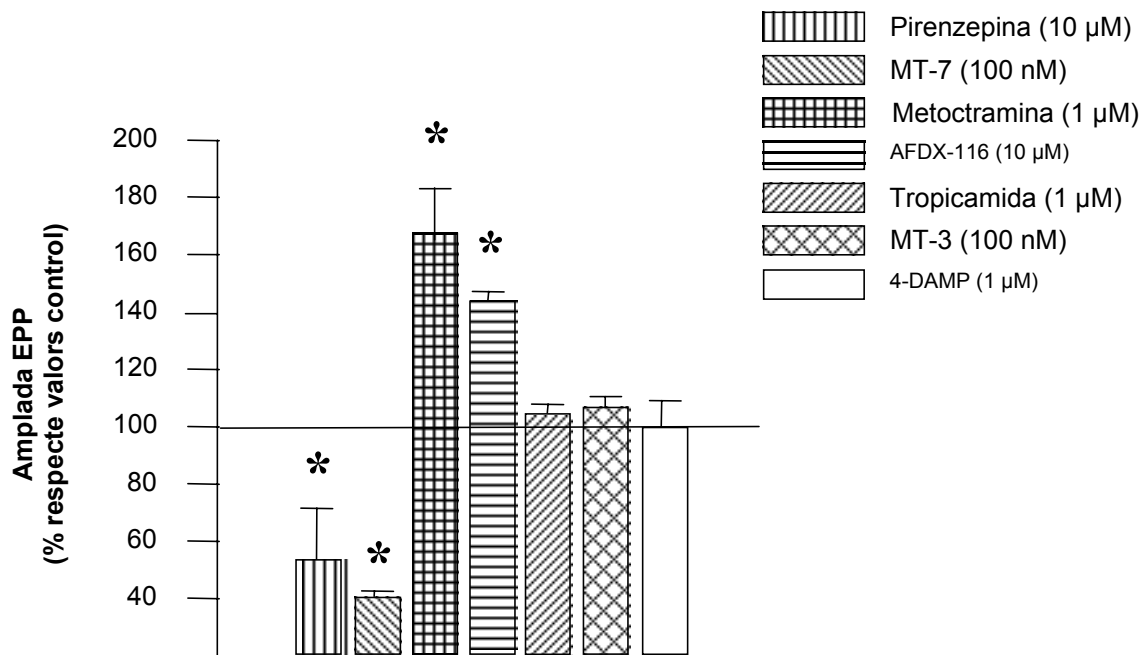


Figura 9. Efecte dels agents muscarínics en l'alliberament del neurotransmissor en animals adults.

Amplada dels EPPs. Solucions de treball: Pirenzepina 10 µM, MT-7 100 nM, Metoctramina 1 µM, AF-DX 116 10 µM, Tropicamida 1 µM, MT-3 100 nM, 4-DAMP 1 µM. Per a cada columna n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte els valors control.

Vam observar que l'amplitud de l'EPP es veia reduïda (~ 65 %) per l'agonista específic del receptor muscarínic M2, Oxotremorina M (1µM; $p < 0.05$, n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul). Aquest fet pot indicar que en les unions neuromusculars adultes hi ha un mecanisme inhibidor de la neurotransmissió regulat pels receptors muscarínics M2. Per constatar aquest resultat vam realitzar experiments amb Metoctramina un antagonista selectiu pel receptor muscarínic M2 (Caulfield, 1993) i vam observar que la Metoctramina (1 µM) augmentava un 67 % l'amplada de l'EPP ($p < 0.05$; n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul; figura 9). Aquest increment era similar al 65 % de reducció en l'alliberació produïda per l'estimulació específica dels

receptors muscarínics M2 mitjançant Oxotremorina M, un agonista específic pel receptor muscarínic M2. També vam realitzar experiments amb el blocador selectiu de M1, Pirenzepina (10 μ M) i vam veure que reduïa en un 47 % l'amplada de l'EPP ($p < 0.05$; $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figura 9) i que el curs temporal de la seva acció (figura 10 B) era similar (però en direcció oposada) a l'increment d'alliberació induït per Metoctramina.

Vam tenir interès en saber com podia afectar a la neurotransmissió l'activació conjunta dels dos receptors muscarínics M1 i M2 mitjançant l'agonista inespecífic Muscarina (10 μ M), i vam obtenir únicament un 8 % de variació en l'alliberament del neurotransmissor ($p > 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figura 10 A). Aquest resultat fa pensar que l'activació global i conjunta dels receptors muscarínics facilitadors i inhibidors de la neurotransmissió mitjançant Muscarina, fa que s'anul·lin els seus respectius efectes observant-se una manca d'acció en la neurotransmissió. És a dir, en la unió neuromuscular de l'adult hi ha receptors M1 que poden augmentar l'alliberació i receptors M2 que poden disminuir l'alliberació quan operen amb ACh endògena.

De manera interessant els antagonistes muscarínics Pirenzepina i Metoctramina afecten l'alliberació del neurotransmissor en gairebé dos camins exactament oposats (una disminució i un augment respectivament) (figura 9 i figures 10 B i 10 D). A més, quan ambdues drogues eren afegides seqüencialment a la preparació muscular, els seus efectes es cancel·laven l'un

amb l'altre. Per exemple, després d'una preincubació amb Pirenzepina (10 μ M), que reduïa l'amplada de l'EPP (percentatge d'inhibició: 54.3 ± 4.6 , $p < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul) una segona incubació amb Metoctramina (1 μ M) restablia els valors control inicials de l'amplada de l'EPP (percentatge de recuperació: 97.3 ± 5.3 , $p > 0.05$, 3 músculs, mínim 15 fibres per múscul). Aquest fet indica clarament l'existència d'un mecanisme que opera amb els 2 receptors muscarínics M1 - M2 independentment, i que modula l'alliberament del neurotransmissor en les unions neuromusculars de la rata adulta. Aquests resultats també mostren que la via intracel·lular mitjançant la qual operen els receptors muscarínics M1 i M2 pot ser diferent.

Per corroborar els resultats obtinguts en relació al receptor muscarínic M1 aplicant Pirenzepina (10 μ M) vam utilitzar la toxina muscarínica MT-7 (100 nM), específica també per aquest receptor, i vam observar un bloqueig en l'amplada de l'EPP de 59.35 %, en la mateixa direcció que el bloqueig obtingut per la Pirenzepina del 47 % ($p < 0.05$; $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figura 9). De la mateixa manera, vam voler corroborar els resultats obtinguts en relació al receptor muscarínic M2 amb l'aplicació de Metoctramina (blocador específic del receptor M2) mitjançant un altre agent antagonista específic per aquest receptor com és l'AF-DX 116 i vam observar que aquest antagonista (10 μ M) ens potenciava l'alliberament del neurotransmissor un 43 %, efecte que és comparable al de potenciació produït per la Metoctramina (1 μ M; figura 9).

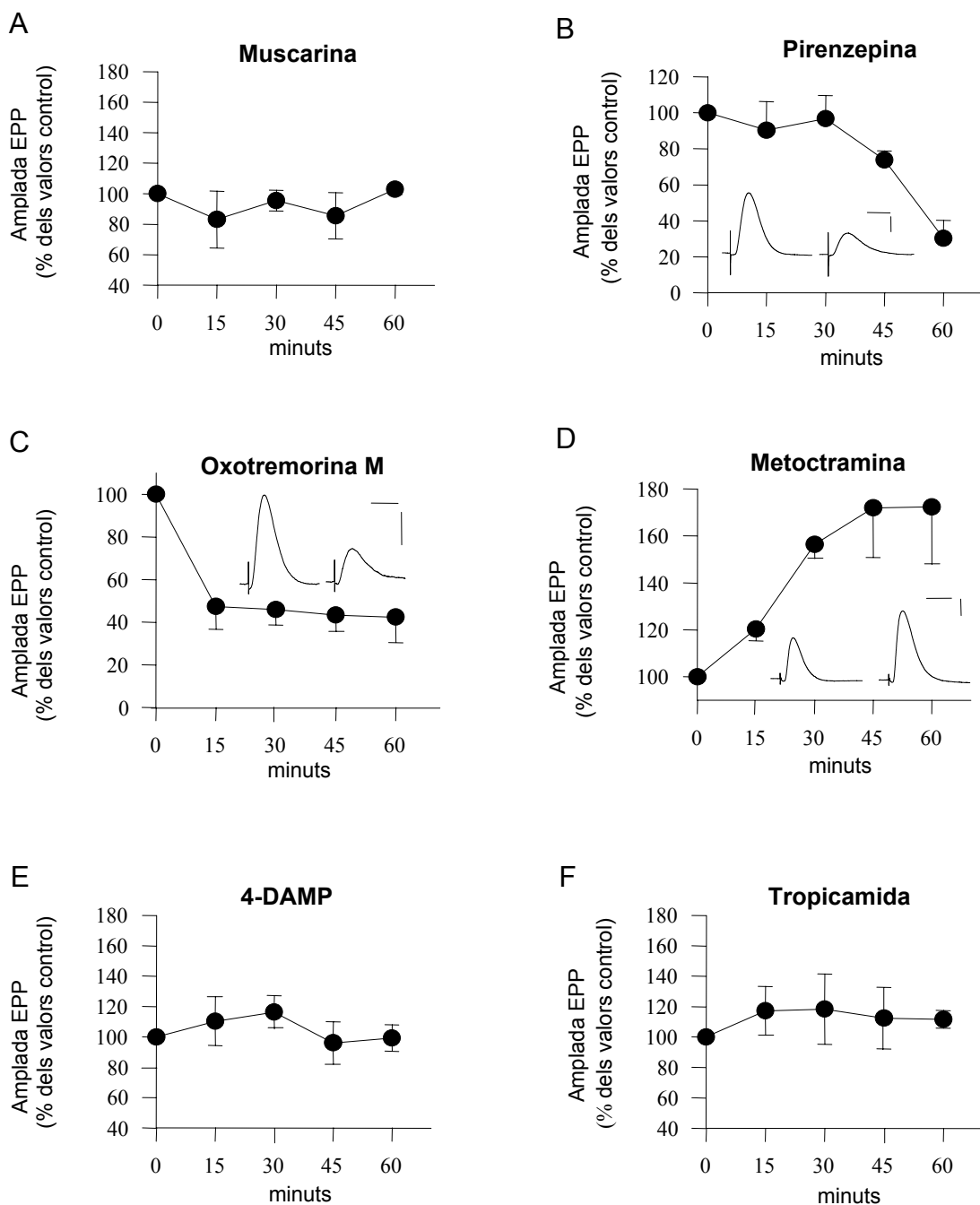


Figura 10. Curs temporal de l'efecte dels agents muscarínics en l'amplada dels EPPs d'animals adults.

Els valors són expressats com a percentatge (mitjana \pm SEM) respecte les amplades control. A les figures B, C i D: exemples de l'acció de drogues en EPPs registrats en les mateixes plaques. Cada traç representa una mitjana de 10 EPPs registrats abans (esquerra) i després (dreta) de 60 minuts de l'aplicació de la droga. Els artefactes són modificats per una major claredat. Escala, horitzontal: 5 ms en B, D i 3 ms en C, vertical: 5 mV en D, B i 4 mV en C. Solucions de treball: Muscarina 50 μ M (A), Pirenzepina 10 μ M (B), Oxotremorina M 1 μ M (C), Metoctramina 1 μ M (D), Tropicamida 1 μ M (F), 4-DAMP 1 μ M (E). N = 4-6 fibres individuals per droga.

Aquests resultats doncs ens reafirmen que en la unió neuromuscular de l'adult hi ha receptors M1 i M2 que poden modular l'alliberació del neurotransmissor quan operen amb ACh endògena.

En el múscul adult no vam trobar evidència de l'existència dels receptors muscarínics M3 i M4 perquè l'amplada de l'EPP no es va veure afectada pels seus antagonistes muscarínics específics, 4-DAMP (1 μ M), específic per M3, Tropicamida (1 μ M), i toxina muscarínica 3 (MT-3; 100 nM), específics per M4. El percentatge de canvi va ser d'un 5, 10 i 7 % respectivament (en el tres casos: $p > 0.05$; figura 9 i figures 10 E i 10 F).

En resum, els mAChRs M1 i M2 semblen modular l'alliberació del neurotransmissor en les unions neuromusculars del múscul LAL de rates adultes.

IV.1.2- Rol dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh de les unions neuromusculars de rates adultes

En motoneurons de mamífer adult la transmissió neuromuscular depèn en gran mesura de l'entrada de Ca^{2+} provinent del medi extern via els canals de calci dependents de voltatge (VDCC; Katz i Miledi, 1970) especialment del tipus P/Q (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowercox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995).

En les unions neuromusculars adultes, la toxina blocadora del canal de calci tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA; 100 nM), redueix significativament l'amplada de l'EPP quan és aplicada sola (percentatge de bloqueig d'aproximadament 75 %, $p < 0.05$).

Per comprovar si l'acció dels receptors M1 i M2 està relacionada amb els VDCC vam realitzar experiments incubant amb ω -Aga-IVA (toxina blocadora del canal P) i vam observar que aquesta toxina impedia l'efecte potenciador de la Metoctramina (percentatge de canvi de $4.23 \% \pm 2.40$, $p > 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figures 11 A i 11 C esq.) i l'efecte inhibitor de la Pirenzepina (percentatge de canvi de $3.21 \% \pm 1.30$, $p > 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figures 11 B i 11 C dreta). Es a dir, si inhibíem l'entrada de Ca^{2+} per mitjà d'aquest canal els autoreceptors muscarínics es veien afectats.

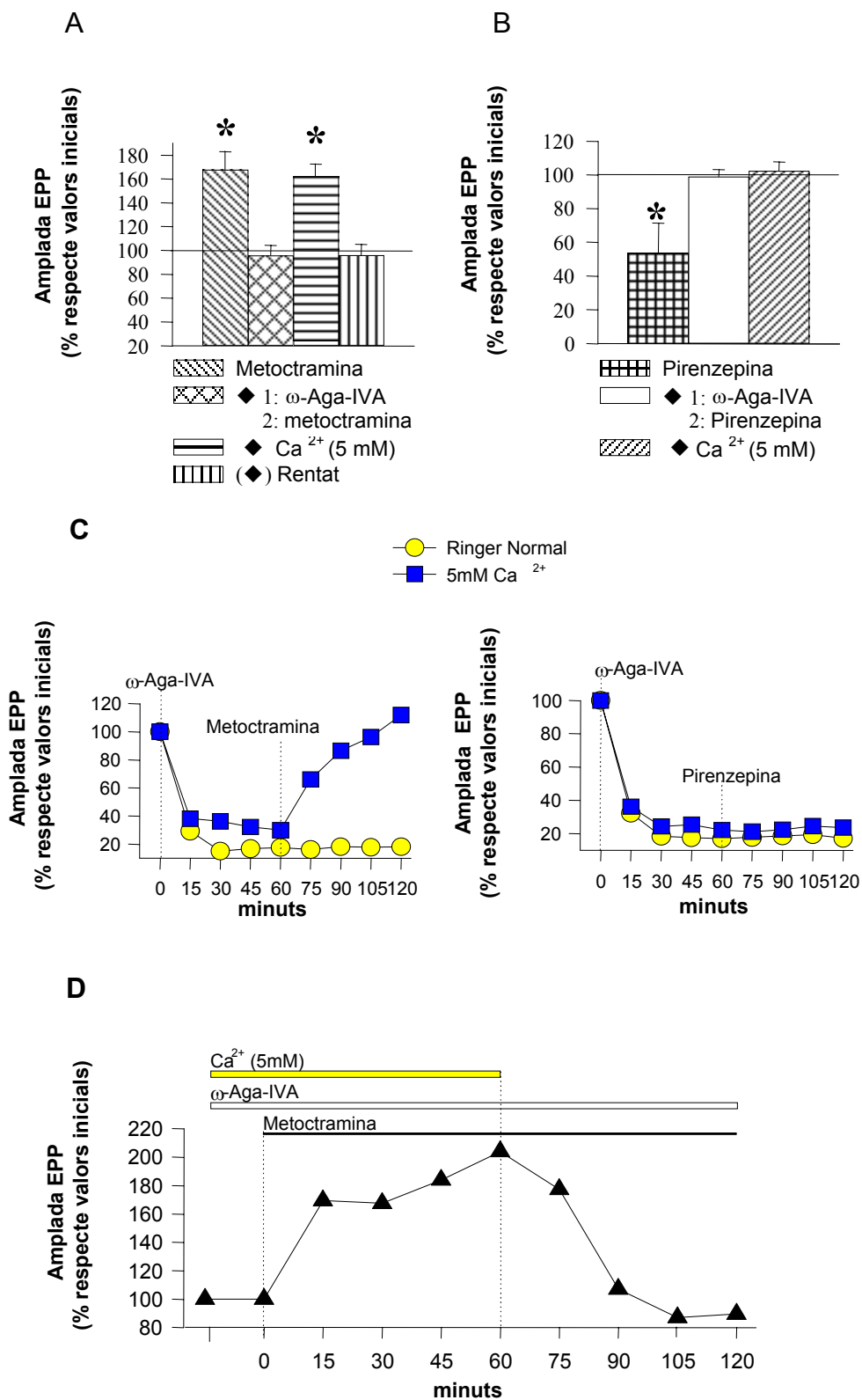


Figura 11. Efecte dels antagonistes M1 i M2 en EPPs adults quan el canal de calci tipus P és blocat. (peu de figura a la pàgina següent).

Figura 11. Efecte dels antagonistes M1 i M2 en EPPs adults quan el canal de calci tipus P és blocat.

Els valors són expressats com a percentatge (mitja \pm SEM) respecte l'amplada mitjana inicial.

A: Primera columna: Efecte de la Metoctramina (1 μ M) en les unions neuromusculars adultes. Segona columna: Efecte de la Metoctramina en l'amplada dels EPPs en presència d' ω -Agatoxina-IVA (100 nM) \blacklozenge . Tercera columna: experiments \blacklozenge realitzats en un medi enriquit en calci (5 mM). Quarta columna: \blacklozenge experiments realitzats en alt calci i després rentats (100 ml, 1 h) en una solució Ringer Normal contenint Metoctramina i ω -Agatoxina-IVA (l'alt calci era rentat).

B: Primera columna: Efecte de la Pirenzepina (10 μ M) en les unions neuromusculars adultes. Segona columna: Efecte de la Pirenzepina en l'amplada dels EPPs en presència d' ω -Agatoxina-IVA (100 nM) \blacklozenge . Tercera columna: aquest experiment \blacklozenge realitzat en un medi enriquit en calci (5 mM).

C: Exemples d'experiments en fibra única. Efecte en el temps de la Metoctramina (esquerra) i la Pirenzepina (dreta) en Epps enregistrats en les mateixes unions neuromusculars en Ringer Normal (punts) i en alt calci (quadrat). Aquests quatre experiments van ser realitzats en presència d' ω -Agatoxina-IVA.

D: Exemple de l'efecte de la Metoctramina en presència d'alt calci i ω -Agatoxina-IVA i després de la retirada del calci, en una mateixa unió neuromuscular.

Per cada columna n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

Sembla ser que ambdós mecanismes muscarínics d'alliberació del neurotransmissor, modulats pels receptors M1 i M2 involucren el canal de Ca^{2+} P/Q. Tanmateix, trobem una substancial diferència entre tos dos muscarínics, M1 i M2.

Per veure si els receptors muscarínics depenen del canal de calci concretament o de l'entrada de calci al seu través, vam fer estudis incubant la mostra amb la toxina blocadora del canal P ω -Aga-IVA en un Ringer ric amb calci (5 mM). En aquestes circumstancies experimentals vam poder observar que la Pirenzepina no tenia cap acció en la neurotransmissió (3.07 % \pm 1.70 de canvi, $p > 0.05$, n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul; figures 11 B i 11 C dreta) però, l'acció de la Metoctramina continuava sent ben clara (percentatge d'augment de l'alliberació sobre un 72.59 % \pm 7.30, $p < 0.05$, n = 5 músculs,

mínim 15 fibres per múscul; figures 11 A i 11 C esq.). Si realitzàvem un rentat amb Ringer Normal veiem que era revertida la seva acció (percentatge de recuperació: 96 %, n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul; figures 11 A i 11 D) és a dir, recuperàvem la feina de la Metoctramina.

En resum, el mecanisme del receptor M1 pot estar relacionat únicament amb el VDCC tipus P/Q, mentre que el mecanisme del receptor M2 sembla estar relacionat només amb un augment de l'entrada de Ca^{2+} a nivell general, sense estar lligat a un canal de Ca^{2+} en concret.

Per estar segurs de l'efecte de l' ω -Aga-IVA en presència de nivells elevats de Ca^{2+} en la preparació muscular vam realitzar diferents experiments control.

En presència de Ca^{2+} 5 mM l'amplada mitjana de l'EPP era més gran que en Ringer Normal (percentatge d'augment: $124.90 \% \pm 3.11$, $p < 0.05$, n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul).

No obstant, l' ω -Aga-IVA podia disminuir l'amplada de l'EPP en un medi Ringer ric en Ca^{2+} 5 mM (inhibició: $66.72 \% \pm 3.38$, $p < 0.05$, n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul) de la mateixa manera que en Ringer Normal (inhibició: $75.03 \% \pm 7.15$, $p < 0.05$, n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul). Per tant, el canal Ca^{2+} tipus P/Q era blocat efectivament en els experiments realitzats amb Ca^{2+} extracel·lular alt.

Tanmateix, quan l'alt Ca^{2+} (5 mM) era afegit a la preparació prèviament blocada amb ω -Aga-IVA, l'alliberació del neurotransmissor es veia augmentada ($201.01 \% \pm 34.01$, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul).

Aquests resultats demostren, que el Ca^{2+} extern pot entrar encara que el canal Ca^{2+} tipus P/Q estigui blocat, i suggereix que de fet, el mecanisme del receptor M2 depèn només d'una quantitat de Ca^{2+} intracel·lular suficient i no dels VDCC implicats en conduir la seva entrada.

IV.2- UNIONS NEUROMUSCULARS NOUNADES.

En el naixement aproximadament totes les unions neuromusculars en el múscul LAL són innervades per més d'un axó (95.86 % \pm 2.43) ens els dies subsegüents aquesta multiinnervació va decreixent i ja en el sisè dia de vida postnatal, el percentatge d'innervació múltiple és reduït prop del 50 % (50,85 \pm 1.36, $p < 0.05$).

Entre el tercer i sisè dies de vida postnatal, al voltant de la meitat de les unions neuromusculars entren en el procés final de competició axonal i esdevenen, transitòriament, doblement innervades abans d'assolir l'estat monoinnervat (Lanuza i cols., 2001; Santafé i cols., 2001).

IV.2.1-SINAPSIS MONOINNERVEDES

IV.2.1.1- Estudi de l'efecte dels agents muscarínics antagonistes en l'alliberació evocada d'ACh en les unions neuromusculars monoinnervades

Com hem comentat anteriorment, hi ha evidències que els receptors muscarínics presinàptics estan implicats en processos neurodegeneratius observats en diferents trastorns com és el cas de la demència d'Alzheimer i el trastorn de Parkinson entre d'altres. Aquests trastorns estan relacionats amb processos d' inestabilització, desconexió axonal i mort neuronal amb pèrdua

progressiva de sinapsis. Nosaltres vam voler estudiar la implicació dels receptors muscarínics presinàptics en el procés de desconexió axonal, anomenat eliminació sinàptica que succeeix en el desenvolupament, per així ampliar el coneixement sobre l'acció fisiològica bàsica i l'interès terapèutic d'aquests receptors. Per aquest motiu vam utilitzar diferents antagonistes selectius per a cada un d'aquests receptors, per veure com afectaven l'alliberació del neurotransmissor.

En aquest apartat s'exposen les dades obtingudes de l'estudi realitzat amb els antagonistes selectius dels diferents receptors muscarínics, en unions monoinnervades d'animals nous, d'edats compreses entre els 3 i 6 dies de vida postnatal. Les dades de les quatre edats (3, 4, 5, i 6 dies) es van agrupar perquè no es van trobar diferències per a cap de les drogues muscaríniques entre els diferents dies ($p > 0.05$). En aquest període postnatal i com era d'esperar, tots els EPPs tenien un contingut quàntic més baix, una latència més alta i els seus temps de pujada eren relativament més lents que els trobats en els animals adults.

Vam poder observar que l'aplicació de Pirenzepina (10 μ M), agent antagonista selectiu del receptor muscarínic M1, reduïa l'alliberació d'ACh un 50.28 % \pm 6.43 ($p < 0.05$; figura 12 A i B). Aquest efecte de la Pirenzepina era similar a la reducció de l'amplada trobada en l'adult (47 %, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; veure Santafé i cols., 2003).

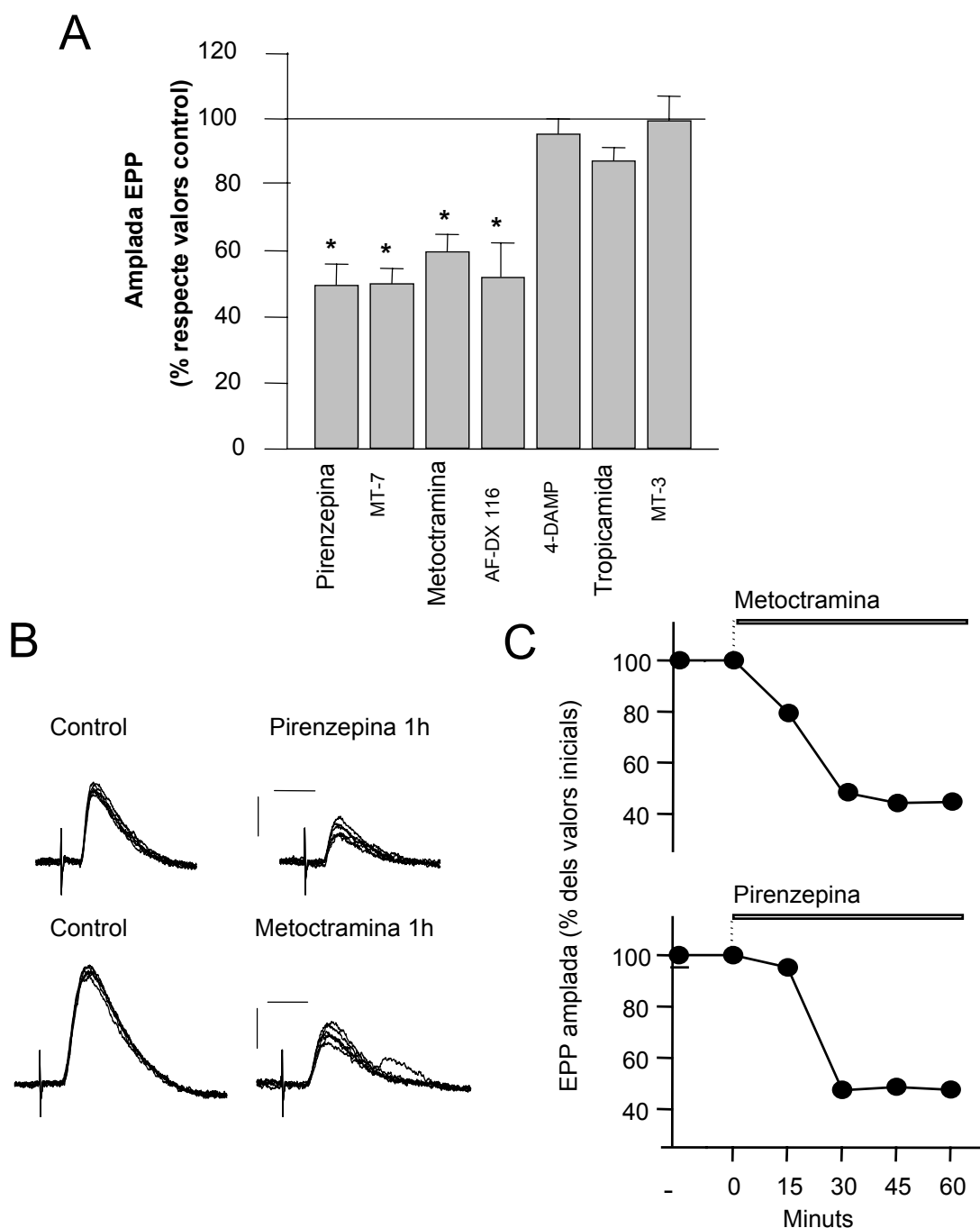


Figura 12. Efectes dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada de l'EPP en unions monoinnervades

12 A: Acció de set antagonistes muscarínics selectius: Pirenzepina (10 μ M) i MT-7 (100 nM) per M1. Metoctramina (1 μ M) i AF-DX 116 (10 μ M) per M2. 4-DAMP (1 μ M) per M3. Tropicamida (1 μ M) i MT-3 (100 nM) per M4.

Les columnes són percentatges dels valors inicials (mitjana \pm SEM).

Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

12 B: Exemples de registres amb els traços superposats per les accions de la Pirenzepina (10 μ M) i la Metoctramina (1 μ M). Els EPPs són obtinguts en fibres musculars monoinnervades que eren contínuament monitoritzades durant 60 minuts abans i després de l'aplicació de les drogues al bany. Els artefactes han estat modificats per una major claredat. Escala: horitzontal: 10 ms, vertical: 4 mV pel pic i 2 mV per la base.

12 C: Exemple de fibra única per les accions de la Pirenzepina (10 μ M) i Metoctramina (1 μ M).

Aquest fet ens fa pensar en l'existència d'un mecanisme d'augment de l'alliberació del neurotransmissor que opera per mitjà del receptor M1 i sensible a la Pirenzepina, el qual actua en les unions neuromusculars monoïnnervades dels nadons de rata quan operen amb ACh endògena.

Per altra banda, la Metoctramina (1 μ M), agent antagonista selectiu del receptor muscarínic M2, també causava una disminució en l'amplada dels EPP d'un 40.19 % \pm 5.18 ($p < 0.05$; figura 12 A i B) similar a la disminució produïda per la Pirenzepina. Aquesta acció però, era oposada a la seva acció en l'adult on podíem observar un 67 % d'augment en l'amplada dels EPP (veure Santafé i cols., 2003).

L'activació fisiològica del mecanisme modulats o regulats per ambdós muscarínics M1 i M2 mitjançant ACh endògena potencia l'alliberació del neurotransmissor en les unions neuromusculars monoïnnervades del nadó. Tanmateix, el perfil adult del bloqueig del receptor M2 per mitjà de la Metoctramina pot ser completament diferenciat i observat a les dues setmanes de vida postnatal (percentatge de potenciació causat per Metoctramina en rates de 15 dies: 73.94 \pm 11.78, $p < 0.05$; aquest efecte de la Metoctramina en rates de 15 dies no és significativament diferent a l'observat en l'adult, $p > 0.05$).

Quan la Metoctramina i la Pirenzepina eren sumades seqüencialment la disminució de l'alliberació d'ACh produïda per la primera droga no es veia modificada per la segona droga. Per exemple, després d'una primera amplada d'EPP reduïda per la Metoctramina un 40.87 % \pm 6.23, ($p < 0.05$) la incubació

amb Pirenzepina no afectava l'amplada de l'EPP (percentatge de variació de 0.58 ± 11.70 , $p < 0.05$).

Aquest fet ens fa suggerir una via intracel·lular comú pels mecanismes dels receptors muscarínics M1 i M2, a diferència dels resultats observats en l'adult on sembla operar una via intracel·lular diferent per als dos receptors muscarínics presinàptics.

Així doncs, en les unions neuromusculars monoinnervades d'animals nous, ambdós agents muscarínics, Metoctramina i Pirenzepina, redueixen l'amplada de l'EPP. Tanmateix, uns dies més tard concretament 2 setmanes de desenvolupament postnatal, els receptors muscarínics M2 poden canviar fins adoptar la tasca d'autoinhibició (*feedback*) negativa descrita en l'adult.

De la mateixa manera que en els animals adults, en els nadons també vam voler corroborar els resultats obtinguts amb la Pirenzepina i la Metoctramina mitjançant dues drogues també específiques per als receptors muscarínics M1 i M2, la toxina muscarínica 7 (MT-7) i l' AF-DX 116, respectivament. A la figura 12 A podem observar que la MT-7 (100 nM) reduïa un 49.72 % l'amplada dels EPPs, reducció similar a la que ja observàvem amb la Pirenzepina (50.28 %). L'AF-DX 116 (10 µM), per altra banda, també ens bloquejava l'alliberació del neurotransmissor un 47.94 %, bloqueig que també era observat amb la Metoctramina (40.19 %).

Igual que en els animals adults, l'amplada de l'EPP no era modificada per l'agent antagonista selectiu del receptor muscarínic M3, 4-DAMP (1 μ M) i els agents antagonistes selectius del receptor muscarínic M4, Tropicamida (1 μ M) i toxina muscarínica 3 (MT-3; 100 nM) (percentatge de canvi de 9.63 ± 4.56 , 12.66 ± 3.91 i 10.98 ± 2.36 , respectivament, en els tres casos: $p > 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul; figura 12 A).

IV.2.1.2.- Rol dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh de unions neuromusculars monoïnnervades de rates nounats

En les motoneurons de mamífer nounat la neurotransmissió també depèn de l'entrada de Ca^{2+} del medi extern via els canals de calci dependents de voltatge (VDCC) que hi ha en el terminal nerviós. En el nadó, a més del tipus P també estan descrits els canals de tipus L i N (Sugiura i Ko, 1997; Rosato-Siri i Uchitel, 1999). Concretament les sinapsis monoïnnervades de nounat presenten els canals de calci (VDCC) tipus P/Q i N (Santafé i cols., 2001). El blocador del canal de calci P, ω -Agatoxina- IVA (ω -Aga-IVA; 100 nM), redueix l'amplada de l'EPP significativament, aproximadament un 80 %. El blocador del canal de calci N, ω -Conotoxina- GVIA (ω -CgTx-GVIA; 1 μ M) també redueix l'amplada de l'EPP aproximadament un 60 %. No obstant, el blocador del canal de calci L, Nitrendipina (1 μ M), no afecta significativament l'amplada de l'EPP (Santafé i cols., 2001).

Per aquest motiu vam voler estudiar si una incubació prèvia amb els diferents blocadors dels canals de calci (VDCC) afectaven la inhibició de l'alliberació d'ACh induïda per Metoctramina i Pirenzepina en les sinapsis monoïnnervades de nadons de rata de 3 a 6 dies de vida postnatal.

I vam observar que, la incubació prèvia amb Nitrendipina o ω -CgTx-GVIA no prevenia l'efecte de la Pirenzepina ni de la Metoctramina en l'alliberació del neurotransmissor. La inhibició induïda per la Metoctramina era d'un 34.86 % \pm

3.31 en presència de Nitrendipina i d'un $51.40 \% \pm 0.74$ en presència de ω -CgTx-GVIA (ambdós casos: $p < 0.05$, $n = 5$ músculs. I la inhibició induïda per la Pirenzepina era d'un $43.11 \% \pm 5.15$ en presència de Nitrendipina i d'un $51.40 \% \pm 0.74$ en presència de ω -CgTx-GVIA (ambdós casos: $p < 0.05$, $n = 5$ músculs; figura 13).

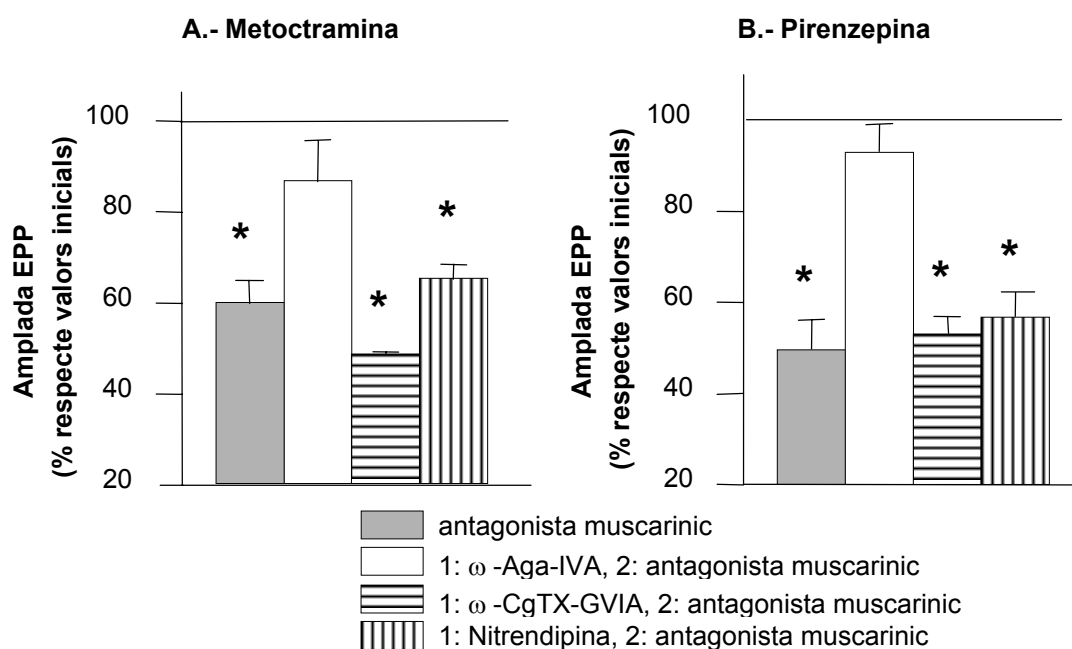


Figura 13. Efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina en els EPPs de unions monoinnervades quan un VDCC és blocat.

A: Primera columna: Efecte de la Metoctramina (1 μ M) en EPPs solitaris de rates nounats. Segona columna: Efecte de la Metoctramina en les amplades dels EPPs en presència d' ω -Agatoxina-IVA (100 nM). Tercera columna: Efecte de la Metoctramina en les amplades dels EPPs en presència d' ω -Conotoxina-GVIA (100 nM). Quarta columna: Efecte de la Metoctramina en les amplades dels EPPs en presència de Nitrendipina (1 μ M).

B: Primera columna: Efecte de la Pirenzepina (10 μ M) en EPPs solitaris de rates nounats. Segona columna: Efecte de la Pirenzepina en les amplades dels EPPs en presència d' ω -Agatoxina-IVA (100 nM). Tercera columna: Efecte de la Pirenzepina en les amplades dels EPPs en presència d' ω -Conotoxina-GVIA (100 nM). Quarta columna: Efecte de la Pirenzepina en les amplades dels EPPs en presència de Nitrendipina (1 μ M).

Noteu que només el blocador del canal P, ω -Agatoxina-IVA (100 nM), sembla estar implicat en l'acció de la Metoctramina i la Pirenzepina.

Les columnes són percentatge (mitja \pm SEM) dels valors inicials. Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

Tanmateix, el blocador del VDCC tipus P/Q, ω -Aga-IVA, no permetia que la Pirenzepina ni la Metoctramina tinguessin el seu efecte específic (percentatge de canvi de 6.97 ± 5.84 i 8.66 ± 9.02 respectivament, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs, en ambdós casos; figura 13).

Per comprovar si els mecanismes dels mAChRs M1 i M2 es troben estretament lligats al canal calci P/Q pròpiament, o més bé a l'entrada de calci pel seu través vam realitzar experiments en presència d'elevat calci extracel·lular (5 mM). I vam poder comprovar que ω -Aga-IVA també prevenia l'efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina (percentatge de canvi: 5.06 ± 5.35 i 19.15 ± 6.23 respectivament, $p > 0.05$, $n = 5$ músculs, en ambdós casos).

Aquests experiments demostren la dependència amb el VDCC tipus P/Q dels mAChRs, M1 i M2, en les unions neuromusculars monoinnervades del nounat .

Per estar segurs de l'efecte de l' ω -Aga-IVA en presència d'alt Ca^{2+} vam realitzar diferents experiments control. I vam observar que en presència de 5 mM de Ca^{2+} , l'amplada mitjana era més alta que en Ringer Normal (~ 125% d'augment de l'alliberament; $p < 0.05$, $n = 5$ músculs). No obstant, l' ω -Aga-IVA podia inhibir l'amplada de l'EPP en 5 mM de Ca^{2+} (~ 67 %; $p < 0.05$, $n = 5$ músculs) de la mateixa manera que en Ringer Normal (~ 75 %; $p < 0.05$, $n = 5$ músculs).

Per tant, el VDCC tipus P/Q era blocat efectivament en els experiments realitzats amb alt Ca^{2+} . No obstant, quan afegíem el Ca^{2+} a una preparació

prèviament blocada amb ω -Aga-IVA , l'alliberació era augmentada ($\sim 201\%$; $p < 0.05$, $n = 5$ músculs). Aquest resultat mostra que el Ca^{2+} pot entrar encara que el canal P/Q estigui blocat.

En resum, a les sinapsis monoinnervades del nadó tant la Pirenzepina com la Metoctramina redueixen la neurotransmissió en la mateixa magnitud. A més, els respectius efectes d'aquestes drogues no són sumatius i depenen dels VDCC tipus P/Q. El què ens suggereix l'existència d'un mecanisme modulats pels autoreceptors mAChRs M1 i M2 que promou l'augment de l'alliberació d'ACh en el terminal axònic que esdevé estable en la unió neuromuscular. Aquesta potenciació de la neurotransmissió pot contribuir al triomf competitiu final d'aquest terminal nerviós.

IV.2.2-SINAPSIS DOBLES

El tema central d'aquest treball és avaluar com poden participar els receptors muscarínics en l'alliberació d'ACh en ambdós terminals, gran i petit, que innerven les unions duals en les sinapsis neuromusculars en desenvolupament (figura 14). En rates de 3 a 6 dies d'edat, el percentatge mig d'EPPs generats pels dos axons en les plaques doblement innervades és de 3.81 ± 0.50 (n = 54 fibres).

En un estudi previ (Santafé i cols., 2001), es va trobar que el percentatge de sinapsis doblement innervades romanien constants al voltant dels dies 3 i 6 de vida postnatal ($19.80 \% \pm 2.41$ i 23.40 ± 1.36 , durant els dies 3 i 6 respectivament; $p > 0.05$) ja que les sinapsis amb 3 o més axons disminuïen i les sinapsis monoinnervades augmentaven.

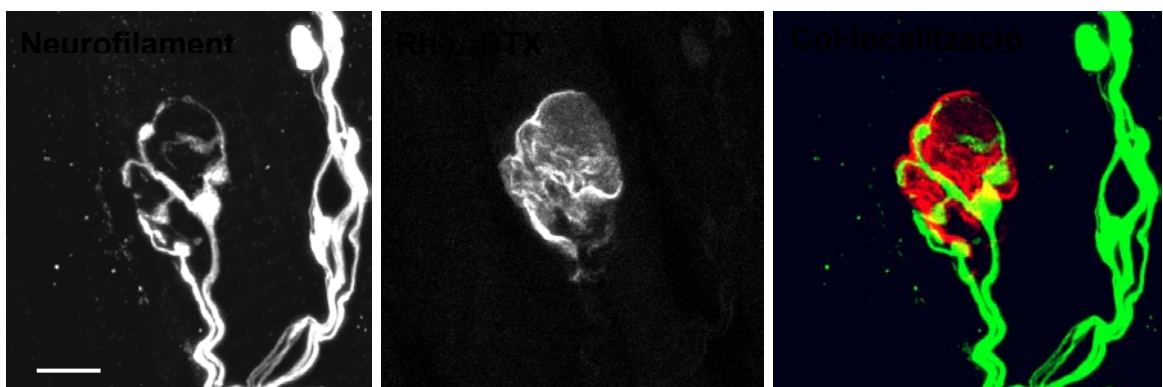


Figura 14. Imatge representativa de les unions neuromusculars doblement innervades en múscul LAL de nadó de rata (P6).

Els receptors d'ACh nicotínics són tenyits amb α -Bungarotoxina conjugada a rodamina i els axons són marcats amb un anticòs anti-neurofilament 200 (detalls tècnics, Lanuza i cols., 2002). Barra d'escala = 10 μ m.

VI.2.2.a. L'EPP gran de les unions duals

IV.2.2.a.1.- Efecte dels agents muscarínics antagonistes en l'alliberació d'ACh en l'EPP gran de les unions duals

Estudiant l'efecte de l'antagonista selectiu del receptor muscarínic M1, Pirenzepina (10 μ M), es va poder observar que induïa una reducció d'un 24.28 % \pm 1.68 en l'alliberació del neurotransmissor, la qual cosa indica que els receptors muscarínics M1 estan acoblats a un mecanisme d'augment de la neurotransmissió en l'EPP gran de les unions neuromusculars duals ($p < 0.05$; $n = 5$ músculs; figures 15, 16 i 17). No obstant, aquesta reducció de la neurotransmissió induïda per Pirenzepina era menor ($p < 0.05$) que la reducció obtinguda en les unions monoinnervades (40 %) o en l'adult (47 %; Santafé i cols., 2003).

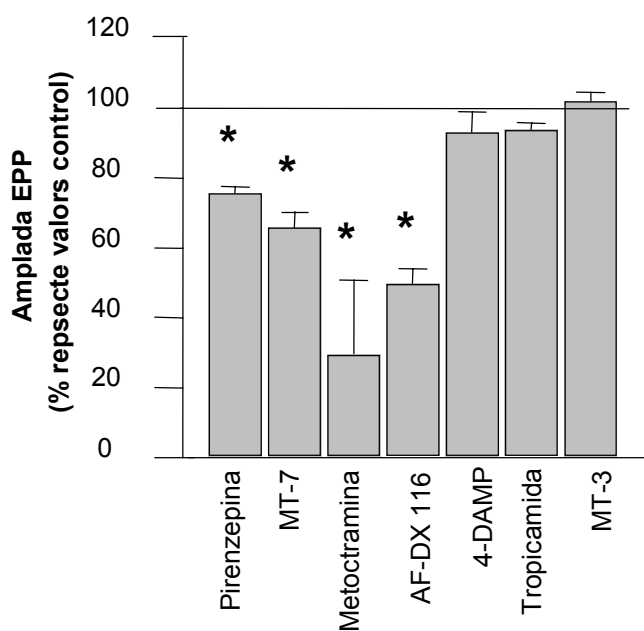


Figura 15. Efecte dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPPs, en els EPP gran de les unions doblement innervades.

Pirenzepina (10 μ M) i MT-7 (100 nM) per M1. Metoctramina (1 μ M) i AF-DX 116 (10 μ M) per M2. 4-DAMP (1 μ M) per M3. Tropicamida (1 μ M) i MT-3 (100 nM) per M4. Noteu que la resposta de l'EPP gran als agents muscarínics s'assembla a la del terminal solitari de les unions monoinnervades (veure figura 12).

Les columnes són percentatges dels valors inicials (mitja \pm SEM). Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

De la mateixa manera que en les unions monoinnervades de nadons, vam observar que l'antagonista selectiu d'M2, Metoctramina, reduïa l'amplada de l'EPP gran (% inhibició: $70.45 \% \pm 21.16$, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs; figures 15, 16 i 17).

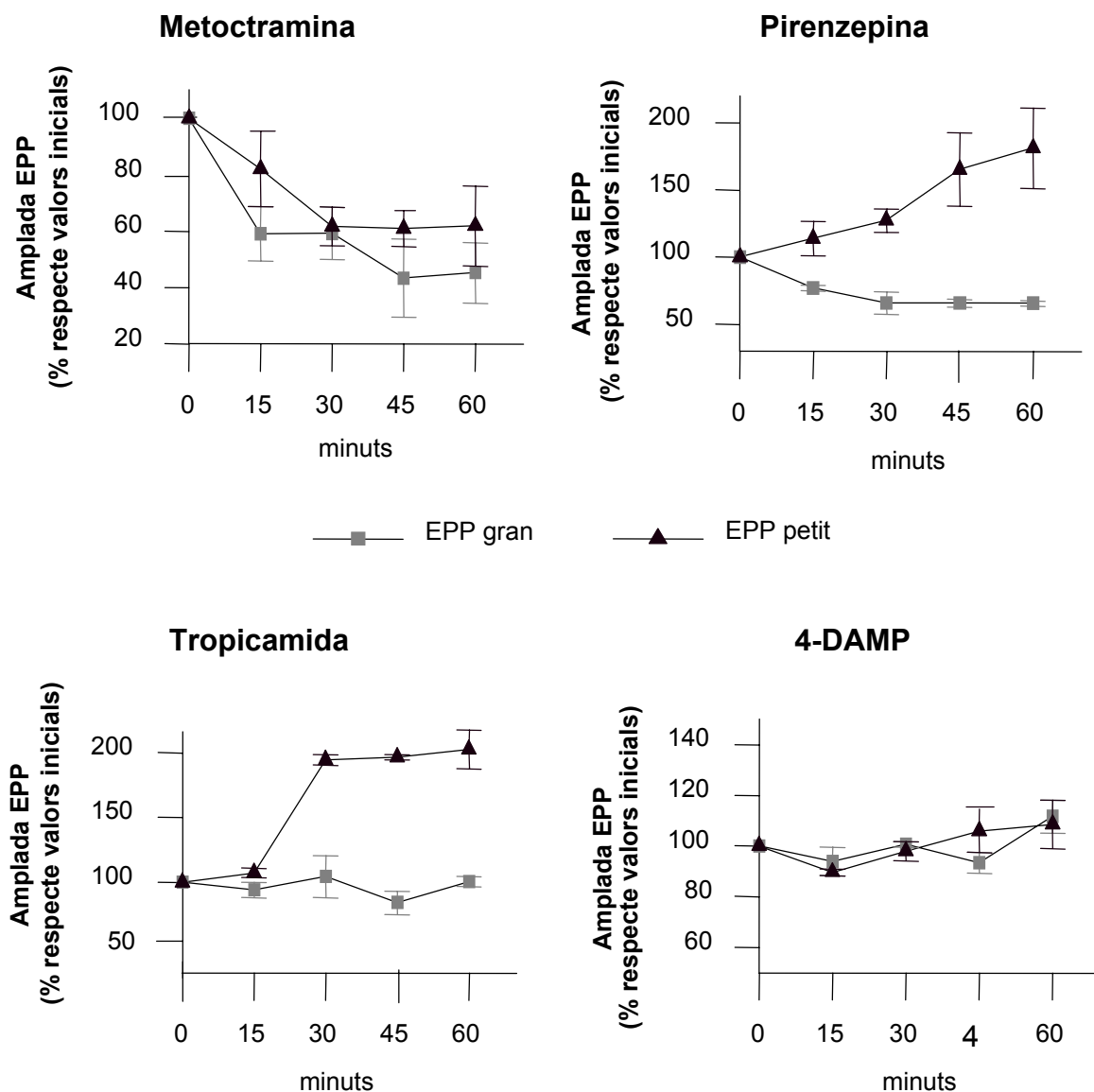


Figura 16. Efectes dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPP en l'EPP gran i l'EPP petit de les sinapsis doblement innervades.

Curs temporal de l'efecte de la Metoctramina ($1 \mu\text{M}$), Pirenzepina ($10 \mu\text{M}$), Tropicamida ($1 \mu\text{M}$) i 4-DAMP ($1 \mu\text{M}$), en l'amplada dels EPP en EPPs grans i petits en fibres musculars simples contínuament monitoritzades durant 60 minuts després d'afegir una de les drogues al bany. Els valors són expressats com a percentatge (mitja \pm SEM) respecte l'amplada control. $n = 6$ fibres úniques per droga.

També en aquest cas vam voler corroborar els resultats obtinguts mitjançant uns altres antagonistes selectius dels receptors muscarínics M1 i M2, la toxina muscarínica 7 (MT-7) i l'AF-DX 116 respectivament, i es va comprovar que en l'EPP gran de les unions duals la MT-7 (100 nM) provocava un $34.18 \% \pm 4.44$ d'inhibició ($p < 0.05$) en la mateixa direcció que la Pirenzepina la qual, com hem vist anteriorment, també inhibia l'alliberament del neurotransmissor un $24.28 \% \pm 4.31$ ($p < 0.05$). Per altra banda, l'AF-DX 116 (10 μ M) ens bloquejava un $50.30 \% \pm 4.31$ l'EPP gran, de la mateixa manera que la Metoctramina que en feia un bloqueig d'un $70.45 \% \pm 21.16$ ($p < 0.05$). En tots els casos $n = 5$ músculs (figura 15).

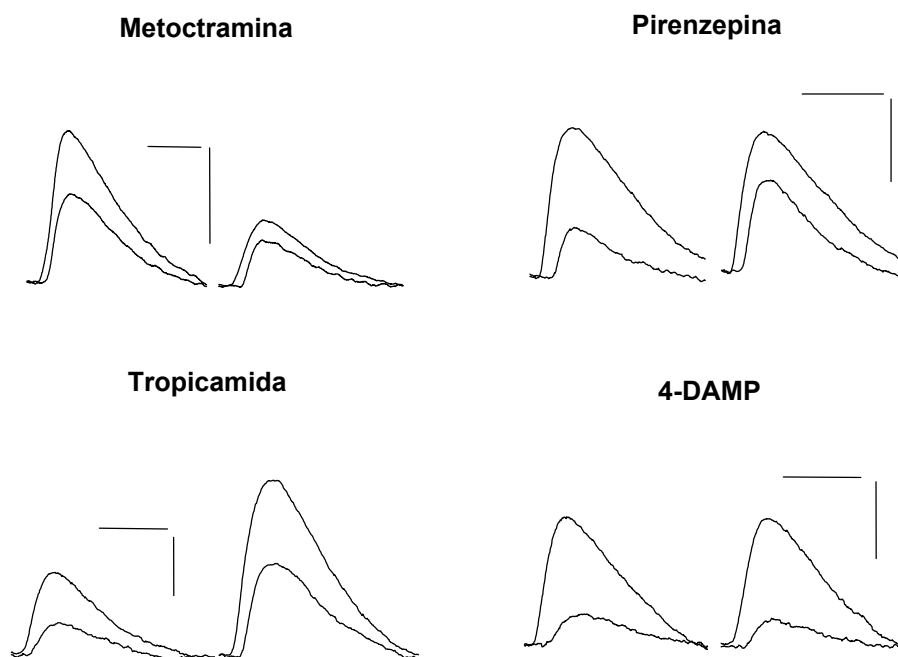


Figura 17. Exemples de l'acció dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPP en l'EPP gran i l'EPP petit de les sinapsis doblement innervades.

Exemples de l'acció de la Metoctramina (1 μ M), Pirenzepina (10 μ M), Tropicamida (1 μ M) i 4-DAMP (1 μ M) en EPPs (EPP gran i petit) registrats en la mateixa unió neuromuscular. Cada traç representa una mitjana de 10 EPPs registrats abans (esq.) i després (dreta) de 60 minuts de l'aplicació de la droga. Els artefactes són eliminats per claredat. Barres d'escala: horitzontal, 10 ms; vertical, 5 mV.

De la mateixa manera que en les sinapsis monoinnervades, l'efecte de l'antagonista M1 no era sumatiu amb l'efecte de l'antagonista M2, el que ens ve a indicar l'existència de una via intracel·lular comú per als dos receptors.

Per altra banda, igual que en les sinapsis monoinnervades de nadó i en els adults, no es van trobar indicis de l'existència dels autoreceptors muscarínics presinàptics tipus M3 (sensibles a 4-DAMP; 1 μ M) i tipus M4 (sensibles a Tropicamida; 1 μ M i a toxina muscarínica 3 (MT-3); 100 nM), (percentatge de canvi: 6.85 ± 5.67 , 6.20 ± 2.03 i 1.92 ± 2.50 , respectivament; $p > 0.05$, $n = 5$ músculs, en els tres casos; figures 15, 16 i 17).

En resum, sembla que la resposta del terminal gran en les unions duals als agents muscarínics és similar a la resposta del terminal nerviós solitari de les plaques monoinnervades recentment establertes. Aquest fet suggereix que l'EPP gran pot ser produït per l'axó que sobreviu la competició.

IV.2.2.a.2- Rol dels canals de calci depenents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh en l'EPP gran de les unions duals

En les fibres doblement innervades, el blocador del canal de calci tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA), el blocador del canal de calci tipus L, Nitrendipina i el blocador del canal de calci tipus N, ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTx- GVIA), reduïen l'EPP gran en un 74,42 % \pm 15.32, 70.91 % \pm 10.04, i 69.25 % \pm 7.5, respectivament ($p < 0.05$ en tots els casos; Santafé i cols., 2001).

Aquest fet indica que l'alliberació d'ACh en el terminal nerviós que finalment esdevé el guanyador de la competició axonal depèn de tots els tipus de canals de Ca^{2+} . L'axó que sobreviu sembla garantir la màxima entrada de Ca^{2+} a través de tots els canals de Ca^{2+} practicables i sembla ser que aquests canals estan directament relacionats amb l'alliberació del neurotransmissor.

No obstant, en els experiments realitzats vam trobar que la relació o acoblament dels canals de Ca^{2+} amb els mecanismes dels autoreceptors muscarínics presinàptics M1 i M2 era diferent (figura 18).

La preincubació amb ω -CgTx-GVIA no podia prevenir completament l'efecte de la Pirenzepina. La inhibició de la Pirenzepina en presència de ω -CgTx-GVIA era de 33.21 % \pm 0.19, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs; figura 18). Tanmateix, l'efecte de la Pirenzepina només es veia anul·lat completament quan preincubàvem amb ω -Aga-IVA o amb Nitrendipina (percentatge de canvi: 4.79 \pm 9.78 i 4.07 \pm 6.79, respectivament; $p > 0.05$ en ambdós casos, $n = 5$

músculs; figura 18) de la mateixa manera que amb 5 mM de Ca^{2+} extracel·lular (percentatge de canvi: 18.07 ± 13.82 i 1.99 ± 1.11 respectivament; $p > 0.05$, $n = 5$ músculs, en ambdós casos).

Aquests resultats suggereixen una implicació de diferents canals en la modulació de l'alliberament d'ACh regulada per M1 en el terminal gran de les unions duals, concretament una dependència dels VDCC tipus P/Q i L, encara que no del VDCC tipus N.

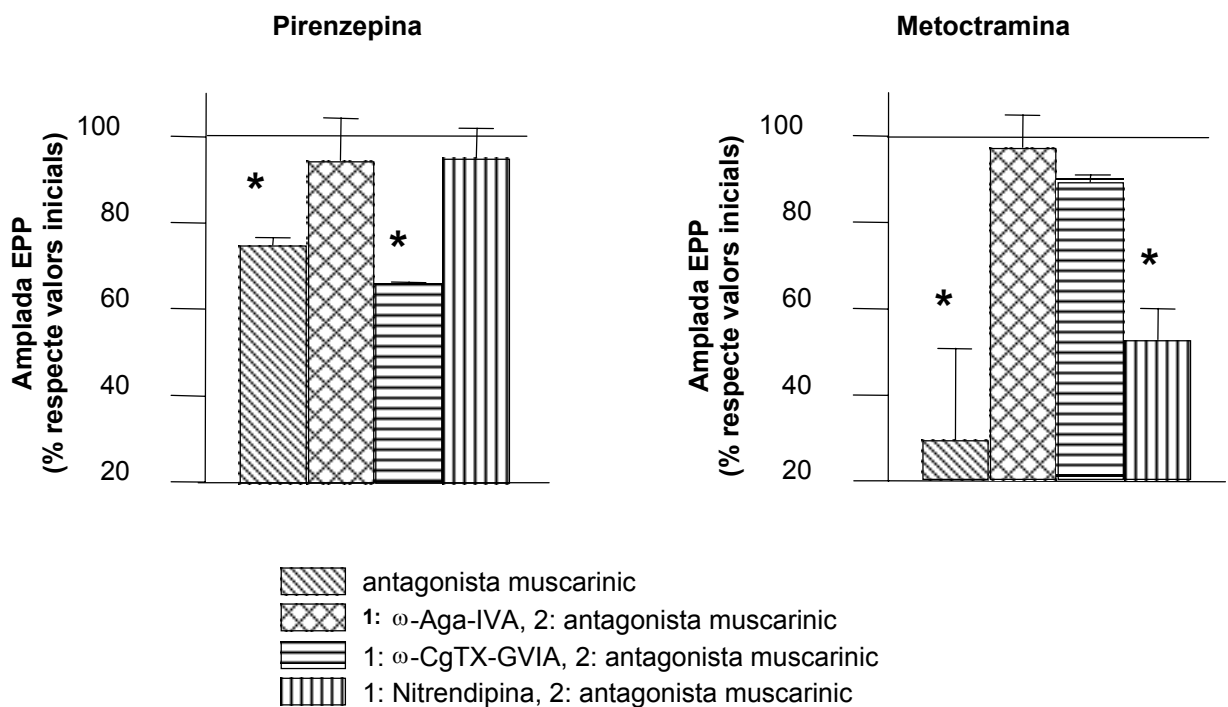


Figura 18. Efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina en la amplada de l'EPP gran de les unions doblement innervades quan un VDCC és blocat.

Efecte d'antagonistes selectius pels receptors M1 i M2 en les amplades de l'EPP gran en diferents situacions: Metoctramina (1 μM ; dreta) i Pirenzepina (10 μM ; esq) (primeres columnes), efectes de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP en presència de ω -Aga-IVA (100 nM; segones columnes), efectes de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP en presència de ω -CgTx-GVIA (1 μM ; tercers columnes), i efectes de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP en presència de Nitrendipina (1 μM ; quarts columnes). Les columnes són percentatges (mitjana \pm SEM) dels valors inicials. Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * $p < 0.05$.

Per altra banda, ambdues drogues ω -Aga-IVA i ω -CgTx-GVIA prevenien completament l'efecte de la Metoctramina (percentatge de canvi: 2.74 ± 7.55 i 10.63 ± 1.53 , respectivament; en ambdós casos: $p > 0.05$, $n = 5$ músculs; figura 18) de la mateixa manera que en presència de calci extracel·lular elevat (5 mM; percentatge de canvi: 5.01 ± 7.81 i 19.79 ± 2.11 respectivament; en ambdós casos $p > 0.05$, $n = 5$ músculs). No obstant, una preincubació amb Nitrendipina no prevenia l'efecte de la Metoctramina. La inhibició de la neurotransmissió per part de la Metoctramina en presència de Nitrendipina encara era de $47.21 \% \pm 7.11$, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs; figura 18).

En aquest cas, aquesta dada també implica una dependència multicanal de l'alliberament d'ACh regulada per M2 en aquests terminals, concretament una dependència dels VDCC tipus P/Q i N, encara que no del VDCC tipus L.

VI.2.2.b. L'EPP petit de les unions duals

IV.2.2.b.1- Efecte dels agents muscarínics antagonistes en l'alliberació d'ACh en l'EPP petit de les unions duals

Al realitzar l'estudi dels diferents subtipus de receptors muscarínics presents en els terminals petits de les unions duals, vam trobar que l'antagonista selectiu del receptor M2, Metoctramina (1 μ M), inhibia l'alliberació del neurotransmissor un $70.65 \% \pm 15.57$ ($p < 0.05$, $n = 5$ músculs; figures 16, 17 i 19). Aquest fet ens mostra que el receptor M2 pot modular la neurotransmissió potenciant l'alliberament d'ACh de la mateixa manera que en els terminals nerviosos del nadó de rata però, recordem, aquesta acció és contrària a la descrita en l'adult.

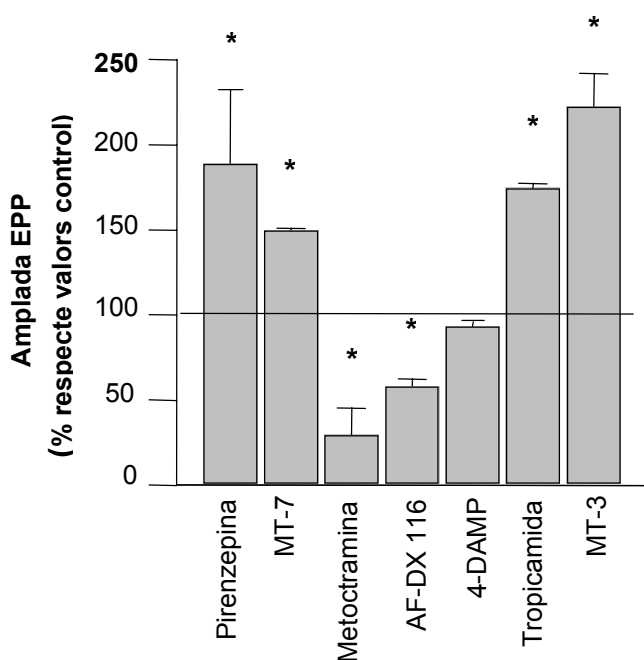


Figura 19. Efecte dels antagonistes muscarínics selectius en l'amplada dels EPPs, en els EPP petit de les unions doblement innervades.

Pirenzepina (10 μ M) i MT-7 (100 nM) per M1. Metoctramina (1 μ M) i AF-DX 116 (10 μ M) per M2. 4-DAMP (1 μ M) per M3. Tropicamida (1 μ M) i MT-3 (100 nM) per M4. L'EPP petit mostra una resposta diferent als antagonistes M1 i M4. Les columnes són percentatges dels valors inicials (mitja \pm SEM). Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

Tanmateix, l'alliberament d'ACh es veia significativament incrementat per l'antagonista selectiu del receptor M1, Pirenzepina (10 μ M), i per l'antagonista selectiu del receptor M4, Tropicamida (1 μ M), (percentatge de potenciació: 89.02 ± 43.03 i 74.12 ± 2.88 , respectivament; $p < 0.05$, $n = 5$ músculs, en ambdós casos; figures 16, 17, 19 i 20). Notar que l'acció M1 també és contrària a la trobada en la adult.

Aquests resultats mostren que hi ha un poderós mecanisme inhibitori d'alliberament del neurotransmissor, que combina M1 i M4 en el terminal que genera l'EPP petit, de les unions duals. Aquestes dades ens poden ajudar a justificar el motiu pel qual l'EPP petit és justament el de menys neurotransmissió i a la vegada, perquè l'EPP petit serà, amb tota probabilitat l'axó que finalment serà eliminat.

Per descartar que en aquest tipus de sinapsis existís alguna forma híbrida d'autoreceptor muscarínic que combinés subtipus M1 i M4 i per tant sensible a ambdues drogues Pirenzepina i Tropicamida, o una via intraaxonal comú i per tant amb la mateixa acció sobre la neurotransmissió, vam realitzar experiments en que eren afegides seqüencialment Pirenzepina i Tropicamida al múscul i a l'inrevés. Vam trobar que els respectius efectes en el terminals petits eren sumatius. Per exemple, després d'una primera incubació amb Pirenzepina, la qual incrementava l'amplada de l'EPP petit en un 90 % ($p < 0.05$) una segona incubació amb Tropicamida incrementava l'amplada de l'EPP un 66 % ($65.90 \% \pm 24.98$; $p < 0.05$, $n = 3$ músculs). Aquest fet ens suggereix

una via intracel·lular diferent pels mecanismes dels receptors muscarínics M1 i M4.

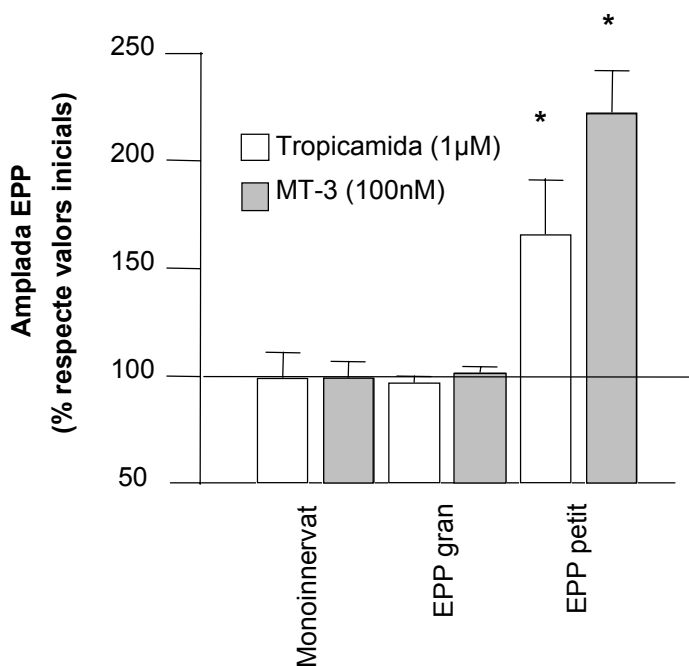


Figura 20. Acció dels antagonistes selectius pel receptor M4, Tropicamida i MT-3, en EPPs d'unions neuromusculars mono i doblement innervades.

Les columnes són percentatges (mitjana \pm SEM) dels valors inicials. Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

Per reafirmar aquests resultats també vam realitzar experiments amb els antagonistes muscarínics, toxina muscarínica 7 (MT-7), AF-DX 116 i toxina muscarínica 3 (MT-3). Vam observar que la MT-7 (100 nM) provocava un $49.84\% \pm 0.90$ de potenciació en l'EPP petit ($p < 0.05$, $n = 5$ músculs) comparable amb el 89% de potenciació provocat per la Pirenzepina ($p < 0.05$). Quant a l'AF-DX 116 (10 μ M) vam observar un $42.09\% \pm 4.41$ de bloqueig de l'EPP petit ($p < 0.05$, $n = 5$ músculs), també comparable al bloqueig d'un 70.65% produït per la Metoctramina ($p < 0.05$). I en la MT-3 (100 nM), un $122.26\% \pm 19.33$ de potenciació en la mateixa direcció que la Tropicamida que potenciava un 74.12% (figures 19 i 20).

L'antagonista selectiu del receptor M3, 4-DAMP no afectava l'amplada de l'EPP petit (percentatge de canvi: 6.50 ± 2.21 ; $p > 0.05$, $n = 5$ músculs; figures 16, 17 i 19). Indicant que aquest receptor no es troba en el terminal productori de l'EPP petit de la unió neuromuscular del nounat.

En resum, el terminal que genera l' EPP petit sembla tenir un mecanisme inhibitori de l'alliberació del neurotransmissor més potent que el mecanisme inhibitori dels terminals monoinnervats i el terminal que genera l'EPP gran de les sinapsis doblement innervades.

En definitiva, la resposta combinada dels receptors M1 i M4 pot produir una poderosa modulació en l'EPP petit de les unions duals. Aquesta diferència específica entre els terminals nerviosos, que produeixen els EPPs gran i petit, de les unions duals podria estar relacionada amb la competició axonal que porta a la pèrdua dels axons redundants.

IV.2.2.b.2- Rol dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en la modulació dels mAChRs en l'alliberació d'ACh en l'EPP petit de les unions duals

En estudis previs (Santafé i cols., 2001, 2002) vam trobar que en les fibres doblement innervades, els blocadors dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) tipus P/Q, ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA), i tipus L, Nitrendipina incrementaven l'amplada de l'EPP petit un $161.29 \% \pm 47.87$ i un $109.32 \% \pm 11.03$, respectivament; $p < 0.05$ en tots dos casos. També el blocador del VDCC tipus N, ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTx-GVIA), incrementava les amplades dels EPPs petits, només als primers minuts després de l'aplicació de la toxina (als 10 minuts: 90.23 ± 17.38 ; $p < 0.05$). Sembla ser que en els terminals petits alguna part del Ca^{2+} que entra per mitjà dels VDCC és utilitzada per un mecanisme repressor dependent de calci que afecta l'alliberació del neurotransmissor, mentre que només una part del Ca^{2+} és utilitzada pròpiament per la neurotransmissió.

En aquest treball vam estudiar la possible relació entre el mecanisme muscarínic que opera en el terminal que genera l'EPP petit i els diferents VDCC presents en aquests terminals (figures 21 i 22).

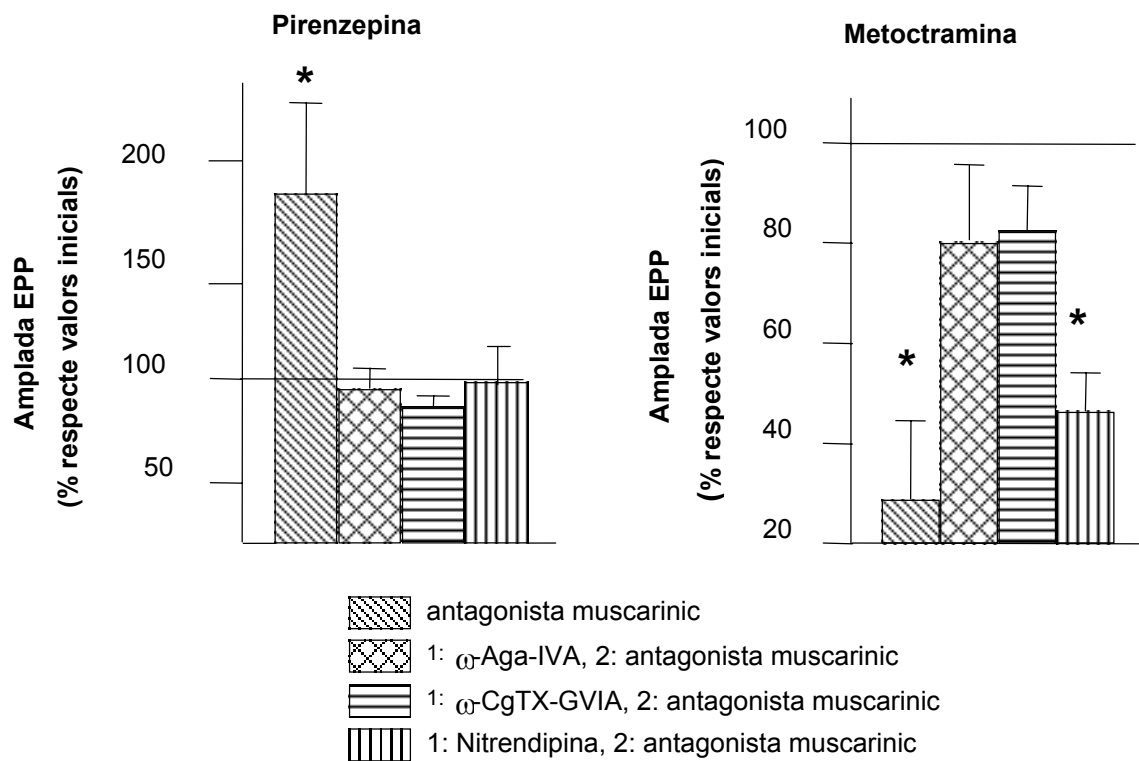


Figura 21. Efecte de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP petit d'unions doblement innervades quan un VDCC és blocat.

Efecte d'antagonistes selectius pels receptors M1 i M2 en les amplades de l'EPP petit en diferents situacions: Metoctramina (1 μ M; dreta) i Pirenzepina (10 μ M; esq) (primeres columnes), efectes de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP en presència de ω -Aga-IVA (100 nM; segones columnes), efectes de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP en presència de ω -CgTx-GVIA (1 μ M; tercers columnes), i efectes de la Metoctramina i la Pirenzepina en l'amplada de l'EPP en presència de Nitrendipina (1 μ M; quartes columnes).

Les columnes són percentatges (mitjana \pm SEM) dels valors inicials. Per a cada columna n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul, * $p < 0.05$.

En relació al VDCC tipus P/Q vam observar que després d'una preincubació amb ω -Aga-IVA, tant la Metoctramina com la Pirenzepina no podien realitzar les seves accions en la neurotransmissió (percentatge de canvi: 19.42 ± 15.62 i 0.79 ± 7.15 respectivament; $p > 0.05$, n = 5 músculs, en ambdós casos; figura 21). Tampoc podien aconseguir el seu efecte en presència d'elevat Ca^{2+} extracel·lular (percentatge de canvi: 4.93 ± 6.98 i 24.72 ± 13.3 respectivament; $p > 0.05$, n = 5 músculs, en ambdós casos). No obstant,

la Tropicamida realitzava la seva acció potenciadora amb normalitat en presència d' ω -Aga-IVA ($83.73 \% \pm 3.69$, $p < 0.05$, $n = 5$ músculs; figura 22).

Aquests resultats ens suggereixen que els receptors M1 i M2 depenen del canal P/Q però que el receptor M4 no hi depèn.

Per estudiar la relació entre l'EPP petit i els VDCC tipus N vam realitzar una preincubació amb el seu blocador ω -CgTx-GVIA i vam comprovar que ni la Metoctramina, ni la Pirenzepina, ni la Tropicamida podien realitzar la seva funció en l'alliberació del neurotransmissor (percentatge de canvi: 7.73 ± 2.16 , 13.81 ± 5.54 i 17.06 ± 8.90 respectivament, en tots els casos: $p > 0.05$, $n = 5$ músculs; figures 21 i 22). El que ens vol indicar que els receptors M1, M2 i M4 depenen del canal N.

Per veure si aquesta és una acció dependent del calci o bé directament relacionada amb el canal vam realitzar experiments en presència d'elevat calci extracel·lular i vam veure que quan els experiments preincubant amb ω -CgTx-GVIA es realitzaven en presència d'alt Ca^{2+} extracel·lular (5 mM), ni la Metoctramina, ni la Pirenzepina, ni la Tropicamida tenien cap efecte (percentatge de canvi: 4.93 ± 6.98 , 6.89 ± 14.51 i 20.38 ± 5.90 , respectivament; en tots els casos: $p > 0.05$, $n = 5$ músculs). Aquests resultats indiquen que és una acció dependent de canal.

Per últim, vam realitzar una preincubació amb el blocador del canal de Ca^{2+} tipus L, Nitrendipina, per estudiar la relació entre l'EPP petit i aquest tipus de canal i vam observar que la Metoctramina inhibia l'alliberació normal d'ACh

aproximadament un 50 % (figura 21). No obstant, la Pirenzepina (1.34 ± 17.66 ; $p > 0.05$, $n = 5$ músculs) i la Tropicamida (0.86 ± 2.18 , $p > 0.05$, $n = 5$ músculs) no la inhibien (figures 21 i 22). Per tant, podem deduir que el receptor M2 no depèn del canal L però els receptors M1 i M4, si. Per veure si aquesta és una acció dependent del calci o bé directament relacionada amb el canal vam realitzar experiments preincubant Nitrendipina en presència d'elevat Ca^{2+} extracel·lular (5 mM) i vam observar que ni la Pirenzepina, ni la Tropicamida eren capaces d'afectar l'alliberament del neurotransmissor (percentatge de canvi: 17.93 ± 7.07 i 7.87 ± 10.87 , respectivament; en tots els casos: $p > 0.05$, $n = 5$ músculs) indicant que el receptor M1 i el receptor M4 depenen del canal L .

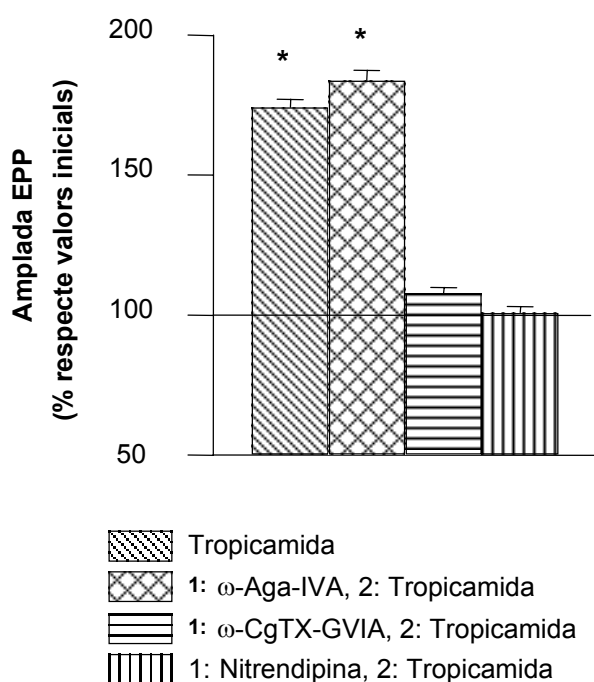


Figura 22. Efecte de la Tropicamida en l'EPP petit en unions doblement innervades quan un VDCC és blocat.

1a columna: Efecte de la Tropicamida (1 μ M) en l'EPP petit. 2a columna: Efecte de la Tropicamida (1 μ M) en l'amplada dels EPP en presència d' ω -Aga-IVA (100 nM). 3a columna: Efecte de la Tropicamida (1 μ M) en l'amplada dels EPP en presència d' ω -CgTx-GVIA (1 μ M). 4a columna: Efecte de la Tropicamida (1 μ M) en l'amplada dels EPP en presència de Nitrendipina (1 μ M).

Les columnes són percentatges (mitjana \pm SEM) dels valors inicials. Per a cada columna $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul. * $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

El conjunt d'aquests resultats mostra que:

La funció dels receptors muscarínics M4 sensibles a Tropicamida no depèn dels VDCC tipus P/Q. Encara que depèn de la funció normal dels canals L i N.

La funció dels receptors muscarínics M1 sensibles a Pirenzepina té una dependència multicanal, així doncs, depèn dels VDCC tipus P/Q, N i L.

La funció del receptor muscarínic M2 sensible a Metoctramina, depèn de la funció normal dels VDCC tipus P/Q i N però no depèn dels VDCC tipus L.

V. DISCUSSIÓ

V.1- mAChRs en la unió neuromuscular de la rata adulta

En les unions neuromusculars de rates adultes, és evident l'existència de receptors muscarínics presinàptics d'ACh (mAChR). Com alguns autors previament ja han apuntat (Arellano i cols., 1999; Allen, 1999; Slutsky i cols., 1999; Minic i cols. 2002), els autoreceptors mAChRs estan implicats en la modulació de l'alliberament del neurotransmissor ACh en les sinapsis neuromusculars. En aquest treball s'aprofundeix una mica més en els mecanismes que regulen aquest procés, trobant-se l'existència de receptors muscarínics presinàptics M1, potenciadors de l'alliberació del neurotransmissor, i receptors M2 inhibidors de l'alliberació del neurotransmissor, quan apliquem els antagonistes muscarínics propis Pirenzepina i Metoctramina, respectivament, per a cada un dels receptors.

Estudis recents, constaten l'evidència de l'existència d'uns mecanismes que augmenten l'alliberació d'ACh per mitjà del receptor M1 i d'uns altres que la inhibeixen per mitjà del receptor M2 (Allen i Brown, 1993; Ren i Harty, 1994; Allen, 1999; Slutsky i cols., 1999).

Des de fa anys es suggereix que existeix més d'un tipus de receptor per explicar la inhibició de l'alliberació d'ACh per mitjà dels mAChRs, per exemple Ren i Harty (1994) impliquen els receptors M2 i M3 utilitzant com a model les neurones mucoses i submucoses de "l'antrum" de rata, i Vannucchi i Pepeu (1995) impliquen els receptors M1, M2 i M4 utilitzant el còrtex cerebral de la rata com a model, i els receptors M1 i M4 utilitzant l'hipocamp de rates adultes.

Slutsky i els seus col·laboradors al 1999 realitzen estudis amb amfibis

utilitzant despolaritzacions focals del terminal presinàptic de la unió neuromuscular de granota, i observen un patró dual de receptors muscarínics on hi ha implicats els receptors M1 i M2 i, on l'M1 realitza una acció facilitadora i l'M2 una acció inhibidora de la neurotransmissió.

Més recentment, Minic i col·laboradors al 2002 també observen aquest mateix patró dual però en mamífers, concretament en la unió neuromuscular del ratolí.

Prèviament a aquests estudis, Wessler i cols. al 1987, ja havien observat l'existència de mecanismes muscarínics d'autoregulació positiva i negativa simultanis, en el nervi frènic de la rata.

Diferents autors de fet, troben diferents resultats utilitzant el mateix model (nervi frènic de rata), quan utilitzen diferents condicions d'activació. Per exemple, Ganguly i Das (1979) observen una autopotenciació quan utilitzen l'Oxotremorina T com a agonista muscarínic; per altra banda, Abbs i Joseph, (1981) observen una autoinhibició quan l'utilitzat com a agonista és la Muscarina; per últim, Häggblad i Heilbronn (1983) obtenen que la Muscarina no té cap efecte en l'alliberament del neurotransmissor. Nosaltres també observem que l'agonista muscarínic inespecífic Muscarina no modifica l'alliberació del neurotransmissor. Creiem per aquest motiu, que una activació global i inespecífica de tots els muscarínics pot produir una acció oposada dels 2 subtipus de receptors M1 i M2 (que són funcionalment oposats) i fer que la Muscarina no tingui efecte. El fet que els antagonistes muscarínics específics pels receptors M1 i M2, Pirenzepina i Metoctramina respectivament, tinguin efectes gairebé exactament oposats en l'alliberació del neurotransmissor,

reforça aquest suggeriment. També es veu reforçat quan els antagonistes muscarínics Pirenzepina i Metoctramina, són sumats seqüencialment, doncs s'observa que hi ha una cancel·lació dels seus efectes. Aquest fet juntament amb una dependència diferencial dels receptors muscarínics amb els VDCC suggereix que les vies intracel·lulars per les quals actuen M1 i M2 poden ser diferents.

Nosaltres considerem necessari determinar quin rol dels 2 oposats, és a dir, el de facilitació i el d'inhibició de l'alliberació del neurotransmissor, tenen els mAChRs en els músculs d'animals vius i determinar les condicions d'activitat sinàptica que augmenten l'alliberament i les que la inhibeixen.

Com hem vist anteriorment, Minic i cols. al 2002 observen, en hemidiafragma de ratolí i en situacions en que s'inactiva l'Acetilcolinesterasa (AChE), un efecte predominant regulat per M1 relacionat amb l'alliberació d'ACh.

En el nostre estudi reproduïm l'activació fisiològica de la unió neuromuscular de mamífer mitjançant la propagació de potencials d'acció en el terminal nerviós, amb nivells de calci extracel·lular normals, receptors nicotínics postsinàptics no bloquejats i activació fisiològica normal de l'AChE. En aquestes condicions, com hem anomenat anteriorment, els mecanismes dels receptors M1 i M2 poden actuar en paral·lel i fer un balanç comú.

Per estudiar l'amplada de l'EPP (mV), utilitzem una freqüència d'activació baixa (0.5 Hz) doncs, és reconegut que una freqüència d'estimulació alta (80 Hz) pot produir en l'animal viu unes oscil·lacions fàssiques i fer que la concentració d'ACh en la fenedura sinàptica variï (la concentració de repòs

d'ACh en la fenedura sinàptica, es considera entre 10^{-8} M i 10^{-9} M; Katz i Miledi, 1977; Slutsky i cols., 1999). A més, també és possible que a nivells alts d'activació, els mAChRs M1 i M2 actuïn de manera diferent en la regulació de l'alliberament d'ACh.

Per determinar acuradament com és el funcionament fisiològic dels receptors M1 i M2 es requereix un treball addicional amb patrons d'estimulació fisiològics diferents. Per aquest motiu, es van realitzar una sèrie d'experiments preliminars mitjançant els antagonistes amb alta afinitat pels mAChRs M1 i M2, Pirenzepina i Metroctamina respectivament, per tal d'observar si aplicant trens d'activació de 10 Hz es veu afectada l'amplada de l'EPP. Es pot comprovar amb aquest procediment, que no s'observen diferències entre l'amplada de l'EPP a aquesta freqüència i a una freqüència de 0.5 Hz. Inferint doncs, que una freqüència més elevada d'estimulació en aquest cas, 10 Hz, no afecta el funcionament dels mAChRs presinàptics en relació a l'alliberació d'ACh, ja que l'amplada de l'EPP no es veu modificada a nivells alts d'activació (dades d'experiments encara en fase preliminar dels que no mostrarem resultats).

Per descartar la possibilitat de que els antagonistes muscarínics estiguessin afectant el component postsinàptic de la unió neuromuscular vam fer un seguit d'experiments de dosi dependència mesurant l'alliberació espontània d'ACh mitjançant l'amplada del MEPP, i vam poder observar que a les concentracions de treball utilitzades per nosaltres no es modificava l'amplada del quanta d'ACh, inferint doncs, que un efecte postsinàptic dels receptors nicotínics en la fibra muscular, és poc probable.

En resum, els receptors muscarínics presinàptics M1 i M2 estan presents

en els terminals nerviosos motors de rates adultes, doncs responen fisiològicament als diferents antagonistes específics d'una manera diferencial.

A nivell del sistema nerviós central, els autoreceptors muscarínics es localitzen en diferents regions presinàptiques del cervell de rata on regulen l'alliberament del neurotransmissor ACh (Rouse i Levey, 1997). L'alliberament del neurotransmissor pot ser automodulat pels autoreceptors muscarínics en el mateix terminal nerviós presinàptic (Starke i cols. 1989, revisió).

A nivell perifèric, concretament en fibres musculars esquelètiques innervades per axons motors, l'evidència d'autoreceptors muscarínics presinàptics és parcial. Doncs, en estudis recents Minic i cols. al 2002 troben mitjançant immunocitoquímica, la presència del receptor M1 en unions neuromusculars de ratolí.

V.1.1- Implicació dels canals de calci dependents de voltatge en la funció dels mAChRs en l'adult

En el nostre estudi descrivim un efecte dels receptors muscarínics M1 i M2, en l'alliberament d'ACh, que depèn de l'entrada de calci per mitjà del canal de calci dependent de voltatge (VDCC) tipus P/Q (únic VDCC presinàptic trobat en la unió neuromuscular de mamífer adult). Aquest fet ens suggereix que la membrana axonal presinàptica pot acollir o localitzar els mAChRs implicats en la modulació de l'alliberació del neurotransmissor. No obstant, cal destacar que les cèl·lules d'Schwann també tenen receptors muscarínics i purinèrgics que semblen regular l'expressió genètica en aquestes cèl·lules (Robitaille i cols., 1997).

Observem doncs, que el VDCC tipus P/Q pot estar implicat en mecanismes moduladors de l'alliberació del neurotransmissor regulats pels mAChRs M1 i M2. L'alliberació d'ACh evocada pels terminals nerviosos madurs és regulada per l'entrada de calci per mitjà dels VDCC tipus P/Q (Uchitel i cols., 1992, Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995). En contrast, els VDCC tipus L i tipus N no participen en l'alliberació evocada d'ACh en aquests terminals nerviosos madurs (Penner i Dreyer, 1986; Atchison, 1989; Protti i cols., 1991; Bowersox i cols., 1995). La contribució dels canal de calci tipus N en la transmissió sinàptica de les unions neuromusculars d'animals en desenvolupament sembla bastant evident (Iwasaki i cols., 2000) però només es manté en un nombre determinat de sinapsis en animals madurs. Algunes

d'aquestes evidències han estat reforçades mitjançant tècniques d'immunocitoquímica (Day i cols., 1997; Westenbroeck i cols., 1998).

Estudis realitzats amb amfibis ens demostren que l'acoblament dels mAChRs amb els VDCC és diferent al trobat en els mamífers. Així doncs, Slutsky i els seus col·laboradors al 1999 troben en unions neuromusculars de granota que l'efecte inhibidor de la neurotransmissió regulat per M2 no està relacionat amb una disminució en l'entrada de calci intracel·lular, mentre que l'efecte facilitador de la neurotransmissió regulat per M1, està relacionat amb un increment d'aquest.

Per altra banda, Kerr i Yoshikami l'any 1984 troben que els canals calci tipus N poden controlar l'alliberació del neurotransmissor en la unió neuromuscular de granota.

Podem observar doncs, que en els amfibis l'acoblament dels mAChRs amb els VDCC és diferent a l'acoblament trobat en els mamífers.

De la mateixa manera, en algunes neurones centrals que expressen diferents tipus de canals de Ca^{2+} (T, N, P, Q, L i R; Allen i cols., 1993; Williams i cols., 1997; Margeta-Mitrovick i cols., 1997), només els canals tipus N i P/Q estan implicats en l'autoinhibició regulada pel receptor muscarínic M2 (Allen, 1999).

En el mateix sentit que els nostres resultats, sembla ser que diferents

canals de Ca^{2+} presents (especialment el tipus P/Q) en diferents tipus d'axons colinèrgics presinàptics, poden estar acoblats als mecanismes muscarínics moduladors de l'alliberament del neurotransmissor regulats per M1 i M2.

V.2- mAChRs en la unió neuromuscular del nadó de rata

V.2.1- Sinapsis monoinnervades

En el desenvolupament postnatal primerenc observem l'existència de receptors muscarínics presinàptics M1 i M2 que regulen l'alliberació del neurotransmissor en la mateixa direcció. El mecanisme muscarínic d'alliberament d'ACh és un mecanisme autopotenciador tant per M1 com per M2, doncs els mecanismes muscarínics M1 i M2 mediat per Pirenzepina i Metoctramina, respectivament, actuen com a dues eines facilitadores de la neurotransmissió.

No observem l'existència però, de receptors muscarínics M3, sensibles a 4-DAMP, o receptors muscarínics M4, sensibles a Tropicamida, que provoquin reaccions complexes.

Així doncs, en els primers dies de desenvolupament postnatal en les sinapsis monoinnervades, tant el receptor M1 com el receptor M2 estan relacionats amb un augment en l'alliberació del neurotransmissor. És en les primeres setmanes de vida postnatal quant, gràcies a la maduració, el mecanisme M2 canvia fins a realitzar l'activitat inhibidora de la neurotransmissió abans descrita en l'adult. No podem oferir però, en aquest estadi, una implicació fisiològica que expliqui el canvi en els efectes regulats pel receptor M2 des de l'augment de l'alliberació fins a la inhibició de l'alliberació durant el desenvolupament (més endavant es justifica aquest fet). Tanmateix,

l'autoinhibició indica l'existència en la unió neuromuscular adulta d'un mecanisme regulat pels autoreceptors muscarínics que controla la maquinària excitotòtica d'alliberació del neurotransmissor. És interessant comprovar que al sumar els antagonistes muscarínics M2 i M1 seqüencialment, Metoctramina i Pirenzepina respectivament, la reducció en l'alliberament d'ACh produïda per la primera droga no es veu modificada per la segona. El que ens suggereix l'existència de mecanismes intracel·lulars que poden tenir punts en comú. Com hem vist anteriorment, l'existència de mecanismes compartits és poc probable en les rates adultes.

No sembla plausible l'existència d'un receptor híbrid M1 i M2 doncs a l'aplicar els diferents antagonistes muscarínics selectius per M1 o M2 veiem que la resposta temporal en la neurotransmissió és diferent (veure figura 12C) això és compatible amb la idea de dos receptors diferenciats. A més, al sumar aquests antagonistes selectius seqüencialment veiem que la reducció de l'alliberament d'ACh produïda per la primera droga no és modificada per la segona droga, això suporta encara més la hipòtesi que el mecanisme intracel·lular utilitzat és el mateix.

En resum, en les sinapsis monoinnervades de la rata noutat existeixen receptors muscarínics M1 i M2 que potencien l'alliberament del neurotransmissor i que semblen funcionar mitjançant una via intracel·lular comuna per als dos receptors muscarínics.

V.2.1.1- Implicació dels canals de calci dependents de voltatge en la funció dels mAChRs

En la unió neuromuscular d'animals nous trobem l'existència de canals de calci dependents de voltatge (VDCC) del tipus P/Q, N i L que participen en l'alliberació evocada d'ACh en els terminals nerviosos en desenvolupament (Sugiura i Ko, 1997; Rosato-Siri i Uchitel, 1999; Santafé i cols., 2001). No obstant, en les sinapsis monoinnervades de nadó només s'observen dos tipus de VDCC, els P/Q i els N (Santafé i cols., 2001).

En aquest treball hem estudiat de quina manera aquests VDCC estan relacionats amb els receptors muscarínics tipus M1 i M2. Concretament hem observat que els receptors M1 i M2 estan relacionats amb els VDCC P/Q únicament, ja que els seus antagonistes Pirenzepina i Metoctramina respectivament no poden realitzar la seva acció en la neurotransmissió quan el canal en qüestió és bloquejat. Utilitzant Ca^{2+} elevat constatem també, aquesta clara dependència dels muscarínics M1 i M2 pel canal P/Q doncs, el Ca^{2+} augmentat, tampoc permet que els receptors muscarínics tinguin cap efecte si el canal és bloquejat.

Per tant, en les sinapsis monoinnervades del nadó de rata el funcionament dels receptors muscarínics M1 i M2, tots dos facilitadors, depèn de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà del VDCC tipus P/Q, en cap cas els receptors M1 i M2 depenen del canal N, segon VDCC implicat en la neurotransmissió de les unions monoinnervades del nadó, per realitzar la seva acció.

En conseqüència, tant la Pirenzepina com la Metoctramina inhibeixen la neurotransmissió, el que indica que els mecanismes muscarínics M1 i M2 són autopotenciadors (*feedback* positiu), i no són sumatius, és a dir, depenen d'una via intracel·lular comú. Per altra banda, depenen únicament del VDCC P/Q, encara que el canal N estigui present en aquests terminals, el que ens fa pensar en un mecanisme unificat que promou l'augment de l'alliberament del neurotransmissor en els terminals axònics que esdevenen estables en la unió neuromuscular, influint també en l'èxit axonal d'aquest terminal en el procés d'eliminació sinàptica.

A les sinapsis monoinnervades del nounat existeix un mecanisme dual M1-M2 en el terminal nerviós en desenvolupament projectat a favor de l'alliberament d'ACh. A conseqüència de que durant el desenvolupament del terminal nerviós la quantitat de neurotransmissor alliberat és poca (Dennis i cols., 1981; Santafé i cols., 2001), sembla ser necessària una automodulació potenciadora i simultània dels dos mAChRs presents (M1 i M2). Aquesta autoregulació es realitza per mitjà d'un únic VDCC, el P/Q deixant de banda el N, i preparant-se potser per la configuració madura final.

V.2.2- Sinapsis doblement innervades

En els músculs dels animals adults cada fibra muscular és innervada per una única motoneurona, doncs durant les primeres setmanes de vida postnatal la innervació polineuronal és dràsticament reduïda per una retirada dels axons redundants per mitjà d'un procés competitiu dependent d'activitat (Benoit i Changeaux, 1975; O'Brien i cols., 1978; per revisió Jansen i Fladby, 1990; Ribchester i Barry, 1994). L'alliberament del neurotransmissor per mitjà de l'axó que sobreviu és caracteritzat funcionalment per un increment en el contingut quàntic, mentre que l'axó o axons que són retirats esdevenen progressivament menys eficients, doncs va disminuint el seu contingut quàntic i a la vegada la densitat de receptors postsinàptics (Colman i cols., 1997; Culican i cols., 1998).

Les sinapsis doblement innervades són el darrer pas abans de que les àrees sinàptiques multiinnervades finalment madures esdevinguin monoinnervades.

Les unions duals poden proveir d'un model simple per l'estudi de les diferències moleculars i funcionals entre l'axó que guanya la competició i es consolida (l' EPP-gran) i el darrer terminal que serà eliminat (l'EPP petit) (Koop i cols., 2000; Santafé i cols., 2001 i 2002).

En l'EPP gran de les unions doblement innervades del nounat existeixen receptors M1 sensibles a Pirenzepina i receptors M2 sensibles a Metoctramina, que fan funcions facilitadores (*feedback* positiu) en la neurotransmissió. Aquests resultats tan similars als trobats en les unions monoinnervades del nounat ens poden fer pensar que aquests terminals seran els que guanyaran la

competició axonal i romandran en l'adult.

En relació a l'àrea ocupada per un axó, Walsh i Lichtman (2003) comproven que l'àrea que ocupa un axó no és determinant de l'èxit competitiu final ja que observacions morfològiques recents mostren que axons ocupants de grans fraccions de territori sinàptic són a vegades reemplaçats per axons ocupants d'àrees petites (Walsh i Lichtman, 2003). Aquest fet però, pot ser independent de la capacitat funcional d'un axó a l'hora d'alliberar l'acetilcolina. És a dir, l'activitat fisiològica d'un terminal traduïda en quantitat de neurotransmissor alliberat no té perquè estar directament relacionada amb la quantitat d'àrea postsinàptica ocupada.

En l'EPP petit de les unions duals, trobem la presència de receptors muscarínics presinàptics tipus M1, M2 i també M4.

El receptor M2 sensible a Metoctramina és un receptor autopotenciador, afavoreix l'alliberació d'ACh. En canvi, els autoreceptors M1 (sensible a Pirenzepina) i M4 (sensible a Tropicamida) són receptors inhibidors; redueixen l'alliberament del neurotransmissor.

Observem en aquests terminals que generen EPP petits un canvi molt important en la configuració de receptors muscarínics en relació als trobats en els terminals que generen EPP grans. Passem de tenir dos receptors M1 i M2 facilitadors, a tenir-ne tres, dos inhibidors (M1 i M4) i un facilitador (M2). Aquesta situació ens porta a pensar que l'EPP petit disposa d'un mecanisme inhibidor bastant potent que farà que es decideixi el procés de competició. És a dir, l'EPP petit formarà part d'aquell terminal que perdrà potencia, es

deteriorarà i serà eliminat, fent que resti com a guanyador el terminal gran, el qual es veurà autopotenciat a causa de la seva major activitat neurotransmissora (Jansen i Fladby, 1990). Aquest deteriorament d'un i potenciació de l'altre podria ser un factor clau en la competició axonal neonatal i eliminació sinàptica.

Dues qüestions centrals en el procés d'eliminació sinàptica són: qui comença el procés (el component presinàptic o postsinàptic) i quines són les senyals que fan de mitjanceres en aquesta competició.

L'activitat diferencial de cada un dels axons és un factor molt important en aquest procés ja que determina la freqüència neurotransmissora i qui serà el guanyador o perdedor de la competició (Duxson i Vrbova, 1985; Thompson, 1985; Barry i Ribchester, 1995). No obstant, Costanzo i col·laboradors a l'any 2000 troben que l'activitat diferencial entre els axons és un factor molt important però no és un determinant estricte de qui serà el guanyador o perdedor de la competició, influencia però no decideix la competició.

En l'eliminació sinàptica, les sinapsis actives prosperen gràcies al deteriorament dels seus veïns inactius (Lichtman i Balice-Gordon, 1990). Sembla ser que l'afebliment d'un axó, més que la força diferencial dels seus competidors, és el principal contribuïdor per què hi hagi una gran disparitat en el contingut quàntic dels dos axons que és conseqüència del procés competitiu (Colman i cols., 1997; Koop i cols., 2000). L'increment de la neurotransmissió en els axons més forts no sembla contribuir inicialment, en gran mesura, a l'increment en la diferència de contingut quàntic entre els axons febles i els

forts. En canvi, un afebliment dels terminals inactius degut a una reducció en la probabilitat d'alliberament del neurotransmissor sembla ser el primer factor clau en la competició (Koop i cols., 2000). L'ACh alliberada pels terminals més actius pot ajudar directament a reduir la probabilitat d'alliberament en els terminals menys actius per mitjà dels autoreceptors presinàptics inhibitoris que descrivim en aquest estudi.

Encara que una neurona propagui el mateix patró i nivell d'activitat a totes les branques axonals, l'èxit competitiu d'aquestes branques pot variar enormement en diferents unions poliinnervades. Aquest fet mostra que moltes interaccions locals en cada unió neuromuscular regulen l'eliminació sinàptica (Keller-Peck i cols., 2001). En estadis primerencs del desenvolupament postnatal (entre els dies 1 i 3 de desenvolupament; P1-P3) l'axó ocupa múltiples regions distribuïdes per tota la unió neuromuscular, aquests espais ocupats per aquest axó es confonen, es barregen. Progressivament, amb el desenvolupament, les unions neuromusculars es van compartimentant (segregant) ja que es dona la retracció d'uns axons i el creixement i consolidació d'uns altres (Gan i Lichtman, 1998).

El procés de retirada o retracció és regulat espacialment, és a dir, depèn de l'espai que hi ha entre els axons i l'aparell postsinàptic, de manera que les branques d'un axó que és pròxim al territori competidor ($<50 \mu\text{m}$) són eliminades abans que les branques més distants siguin retirades (Gan i Lichtman, 1998). Aquest fet suggereix que les senyals que fan de mitjanceres de la competició han d'esdevenir menys potents per sobre d'una distància curta. Aquesta distància curta és compatible amb la difusió local d'ACh dins de

l'espai sinàptic comú entre terminals competitius. Excepcionalment, en certes condicions, l'eliminació ocorre en llargues distàncies. Per exemple, després de la reinnervació d'un múscul per dos nervis, les fibres musculars individuals esdevenen innervades en múltiples emplaçaments, posteriorment, si una placa motora es troba a més d'1 mm de distància de l'altra és eliminada (Kuffler i cols., 1997). Sembla doncs, que la cèl·lula muscular actua, almenys en part, de mitjancera entre els axons que competeixen quan les distàncies que els separen l'un de l'altre són relativament llargues.

Recordem que l'EPP gran disposa de receptors muscarínics M1 i M2 facilitadors de la neurotransmissió. L'EPP petit, per altra banda, disposa de receptors muscarínics M1 i M4 inhibidors i, muscarínics M2 facilitadors. Per tant, una estimulació normal de l'EPP gran pot estimular els mAChRs presents en el terminal de l'EPP petit i representar una senyal d'alerta que és suficient per regular la competició. Personius i Balice-Gordon, 2001, descriuen en aquest sentit, que la competició sinàptica neuromuscular és modulada per nivells sorprenentment baixos d'activitat en l'animal postnatal (Personius i Balice- Gordon, 2001).

En aquest treball hem estudiat els subtipus mAChRs, la seva estoiquiometria i funció en l'eliminació sinàptica avançada. En el procés competitiu existeix un presumpte guanyador (el terminal que genera l'EPP gran, el qual és gairebé idèntic funcionalment al terminal de les sinapsis moinnervades) i un presumpte perdedor (el terminal que genera l'EPP petit que

és funcionalment deprimat). Tanmateix, el punt de partida de la competició són els terminals nerviosos indiferenciats similars en ocupació de l'àrea sinàptica, posició i eficàcia sinàptica (Gan i Lichtman, 1998). Encara necessitem explicar per tant: A) quin és el patró muscarínic indiferenciat inicial; B) com els terminals adquireixen el patró muscarínic dels axons guanyadors i perdedors; C) que causa l'expressió diferencial (M4 només en el terminal que genera l'EPP petit) i l'acoblament diferencial dels mecanismes moduladors de l'alliberació (M1 és un facilitador de l'alliberació en el terminal gran i en les unions neuromusculars adultes però actua com un inhibidor de l'alliberació en el terminal petit).

Es concebible pensar que les diferències s'originin en l'activitat diferencial de la motoneurona amb o sense la implicació de la cèl·lula postsinàptica. Tanmateix, no podem descartar la possibilitat que la conducta complexa dels mAChRs durant el desenvolupament de la unió neuromuscular es degui en part a la existència de propietats dels receptors que no segueixen cap patró estàndard, durant la maduració. La sensibilitat als agents muscarínics emprats als dies 3 i 6 de vida postnatal (P3 i P6) pot ser diferent a la de l'adult. És interessant comprovar com en la rata adulta el mecanisme potenciador de l'alliberació sensible a Pirenzepina i regulat per M1, i l'activitat inhibidora de l'alliberació sensible a Metoctramina i regulat per M2 es cancel·len l'un amb l'altre quan són activats seqüencialment i en qualsevol ordre (Santafé i cols., 2003). Aquest fet suggereix l'existència en l'adult d'un mecanisme dual M1-M2 amb una via intracel·lular diferenciada. No obstant, en el present estudi descrivim en les sinapsis monoinnervades d'animals d'entre 3 i 6 dies de vida

postnatal (P3-P6) i també en el terminal que genera l'EPP gran de les sinapsis doblement innervades, que l'efecte dels antagonistes muscarínics M1 i M2 no és additiu, el qual suggereix que hi ha una via comú pels mecanismes potenciadors de l'alliberació dels receptors M1 i M2. En conseqüència, en el desenvolupament trobem un mecanisme concret de funcionament dels diferents mAChRs trobats, el mateix per les sinapsis monoinnervades que pel terminal gran de les doblement innervades. Fet que ens corrobora que aquest terminal gran serà el que consolidarà i formarà part de les monoinnervades. En la maduració de les sinapsis, la via intracel·lular també madura i es diferencia a la vegada que també es diferencien les accions dels muscarínics M1 i M2. Podem parlar doncs, d'un fenomen de maduració i adaptació fisiològica de les sinapsis neuromusculars, concretament del fenomen muscarínic exposat en aquest treball.

En resum, suggerim que la coincidència del mecanisme facilitador de l'alliberació mediat pels autoreceptors muscarínics en un terminal de les unions duals, juntament amb un poderós mecanisme de disminució de l'alliberació en l'altre terminal podria determinar el resultat final de la competició axonal postnatal.

V.2.2.1- Implicació dels canals de calci dependents de voltatge en la funció dels mAChRs

Els diferents tipus de sinapsis (corticals, hipotalàmiques, cerebeloses, neuromusculars, etc.) difereixen en els seus tipus de canals, a més, un mateix tipus de sinapsi utilitza diferents canals de calci dependents de voltatge (VDCC) en diferents espècies o en diferents estadis del desenvolupament. Hi ha en el desenvolupament una maduració de l'estoiquiometria dels VDCC en els terminals nerviosos motors. En les motoneurons de mamífers madurs, l'alliberació d'ACh evocada dels terminals nerviosos motors es regulada per l'entrada de calci a través dels VDCC tipus P/Q (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995). No obstant, durant la maduració postnatal diferents canals de calci coexisteixen en el mateix terminal axònic, i tant els canals VDCC tipus L (Sugiura i Ko, 1997) com els tipus N (Rosato-Siri i Uchitel, 1999) semblen participar en la neurotransmissió del nouat juntament amb el canal de calci tipus P/Q. La contribució del canal de calci tipus N en la transmissió sinàptica sembla bastant general entre sinapsis d'animals en desenvolupament (Iwasaki i cols, 2000), però resta només en una part de les sinapsis en els animals madurs.

Nosaltres recentment hem descrit la implicació dels VDCC, presents en els dos terminals nerviosos motors, en l'alliberació del neurotransmissor. Aquests terminals competeixen en les plaques doblement innervades durant els primers dies postnatsals que és quan ocorre l'eliminació axonal (Santafé i cols.,

2001 i 2002).

El terminal nerviós que genera l'EPP gran presenta, com hem vist, muscarínics M1 i M2 facilitadors. Per altra banda, la neurotransmissió depèn de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà dels VDCC P/Q, N i L presents en els EPP de les unions doblement innervades del nounat, i l'EPP gran sembla utilitzar tota l'entrada de Ca^{2+} a través d'aquests 3 VDCC per la neurotransmissió.

Com hem vist anteriorment (Santafé i cols., 2003) en sinapsis neuromusculars adultes, ambdós mecanismes moduladors de la neurotransmissió regulats per M1 i M2 depenen de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà del VDCC tipus P/Q.

En aquest apartat específicament analitzem la implicació dels VDCC en la funció muscarínica presinàptica dels axons en les unions doblement innervades, i trobem que en l'axó que genera l'EPP gran el mecanisme modulador de la neurotransmissió regulat pel receptor muscarínic M1 depèn de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà dels VDCC tipus P/Q i L, en canvi, el VDCC tipus N no s'hi troba implicat. Per altra banda, el mecanisme regulat pel receptor M2 depèn de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà dels VDCC tipus P/Q i N, mentre que el canal L en aquest cas, no realitza cap funció en la neurotransmissió.

El terminal nerviós que genera l'EPP petit, per altra banda, presenta receptors M1 i M4 inhibidors i receptors M2 facilitadors de l'alliberament de l'ACh.

Com ja hem vist anteriorment, la neurotransmissió en les unions doblement innervades depèn de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà dels tres VDCC presents en la unió neuromuscular, P/Q, L i N. I l'EPP petit, de la mateixa

manera que l'EPP gran, també utilitza aquests 3 canals.

Quan analitzem la relació o implicació d'aquests VDCC en la regulació de l'alliberament d'ACh modulada pels mAChRs podem observar que el receptor M1 depèn del Ca^{2+} que entra a través dels 3 VDCC disponibles, P/Q, N i L. El receptor M2 depèn de l'entrada de Ca^{2+} per mitjà dels VDCC P/Q i N, i el receptor M4 depèn del Ca^{2+} que entra per mitjà dels VDCC N i L.

Així doncs, el terminal nerviós que produeix l'EPP gran (el qual serà consolidat) sembla utilitzar tota l'entrada de calci a través dels canals de calci N, L, i P/Q per la neurotransmissió. No obstant, en el terminal que genera l'EPP petit alguna part de l'entrada de calci per mitjà dels VDCC sembla activar un mecanisme repressor dependent de calci que redueix l'alliberació del neurotransmissor (Santafé i cols., 2001, 2002). Això es demostrat pel fet que reduint l'entrada de calci, blocant un dels VDCC, incrementa la sortida quàntica per mitjà del terminal petit en les unions duals (Santafé i cols., 2001). Per tant, un mecanisme repressor de l'alliberació del neurotransmissor dependent de calci, activat en el terminal nerviós menys afavorit funcionalment (però no en l'axó presumiblement supervivent), pot estar relacionat amb la pèrdua dels axons supernumeraris que es dona en el desenvolupament. Els blocadors dels VDCC tipus L, N i P/Q produeixen el mateix efecte en el terminal que genera l'EPP petit (potenciació de l'EPP), i sembla poc probable un canal farmacològicament específic per l'hipotetitzat mecanisme repressiu.

Els VDCC estan implicats per tant, en funcions cel·lulars a més de la neurotransmissió. Per exemple, el canal calci tipus N es creu que pot estar implicat en la migració cel·lular (Komuro i Rakic, 1996), la sinaptogènesi (Vigers

i Pfenninger, 1991) i pot estar present en les cèl·lules d'Schwann en unions neuromusculars de rates i humans (Day i cols., 1997). El canal calci tipus L sembla estar implicat en la maduració sinàptica (Sugiura i Ko, 1997), l'expressió genètica (Murphy i cols., 1991) i la retracció axonal (Zhu i Vrbova, 1992). En aquest sentit, Zhu i Vrbova (1992) utilitzant com a model el múscul soleus de rata, informen que el canal calci tipus L sembla estar directament implicat en l'eliminació de la innervació polineuronal, i les proteases activades per calci semblen jugar-hi algun rol (O' Brien i cols, 1984; Connold i cols., 1986). La retracció del terminal probablement implica la reorganització regulada per calci del citoesquelet axonal a l'igual que la disgregació dependent de calci dels filaments d'actina (Forscher, 1989) i microtubuls (Schliwa i cols., 1981) amb la implicació de calpaïnes.

Un mecanisme àmpliament estès durant l'operació dels VDCC és la seva unió amb receptors de membrana axonal. Receptors acoblats a proteïnes G, com són els receptors d'adenosina, en sinapsis de l'hipocamp de cobai (Mogul i cols., 1993; Umemiya i Berger, 1994) i els receptors de glutamat metabotròpic a nivell de neurones piramidals del còrtex sensoriomotor de rata (Stefani i cols., 1998) s'uneixen de diferent manera a canals de calci tipus P/Q o N en els terminals presinàptics. Per altra banda, els subtipus de canals es localitzen diferencialment en certes sinapsis com són les sinapsis tipus calze del nucli medial dels cossos trapezoides de la rata (Wu i cols., 1999). Com hem vist anteriorment (Santafé i cols., 2003) en sinapsis neuromusculars adultes, ambdós mecanismes moduladors de la neurotransmissió regulats per M1 i M2 depenen de l'entrada de calci per mitjà del VDCC tipus P/Q.

Trobem doncs, que múltiples tipus de canals estan implicats en les funcions modulades pels receptors muscarínics presinàptics en els dos axons quan competeixen en les unions duals (figura 23: model d'alliberament del neurotransmissor). Per exemple, la inhibició de l'alliberació sensible a Pirenzepina i mediada per M1 en els terminals que generen EPP petits es troba clarament relacionada amb els tres VDCC presents. Per tant, alguns dels ions calci que entren, qualsevol que sigui el canal utilitzat, poden ajudar a autoinhibir l'alliberació en aquells terminals petits. Aquest fet està d'acord amb que la neurotransmissió té una dependència multicanal durant el desenvolupament de la unió neuromuscular tant en el terminal petit com en el terminal gran de les unions duals (Santafé i cols., 2001). Per altra banda, quan l'eliminació sinàptica supernumerària és completada, en les unions monoïnnervades recentment establertes els mecanismes muscarínics només mantenen una dependència amb els VDCC tipus P/Q. Observem doncs, de manera interessant un canvi gradual en la implicació dels VDCC; passem de dependre gairebé de tots (en els terminals menys madurs) a dependre només d'un (en els terminals adults madurs). Per exemple observem com per l'efecte de la Pirenzepina trobem 3 VDCC implicats en el terminal petit, 2 en el terminal gran i 1 en el terminal de les unions monoïnnervades. Aquest fet indica l'existència d'una disminució progressiva en el funcionament dels VDCC, paral·lel a la maduració i especialització del VDCC tipus P/Q de l'adult.

En cap cas, l'increment de la concentració de calci extern (5 mM) en cap dels dos axons de les sinapsis duals pot prevenir l'efecte de bloqueig dels VDCC en les funcions dels muscarínics. Aquest fet indica la gran importància

de les molècules dels canals de calci en la modulació de l'alliberació regulada per muscarínics.

En resum, els nostres resultats suggereixen que els autoreceptors muscarínics M1, M2 i M4 (expressats diferencialment en els terminals nerviosos de sinapsis doblement innervades neonatals i unides diferencialment als VDCC) modulen directament tant la potenciació del terminal que genera l'EPP gran com la depressió del terminal que genera l'EPP petit, durant la competició axonal i la maduració de la connectivitat neural.

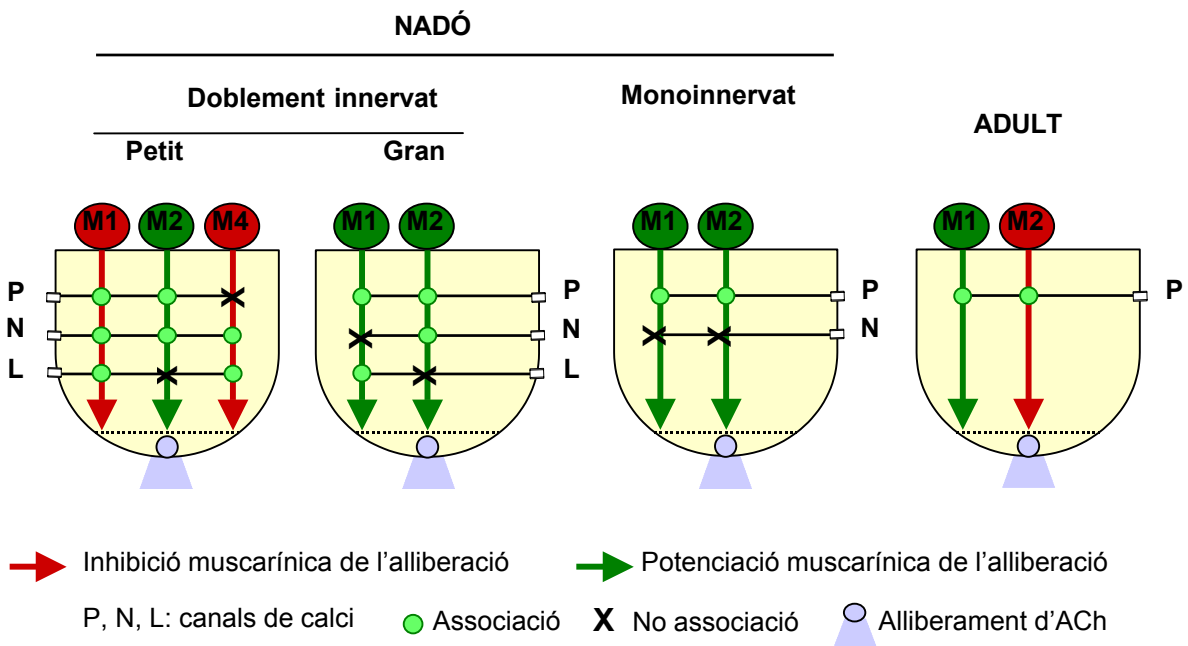


Figura 23. Model proposat per la modulació de l'alliberament del neurotransmissor a través dels mAChRs i les seves connexions amb els VDCCs en unions neuromusculars de nadons i adults.

A la figura 23 es mostra un diagrama que sumeritza els resultats més representatius d'aquest treball i on s'observa com: les sinapsis doblement innervades del nadó tenen terminals generadors d'EPPs grans i petits. L'EPP petit d'aquestes unions duals té autoreceptors muscarínics presinàptics

facilitadors (M2) i inhibidors (M1 i M4) de l'alliberament d'ACh. L'EPP gran en canvi, només té receptors facilitadors (M1 i M2), donant a entendre que aquest terminal guanyarà la competició al terminal petit, al qual un fort mecanisme inhibitori no li permet alliberar quantitat suficient d'ACh.

L'EPP simple per altra banda, també té muscarínics potenciadors de l'alliberament d'ACh (M1 i M2) igual que el terminal que genera l'EPP gran, donant més suport a la idea, abans comentada, que aquest terminal serà qui guanyarà i formarà part, en un futur, de les unions monoinnervades. Que la via intracel·lular d'actuació sigui comú per als receptors M1 i M2 tant en les unions simples com en els EPPs grans de les duals, també va a favor d'aquesta proposta.

Per últim, en els EPPs adults trobem receptors M1 facilitadors i M2 inhibidors. Aquest canvi en la funció del receptor M2 (facilitador en les simples) pot estar relacionat amb un canvi en la maduració necessari per contrarestar la feina potenciadora i arribar a un balanç a l'hora d'alliberar el neurotransmissor. Una vegada ha guanyat l'EPP gran i l'EPP simple està consolidant, ja no necessita tanta activitat potenciadora i es produeix un canvi en l'acció d'aquest receptor M2 en l'animal adult. Canvi que també observem en les vies intracel·lulars de funcionament, que en aquest cas, són diferents.

Aquests receptors muscarínics presinàptics actuen mitjançant uns mecanismes moduladors de l'alliberament d'ACh que impliquen el Ca^{2+} intraaxonal provinent del espai extracel·lular. Aquest Ca^{2+} necessita entrar per mitjà d'uns VDCC que hi ha al terminal axònic. En les unions doblement

innervades trobem implicats els VDCC tipus P/Q, N i L. En el terminal que genera l'EPP petit els receptors M1 precisen del Ca^{2+} que entra per mitjà dels VDCC P/Q, N i L, el receptor M2 només precisa els P/Q i N, i el receptor M4 utilitza els VDCC N i L. En aquests terminals el Ca^{2+} que entra, activa un mecanisme inhibitor de la neurotransmissió relacionat amb els autoreceptors muscarínics que fa que la neurotransmissió sigui menor.

En el terminal que genera l'EPP gran els receptors M1 impliquen els VDCC P/Q i L i els receptors M2, els P/Q i N. Podem observar doncs, com els diferents receptors tenen una configuració diferent en VDCC, en els EPPs petits i grans de les unions duals.

En els terminals simples de les unions neuromusculars monoinnervades la neurotransmissió depèn de l'entrada de Ca^{2+} a través dels VDCC tipus P/Q i N. Els mecanismes potenciadors M1 i M2 existents en aquestes unions neuromusculars només depenen del VDCC tipus P/Q. Passem de dependre doncs, de més d'un canal en els EPPs grans a dependre només d'un en els EPPs simples indicant que, progressivament es necessita menys entrada de Ca^{2+} a mesura que es produeix l'èxit competitiu i la maduració dels terminals guanyadors.

Per últim, en els terminals adults només trobem presents VDCC tipus P/Q que realitzin funcions neurotransmissores. Tant el funcionament del receptor M1 com el funcionament del receptor M2 depenen de l'entrada de Ca^{2+} a través d'aquest canal. S'observa doncs, el manteniment de la dependència d'aquest canal de la mateixa manera que en les sinapsis monoinnervades del nouat.

En resum, veiem que l'EPP petit té una configuració pròpia i diferenciada de receptors muscarínics inhibidors i facilitadors depenents d'uns VDCC concrets que fa que sigui el terminal menys afavorit funcionalment. L'EPP gran en canvi, gaudeix d'una activitat més potenciadora de la neurotransmissió per part dels seus autoreceptors muscarínics, la qual cosa és necessària ja que en aquest període de desenvolupament el neurotransmissor alliberat és escàs. A més, existeix una relació important amb els VDCC presents. Amb el desenvolupament de la unió neuromuscular i gràcies a aquesta configuració, el terminal gran guanya el petit i passa a ser el terminal simple de les unions monoinnervades, tot i que aquest terminal encara necessita una funció facilitadora important dels muscarínics presents ja ha deixat de dependre d'alguns VDCC, només mantenint-se el P/Q, canal que necessita per què el Ca^{2+} entri al seu través i afavoreixi la neurotransmissió. Ja en la maduresa de la unió neuromuscular, en els terminals adults la neurotransmissió és més potent, ja no és necessària una potenciació tan gran per part del receptors M1 i M2 presents en aquests terminals; per tant un d'aquests receptors, concretament l'M2, passa a realitzar una activitat inhibidora, per fer així un contrabanç al receptor M1, i aconseguir un equilibri en la neurotransmissió, el qual aconseguix mitjançant el Ca^{2+} intracel·lular que continua entrant a través dels VDCC tipus P/Q (figura 23).

VI. CONCLUSIONS

VI.1. UNIONS NEUROMUSCULARS ADULTES

1.- En les unions neuromusculars de rata adulta existeixen receptors muscarínics presinàptics (mAChRs) M1 i M2 que realitzen funcions d'autoreceptors.

2.- Els receptors M1 sensibles a Pirenzepina són autopotenciadors de l'alliberació d'ACh i depenen del canal de calci dependent de voltatge (VDCC) tipus P/Q. Els receptors M2 sensibles a Metoctramina són autoinhibidors de l'alliberació d'ACh, i depenen de l'entrada de calci en general, però no per mitjà de cap canal en particular. Els autoreceptors muscarínics tipus M1 i M2 no comparteixen la mateixa via intracel·lular per realitzar la seva acció en la neurotransmissió.

3.- No trobem l'existència de mAChRs M3 sensibles a 4-DAMP i M4 sensibles a Tropicamida que realitzin cap funció en la neurotransmissió.

VI.2. UNIONS NEUROMUSCULARS NOUNATS

VI.2.1. Unions neuromusculars monoinnervades

1.- En les unions neuromusculars monoinnervades de nadó de rata existeixen autoreceptors presinàptics muscarínics tipus M1 i M2 que fan funcions autopotenciadores de l'alliberament d'ACh.

2.- Tant el receptor M1 sensible a Pirenzepina com el receptor M2 sensible a Metoctramina depenen únicament del VDCC tipus P/Q per l'alliberament d'ACh. La via intracel·lular per mitjà de la qual actuen els mAChRs M1 i M2 sembla tenir punts en comú per a tots dos receptors.

3.- Als 15 dies de vida postnatal l'autoreceptor M2 sensible a Metoctramina ja actua com a inhibidor de la neurotransmissió.

4.- No trobem en les sinapsis monoinnervades de nadó la presència de mAChRs M3 sensibles a 4-DAMP i M4 sensibles a Tropicamida.

VI.2.2. Unions neuromusculars doblement innervades

VI.2.2.a. EPP gran

1.- En el terminal que genera l'EPP gran de les unions doblement innervades del nadó de rata existeixen autoreceptors muscarínics tipus M1 i M2 que fan funcions autopotenciadores de l'alliberament d'ACh.

2.- El receptor M1 sensible a Pirenzepina depèn dels VDCC tipus P/Q i L i el receptor M2 sensible a Metoctramina depèn dels VDCC P/Q i N. La via intracel·lular per mitjà de la qual actuen els mAChRs M1 i M2 sembla tenir punts en comú per a tots dos receptors.

3.- No trobem en el terminal que genera l'EPP gran de les sinapsis doblement innervades de nadó la presència de mAChRs M3 sensibles a 4-DAMP i M4 sensibles a Tropicamida.

4.- Per les seves característiques en el control muscarínic de la neurotransmissió, sembla plausible pensar que el terminal que genera l'EPP gran serà el que sobreviurà a l'eliminació sinàptica i passarà a ser l'únic axó de les sinapsis monoinnervades.

VI.2.2.b. EPP petit

1.- En el terminal que produeix l'EPP petit de les unions doblement innervades de nadó de rata existeixen autoreceptors muscarínics dels tipus M1, M2 i M4.

2.- Els receptors M1 sensibles a Pirenzepina i M4 sensibles a Tropicamida són receptors autoinhibidors de l'alliberament d'ACh. Els receptors M2 sensibles a Metoctramina són receptors potenciadors de l'alliberament d'ACh. Aquests tres tipus de mAChRs (M1, M2 i M4) no semblen tenir punts en comú en les seves vies intracel·lulars per realitzar les seves accions en la neurotransmissió.

3.- El receptor M1 depèn dels VDCC tipus P/Q, N, i L, mentre que el receptor M4 depèn dels VDCC tipus N i L. Els receptors M2 depenen dels VDCC tipus P/Q i N.

4.- No trobem en el terminal que genera l'EPP petit de les sinapsis doblement innervades de nadó la presència de mAChRs M3 sensibles a 4-DAMP, que facin funcions d'autoreceptors.

5.- Amb el desenvolupament i la maduració de la unió neuromuscular és produeix un canvi progressiu en la configuració dels autoreceptors muscarínics presinàptics i en la seva dependència als VDCC que afavoreix la pèrdua de les connexions redundants i ens dirigeix cap a la configuració madura final.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abad Santos F, Novalbos J, Gallego Sandin S, Galvez Mugica MA (2003). [Regulation of bronchial tone in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): role of muscarinic receptors]. *An Med Interna* **20**(4): 201-205.

Abbs ET, Joseph DN (1981). The effects of atropine and oxotremorine on acetylcholine release in rat phrenic nerve-diaphragm preparations. *Bri J Pharmacol* **73**: 481-483.

Allen TGJ, Brown DA (1993). M2 muscarinic receptor mediated inhibition of the Ca²⁺ current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. *J Physiol Lond* **466**: 173-189.

Allen TGJ, Sim JA, Brown DA (1993). The whole-cell calcium current in acutely dissociated magnocellular cholinergic basal forebrain neurons of the rat. *J Physiol Lond* **460**: 91-116.

Allen TGJ (1999). The role of N-, Q- and R-type Ca²⁺ channels in feedback inhibition of ACh release from rat basal forebrain neurones. *J Physiol Lond* **515**: 93-107.

Anderson MJ, Fambrough DM (1983). Agregates of acetylcholine receptors are associated with plaques of a basal lamina haparan sulfate proteoglycan on the skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **97**: 1396-1411.

Arellano RO, Garay E, Miledi R (1999). Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Physiol Lond* **521**: 409-419.

Arenson MS (1989). Muscarinic inhibition of quantal transmitter release from the magnesium-paralysed frog sartorius muscle. *Neuroscience* **30**: 827-836.

Atchison WD (1989). Dihydropyridine-sensitive and -insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* **251**: 672-678.

Ashkenazi A, Winslow JW, Peralta EG, Peterson GL, Schimerlik MI, Capon DJ, Ramachandran J (1987). An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science* **238**(4827): 672-675.

Bahls FH, Lartius R, Trudeau LE, Doyle RT, Fang Y, Witcher D, Campbell K, Haydon PG (1998). Contact-dependent regulation of N-type calcium channel subunits during synaptogenesis. *J Neurobiol* **35**: 198-208.

Baker PF (1972). Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog Biophys Mol Biol* **24**: 177-223.

Balice-Gordon RJ, Lichtman JW (1993). *In vivo* observations of presynaptic and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci* **13**: 834-855.

Barnard EA, Dolly JO, Porter CW, Albuquerque EX (1975). The acetylcholine receptor and the ionic conductance modulation system of skeletal muscle. *Exp Neurol* **48**: 1-28.

Barry JA, Ribchester RR (1995). Persistent polyneuronal innervation in partially denervated rat muscle after reinnervation and recovery from prolonged nerve conduction block. *J Neurosci* **15**(10):6327-6339.

Benoit P, Changeux JP (1975). Consequences of tenotomy on the evolution of multiinnervation in developing rat soleus muscle. *Brain Res* **99**: 354-358.

Birks R (1974). The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J Neurocytol* **3**: 133-160.

Bowersox SS, Miljanich GP, Sugiura Y, Li C, Nadasdi L, Hoffman BB, Ramachandran J, Ko C-P (1995). Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel ω -conopeptides and ω -Agatoxin-IVA. *J Pharmacol Exp Ther* **273**: 248-256.

Brown MC, Jansen JKS, Van Essen DC (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J Physiol (London)* **261**: 387-742.

Brown MC, Hopkins WG, Keynes RJ (1982). Short and long-term effects of paralysis on the motor innervation of two different neonatal mouse muscles. *J Physiol (London)* **339**: 439-450.

Burgess RW, Nguyen QT, Son YJ, Lichtman JW, Sanes JR (1999). Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction. *Neuron* **23**: 33-44.

Bymaster FP, Felder C, Ahmed S, McKinzie D (2002). Muscarinic receptors as a target for drugs treating schizophrenia. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* **1**(2): 163-181.

Capece ML, Lydic R (1997). cAMP and protein kinase A modulate cholinergic rapid eye movement sleep generation. *Am J Physiol* **273**: R1430-1440.

Catterall WA (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *A Rev Biochem* **64**: 493-531.

Caulfield MP (1993). Muscarinic receptors – characterization, coupling and function. *Pharmacol Therap* **58**: 319-379.

Caulfield MP, Birdsall NMJ (1998). Classification of muscarine acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**: 279-290.

Cheng K, Chen Y, Zimmiak P, Raufman JP, Xiao Y, Frucht H (2002). Functional interaction of lithocolic acid conjugates with M3 muscarinic receptors on a human colon cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* **1588** (1): 48-55.

Colman H, Nabekura J, Lichtman JW (1997). Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science* **275**: 356-361.

Connold AL, Evers JV, Vrbova G (1986). Effect of low calcium and protease inhibitors on synapse elimination during postnatal development in the rat soleus muscle. *Dev Brain Res* **28**: 99-107.

Costanzo EM, Barry JA, Ribchester RR (2000). Competition at silent synapses in reinnervated skeletal muscle. *Nat Neurosci* **3**(7): 694-700.

Couteaux R, Pécot-Dechavassine M (1970). Vesicules synaptiques et poches au niveau des zones actives de la jonction neuromusculaire. *Acad Sci (Paris)* **271**: 2346-2349.

Culican SM, Nelson CC, Lichtman JW (1998). Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J Neurosci* **18**: 4953-4965.

Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha₁ subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci* **17**: 6226-6235.

Dennis MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ (1981). Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev Biol* **81**: 266-279.

Denzer AJ, Hauser DM, Gesemann M, Ruegg MA (1997). Synaptic differentiation: the role of agrin in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* **290**: 357-365.

Desmadryl G, Hilaire C, Vignes S, Diochot S, Valmier J (1998). Developmental regulation of T-, N- and L-type calcium currents in mouse embryonic sensory neurones. *Eur J Neurosci* **10**: 545-552.

Diaz ME, Recio-Pinto E, Salazar BC, Castillo C (1998). Lidocaine accessibility to the open state of brain Na⁺ channels increases during development. *Jap Heart J* **39**: 199-210.

Dilsaver SC, Majchrzak MJ, Snider RM, Davidson RK (1991). A nicotinic receptor antagonist enhances the hypothermic response to a muscarinic agonist. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **15**: 539-549.

Dolezal V, Túcek S (1993). Presynaptic muscarinic receptors and the release of acetylcholine from cortical prisms: roles of Ca²⁺ and K⁺ concentration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **348**: 228-233.

Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J (2002). Evaluation of muscarinic agonist - induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **62**(5):1084-1093.

Duxon MJ (1982). The effect of postsynaptic block on development of the neuromuscular junction in postnatal rat. *J Neurocytol* **11**: 395-408.

Duxson MJ, Vrbova G (1985). Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction. *J Neurocytol* **14**(3): 337-363.

Eccles JC, Liley AW (1959). Factors controlling the liberation of acetylcholine at the neuromuscular junction. *Am J Physic Med* **38**: 96-103.

Eisenach JC (1999). Muscarinic - mediated analgesia. *Life Sci* **64**(6-7): 549-554.

Fambrough DM (1974). Acetylcholine receptors: revised estimates of extrajunctional receptor density in denervated rat diaphragm. *J Gen Physiol* **64**: 468-572.

Fatt P, Katz B (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol (London)* **115**: 320-370.

Fatt P, Katz B (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol (London)* **117**: 109-128.

- Felder CC, Bymaster FP, Ward J, DeLapp N (2000). Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem* **43**(23):4333-4353.
- Felder CC, Porter AC, Skillman TL, Zhang L, Bymaster FP, Nathanson NM, Hamilton SE, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL (2001). Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis. *Life Sci* **68**(22-23):2605-2613.
- Forscher P (1989). Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *Trends Neurosci* **12**(11): 468-474.
- Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang WI, Xiao Y (1999). Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin Cancer Res* **5**(9): 2532-2539.
- Fu WM, Huang FL (1994). L-type Ca^{2+} is involved in the regulation of spontaneous transmitter release at developing neuromuscular synapses. *Neurosci* **58**: 131-140.
- Gan WB, Lichtman JW (1998). Synaptic segregation at the developing neuromuscular junction. *Science* **282**:1508-1511.
- Ganguly DK, Das M (1979). Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals. *Nature* **278**: 645-646.
- Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder CC, Bymaster FP, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Duttaroy A, Deng CX, Wess J (2001). Generation and pharmacological analysis of M2 and M4 muscarinic receptor knockout mice. *Life Sci* **68**: 2457-2466.
- Gray DB, Brusés JL, Pilar GR (1992). Developmental switch in the pharmacology of Ca^{2+} channels coupled to acetylcholine release. *Neuron* **8**: 1-20.
- Häggblad J, Heilbronn E (1983). Release of acetylcholine at the motor endplate of the rat - evidence against a muscarinic acetylcholine autoreceptor. *Br J Pharmacol* **80**: 471-476.
- Hamilton BR, Smith DO (1991). Autoreceptor-modulated purinergic and cholinergic inhibition of motor nerve terminal calcium currents in the rat. *J Physiol Lond* **432**: 327-341.
- Heuser JE, Reese TS (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**: 315-344.

Heuser JE, Reese TS, Landis DM (1974). Functional changes in frog neuromuscular junctions with freeze-fracture. *J Neurocytol* **3**: 109-131.

Heuser JE, Salpeter SR (1979). Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen, deep-etched, and rotary-replicated Torpedo postsynaptic membrane. *J Cell Biol* **82**: 150-173.

Heuser JE (1989a). Review of electron microscopic evidence favouring vesicle exocytosis as the structural basis for quantal release during synaptic transmission. *Q J Exp Physiol* **74**: 1051-1069.

Heuser JE (1989b). The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane. *Cell Biol Int Rep* **13**: 1063-1076.

Hofman F, Biel M, Flockerzi V (1994). Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Ann Rev Neurosci* **17**: 399-418.

Hong SJ, Chang CC (1995). Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, ω -agatoxin IVA. *J Physiol Lond* **482**: 283-290.

Hsu KS, Huang CC, Gean PW (1995). Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M3 receptors in the rat neostriatum. *Neurosci Lett* **197**: 141-144.

Hubbard JI, Schmidt RF (1963). An electrophysiological investigation of mammalian motor nerve terminals. *J Physiol (London)* **166**: 145-167.

Hubbard JI, Jones SF, Landar EM (1968). On the mechanism by which calcium and magnesium affect the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol (London)* **194**: 355-380.

Hubbard JL, Llinás R, Quastel DML (1969) A: *Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission*. Edward Arnold Publishers Ltd.: London.

Hubbard JI (1970). Mechanism of transmitter release. *Prog Biophys Mol Biol* **21**: 33-45.

Hubbard JJ, Wilson DF (1973). Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in absence of the blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *J Physiol Lond* **228**: 307-327.

Huguenard JR (1998). Low-voltage-activated (T-type) calcium-channel genes identified. *Trends Neurosci* **21**: 451-452.

Huxley AF, Stampfli R (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibers. *J Physiol (London)* **108**: 315-339.

Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T (2000). Developmental Changes in Calcium Channel Types Mediating Central Synaptic Transmission. *J Neurosci* **20**: 59-65.

Jablecki C, Brimijoin S (1974). Reduced axoplasmic transport of choline acetyltransferase activity in dystrophic mice. *Nature* **250**: 151-154.

Janowsky DS, Overstreet DH, Nurnberger JI Jr (1994). Is cholinergic sensitivity a genetic marker for the affective disorders? *Am J Med Genet* **54**: 335-44.

Jansen JKS, Fladby T (1990). The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. *Prog. Neurobiol* **34**: 39-90.

Jia M, Li MX, Dunlap V, Nelson PG (1999). The trombin receptor mediates functional activity-dependent neuromuscular synapse reduction via protein kinase C activation in vitro. *J Neurobiol* **38**: 369-381.

Kandel ER, Siegelbaum SA (1991). Directly gated transmission at the nerve-muscle synapse. A: Principles of Neural Science. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Eds). 3^a edició. Elsevier Science. New York. Cap 10, pp 135-152.

Katz B, Miledi R (1965). The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc R Soc Lond B* **161**: 483-495.

Katz B, Miledi R (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol (London)* **195**: 481-492.

Katz B, Miledi R (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol Lond* **207**: 789-801.

Katz B, Miledi R (1977). Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **196**: 59-72.

Katz E, Ferro PA, Weisz G, Uchitel OD (1996). Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol Lond* **497**(3): 687-697.

Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan WB, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW (2001). Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31(3):381-394.

Kerr LM, Yoshikami D (1984). A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308: 282-284.

Komuro H, Rakic P (1996). Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17: 275-285.

Kopp DM, Perkel DJ, Balice-Gordon RJ (2000). Disparity in neurotransmitter release probability among competing inputs during neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci* 20: 8771-8779.

Kuffler SW, Nicholls JG (1982). De la neurona al cerebro. Aspectos celulares de la función del sistema nervioso. Ed. Reverté SA. Barcelona. Cap 5, p 102.

Kuffler SW, Yoshikami D (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: An estimate from iontophoretic applications of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol (London)* 251: 465-482.

Kuffler D, Thompson W, Jansen JK (1997). The elimination of synapses in multiply-innervated skeletal muscle fibers of the rat: dependence on distance between endplates. *Brain Res* 138: 353-358.

Lanuza MA, Garcia N, Santafé, M, Nelson PG, Fenoll-Brunet MR, Tomas J (2001). Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *J Neurosci Res* 63: 330-340.

Lanuza MA, Garcia N, Santafé MM, González CM, Alonso I, Nelson PG, Tomàs J (2002). Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination process depends on protein kinase C. *J Neurosci Res* 67: 607-617.

Lichtman JW, Balice-Gordon RJ (1990). Understanding synaptic competition in theory and in practice. *J Neurobiol* 21(1):99-106.

Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Plaff SL, Sanes JR, Lee K-F (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410: 1057-1064.

Linkhart TA, Wilson BW (1975). Role of muscle contraction in trophic regulation of chick muscle acetylcholinesterase activity. *Exp Neurol* **48**: 557-564.

Mallick BN, Joseph MM (1997). Role of cholinergic inputs to the medial preoptic area in regulation of sleep-wakefulness and body temperature in freely moving rats. *Brain Res* **750**: 311-317.

Margeta-Mitrovic M, Grigg JJ, Koyano K, Nakajima Y, Nakajima S (1997). Neurotensin and substance P inhibit low- and high-voltage-activated Ca^{2+} channels in cultured newborn rat nucleus basalis neurons. *J Neurophysiol* **78**: 1341-1352.

Martin AR (1966). Quantal nature of synaptic transmission. *Physiol Rev* **46**: 51-66.

Martin AR (1976). Junctional transmission II. Presynaptic mechanisms. A: Kandel E (ed): "Handbook Physiology- The nervous System I" Williams and Wilkins: Baltimore, pp 329-355.

Mayorga AJ, Cousins MS, Trevitt JT, Conlan A, Gianutsos G, Salomon JD (1999). Characterization of the muscarinic receptor subtype mediating pilocarpine-induced tremulous jaw movements in rats. *Eur J Pharmacol* **364**: 7-11.

McLachlan EM, Martin AR (1981). Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol Lond* **311**: 307-324.

Miledi R (1973). Transmitter release induced by injections of calcium ions nerve terminals. *Proc R Soc Lond B* **183**: 421-425.

Minic J, Molgo J, Karlsson E, Krejci E (2002). Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci* **15**: 439-448.

Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* **15**: 675-688.

Mogul DJ, Adams ME, Fox AP (1993) Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca^{2+} current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* **10**(2): 327-334.

Muller D, Loctin F, Dunant Y (1987). Inhibition of evoked acetylcholine release: two different mechanisms in the *Torpedo* electric organ. *Eur J Pharmacol* **33**: 225-234.

Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, Adem A (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res* **960**(1-2): 259-262.

Murphy TH, Worley PF, Baraban JM (1991). L-Type voltage-sensitive channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* **7**: 625-635.

O'Brien RAD, Ostberg AJC, Vrbova G (1978). Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J Physiol Lond* **282**: 571-582.

O'Brien RAD, Östberg AJC, Vrbova G, (1984). Protease inhibitors reduce the loss of nerve terminals induced by activity and calcium in developing rat soleus muscles. *Neuroscience* **12**: 637-646.

Oh TH, Markelonis GJ (1978). Neurotrophic protein regulates muscle acetylcholinesterase in culture. *Science* **200**: 337-345.

Pecot-Dechavassine M, Brouard MO (1993). Changes in large dense-core vesicles during maturation of the rat neuromuscular junction. *Neuroreport* **4**:29-32.

Penner R, Dreyer F (1986). Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflügers Arch* **406**: 190-197.

Pepper K, Dreyer F, Sandri C, Akert K, Moor H (1974). Structure and ultrastructure of the frog motor end-plate: a freeze-etching study. *Cell Tissue Res* **149**: 437-455.

Personius KE, Balice-Gordon RJ (2001). Loss of correlated motor neuron activity during synaptic competition at developing neuromuscular synapses. *Neuron* **31**(3): 395-408.

Plummer JM, Greenberg MJ, Lehman HK, Watts JA (1983). Competitive inhibition by dimethylsulfoxide of molluscan and vertebrate acetylcholinesterase. *Biochem Pharmacol* **32**: 151-158.

Porter CW, Bernard EA (1975). The density of cholinergic receptors at the end-plate postsynaptic membrane: ultrastructural studies in two mammalian species. *J Membrane Biol* **20**: 31-49.

Protti DA, Szczupak L, Scornik FS, Uchitel OD (1991). Effect of ω -conotoxin GVIA on neurotransmitter releases at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res* **557**: 336-339.

Protti D, Uchitel OD (1993). P/Q-type calcium channels activate neighboring calcium-dependent potassium channels in mouse motor nerve terminals. *Pflügers Arch* **434**: 496-412.

Redfern PA (1970). Neuromuscular transmission in newborn rats. *J Physiol (London)* **209**: 701-709.

Ren J, Harty RF (1994). Presynaptic muscarinic receptors modulate acetylcholine release from rat antral mucosal/submucosal nerves. *Digest Dis Sci* **39**: 1099-1106.

Ribchester RR, Barry JA (1994). Spatial versus consumptive competition at polineurally innervated neuromuscular junctions. *Exp Physiol* **79**: 465-494.

Robertson JD (1960). Electron microscopy of the motor end-plate and the neuromuscular spindle. *Am J Phys Med* **39**: 1-18.

Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP (1997). Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at presynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junctions. *J Physiol Lond* **504**: 337-347.

Rosato-Siri MD, Uchitel OD (1999). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol Lond* **514**: 533-540.

Rouse ST, Levey AI (1997). Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* **380**: 382-394.

Rubin LL, Schuetze SW, Weil GL (1980). Regulation of acetylcholinesterase appearance at neuromuscular junctions in vitro. *Nature* **283**: 264-268.

Ruegg MA, Bixby JL (1998). Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* **21**:22-7.

Safronov BV, Wolff M, Vogel W (1999). Axonal expression of sodium channels in rat spinal neurones during postnatal development. *J Physiol (London)* **514**: 729-734.

Saladin KS, C Porth (1998). Anatomy & physiology : the unity of form and function. Boston, Mass., WCB/McGraw-Hill.

Salpeter MM (1987). Vertebrate Neuromuscular Junctions: General Morphology, Molecular Organization and Functional Consequences. A: The vertebrate neuromuscular junction. Salpeter MM (Ed). Alan R Liss, Inc: New York. Cap 1, pp 1-43.

Santafé MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD (2000). Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience* **95**(1):227-234.

Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J (2001). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience* **102**: 697-708.

Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Salon I, Tomàs J (2002). Decreased calcium influx into the neonatal rat motor nerve terminals can recruit additional neuromuscular junctions during the synapse elimination period. *Neuroscience* **110**: 147-154.

Santafé MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J (2003). Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci* **17**(1): 119-127.

Schliwa M, Euteneuer U, Bulinski JC, Izant JG (1981). Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:1037-1041.

Schmid SL, Braell WA, Schossman DM, Rothman JE (1984). A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages for uncoating ATPase. *Nature* **311**: 228-231.

Segal M, Auerbach JM (1997). Muscarinic receptors involved in hippocampal plasticity. *Life Sci* **60**: 1085-1091.

Slutsky I, Parnas H, Parnas I (1999). Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Lond* **514**: 769-782.

Soha JM, Yo C, Van Essen DC (1987). Synapse elimination by fiber type and maturational state in rabbit soleus muscle. *Dev Biol* **123**: 136-144.

Starke K, Göthert M, Kilbinger H (1989). Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* **69**: 864-989.

Stefani A, Spadoni F, Bernardi G (1998). Group III metabotropic glutamate receptor agonists modulate high voltage-activated Ca²⁺ currents in pyramidal neurons of the adult rat. *Exp Brain Res* **119**: 237-244.

Sugiura Y, Ko C (1997). Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci* **17**: 1101-1111.

Swanson GJ, Vrbova G (1987). Effects of low calcium and inhibition of calcium activated neutral protease (CANP) on mature nerve terminal structure in the rat esternocostalis muscle. *Brain Res* **430**: 199-203.

Tasaki I (1959). Conduction of nerve impulse. Handbook of physiology. Section 1, Vol 1, Chap. III. J. Field (Ed). pp 75-121. American Physiological Society: Bethesda MD.

Thompson W, Kuffler DP, Jansen JKS (1979). The effects of prolonged, reversible block of nerve impulses on the elimination of polyneuronal innervation of new-born rat skeletal muscle fibers. *Neurosci* **4**: 271-281.

Thompson W (1983). Synapse elimination in neonatal rat muscle is sensitive to pattern of muscle use. *Nature* **302**: 614-616.

Thompson WJ (1985). Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell Mol Neurobiol* **5**: 167-182.

Uchitel OD, Protti DA, Sánchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinás R (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Nat Acad Sci USA* **89**: 3330-3333.

Umehiya M, Berger AJ (1994). Activation of adenosine A1 and A2 receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron* **13**(6):1439-1446.

Urbano FJ, Piedras-Rentería ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003). Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci* **100**(6):3491-6.

Vannucchi MG, Pepeu G (1995). Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from rat cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* **190**: 53-56.

Vigers AJ, Pfenninger KH (1991). N-type and L-type calcium channels are present in nerve growth cones. Numbers increase on synaptogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* **60**(2): 197-203.

Walsh MK, Lichtman JW (2003). In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron* **37**: 67-73.

Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozann T, Meldolesi J (1987). Activation of muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons. *Proc Nat Acad Sci USA* **84**: 4313-4317.

Wessler I, Karl M, Mai M, Diener A (1987). Muscarine receptors on the rat phrenic nerve, evidence for positive and negative muscarinic feedback mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **335**: 605-612.

Wess J (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* **10**: 69-99.

Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998). Localization of Ca^{2+} channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* **18**: 6319-6330.

Williams S, Serafin M, Muhlethaler M, Bernheim L (1997). Distinct contributions of high- and low-voltage-activated calcium currents to afterhyperpolarizations in cholinergic nucleus basalis neurons of the guinea pig. *J Neurosci* **17**: 7307-7315.

Willmann R, Fuhrer C (2002). Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. *Cell Mol Life Sci* **59**:1296-1316.

Wu L-G, Westenbroek RE, Borst JGG, Catterall WA, Sakmann B (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single-calyx synapses. *J Neurosci* **19**: 726-736.

Zhu P-H, Vrbova G (1992). The role of Ca^{2+} in the elimination of polyneuronal innervation of rat soleus muscle fibers. *Eur J Neurosci* **4**: 433-437.

VIII. ANNEX